



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พฤกษศาสตร์)

ปริญญา

พฤกษศาสตร์

พฤกษศาสตร์

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง ผลของสารสกัดหยาบจากไซยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon* sp. ต่อการเกิด lipid peroxidation, ammonia assimilation และปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสงในพืชบางชนิด

Effects of Crude Extract from Cyanobacterium *Hapalosiphon* sp. on Lipid Peroxidation, Ammonia Assimilation and Photosynthetic Pigment Content in Some Plants

นางผู้วิจัย นางสาวศิริพรรณ สุขขัง

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ศรีสม สุวรรณวงศ์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ลลิตี กาวีตะ, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ณัฏฐา เสนีवास, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์สุรียา ตันติวิวัฒน์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ผลของสารสกัดหยาบจากไซยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon* sp. ต่อการเกิด lipid peroxidation,
ammonia assimilation และปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสง
ในพืชบางชนิด

Effects of Crude Extract from Cyanobacterium *Hapalosiphon* sp. on Lipid Peroxidation,
Ammonia Assimilation and Photosynthetic Pigment Content in Some Plants

โดย

นางสาวศิริพรรณ สุขขัง

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พญกษศาสตร์)
พ.ศ. 2552

ศิริพรรณ สุขขัง 2552: ผลของสารสกัดหยาบจากไซยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon* sp. ต่อการเกิด lipid peroxidation, ammonia assimilation และปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสง ในพืชบางชนิด ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พฤกษศาสตร์) สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์ศรีสม สุวรรณวงศ์, Ph.D. 100 หน้า

จากการศึกษาผลของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยน้ำกลั่นจากไซยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon* sp. ต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาบางประการของพืช 4 ชนิด ได้แก่ หนุ่ยขจรจบ ไมยราบยักษ์ ถั่วเหลือง และข้าวพันธุขาวดอกมะลิ 105 ที่อยู่ในระยะต้นกล้า โดยฉีดพ่นสารสกัดหยาบความเข้มข้น 0, 75, 125 และ 175 กรัม/น้ำหนักรวบรวมเซลล์ต่อลิตร จำนวน 3 ครั้ง และทดสอบการเกิด lipid peroxidation โดยวัดการสะสมของ malondialdehyde (MDA) การสะสมแอมโมเนียจากกระบวนการ ammonia assimilation และปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสง ได้แก่ คลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์ พบว่า สารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. มีผลทำให้เกิด lipid peroxidation ในใบของหนุ่ยขจรจบและไมยราบยักษ์ โดยมีผลต่อไมยราบยักษ์มากกว่าหนุ่ยขจรจบ แต่ไม่มีผลทำให้เกิด lipid peroxidation ในราก มีผลต่อกระบวนการ ammonia assimilation โดยทำให้เกิดการสะสมแอมโมเนียในใบของหนุ่ยขจรจบ ใบของถั่วเหลือง และในรากของข้าว โดยสารสกัดมีผลทำให้ปริมาณแอมโมเนียในใบของหนุ่ยขจรจบเพิ่มขึ้นมากที่สุด รวมทั้งยังทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์เอในไมยราบยักษ์ลดลง แต่ไม่มีผลต่อปริมาณคลอโรฟิลล์บีและแคโรทีนอยด์ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าสารสกัดหยาบมีผลต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาต่างๆ ในพืชแต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยคาดว่ากลไกหลักในการทำลายคือการทำให้เกิด lipid peroxidation ในพืช

นอกจากนี้ในการศึกษาความเสถียรของสารสกัดหยาบโดยเก็บรักษาสารสกัดหยาบไว้ที่อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 30 และ 60 วัน แล้วนำมาทดสอบผลต่อการเกิด lipid peroxidation ในไมยราบยักษ์ พบว่าทั้งอุณหภูมิและระยะเวลาการเก็บรักษาไม่มีผลทำให้ปริมาณ MDA ในใบและรากมีความแตกต่างกันทางสถิติ แสดงว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสารสกัดหยาบที่มีผลทำให้เกิด lipid peroxidation ยังมีความเสถียรอย่างน้อย 60 วันหลังจากการสกัดไม่ว่าจะเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 หรือ 30 องศาเซลเซียส ดังนั้น สารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. สามารถเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการนำไปพัฒนาใช้เป็นสารกำจัดวัชพืชที่มาจากธรรมชาติสำหรับการทำการเกษตรแบบยั่งยืนได้

Siriphan Sukkhaeng 2009: Effects of Crude Extract from Cyanobacterium *Hapalosiphon* sp. on Lipid Peroxidation, Ammonia Assimilation and Photosynthetic Pigment Content in Some Plants. Master of Science (Botany), Major Field: Botany, Department of Botany. Thesis Advisor: Associate Professor Srisom Suwanwong, Ph.D. 100 pages.

The effects of aqueous crude extract from cyanobacteria (*Hapalosiphon* sp.) on some physiological processes in 4 plant species *i.e.* feather pennisetum (*Pennisetum polystachyon* Schult.), giant mimosa (*Mimosa pigra* L.), soybean (*Glycine max* L.) and rice (*Oryza sativa* L. cv. Khao Dawk Mali 105) at seedling stage were investigated. The crude extract at the concentration 0, 75, 125 and 175 g(DW)/l were sprayed 3 times onto the plants. Malondialdehyde (MDA) content as an indicator of lipid peroxidation, ammonia accumulation and photosynthetic pigments (*i.e.* chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoids) content were determined. The results showed that the crude extract from *Hapalosiphon* sp. enhanced lipid peroxidation in feather pennisetum and giant mimosa leaves and had more effect on giant mimosa. On the other hand, the crude extract had no effect in roots of all selected plant species. In addition, the crude extract affected on ammonia assimilation by increasing ammonia content in feather pennisetum leaves, soybean leaves and rice roots and the increasing of ammonia content in feather pennisetum leaves was the highest one. The crude extract also decreased chlorophyll a content in giant mimosa but had no effect on chlorophyll b and carotenoids content. These indicated that the effects of *Hapalosiphon* sp. crude extract on physiological processes were different in each plants and the main mode of action of *Hapalosiphon* sp. crude extract might be lipid peroxidation.

Long-term stability study of the crude extract was investigated by spraying the crude extract stored at temperatures of 4 and 30 degree celcius for different period of 0, 30 and 60 days onto giant mimosa seedlings and lipid peroxidation was determined. The results showed that storage temperatures and times had no effect on MDA content in both leaves and roots. These indicated that bioactive compounds in the crude extract that caused lipid peroxidation remained stable at least 60 days after extraction when stored at 4 or 30 degree celcius. Hence, *Hapalosiphon* sp. crude extract can be more alternative in natural herbicide development for sustainable agriculture.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

____ / ____ / ____

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ศรีสม สุวรรณวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก รองศาสตราจารย์ ดร. ลิลลี่ กาวิตะ และอาจารย์ ดร. ฉัญฐา เสนีवास อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำปรึกษา แนะนำ ช่วยเหลือในด้านต่างๆ สำหรับการทดลอง และสละเวลาตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. มาลี ณ นคร ประธานการสอบ และรองศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา ศรีเพ็ญ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่สละเวลาในการสอบและแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ รวมถึงคณาจารย์ภาควิชาพฤกษศาสตร์ทุกท่านที่ให้ความสนใจและคำชี้แนะจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ นางสาวอินทรา ชูดแก้ว ที่ให้คำปรึกษาและช่วยชี้แนะรายละเอียดและช่วยเหลือในด้านอุปกรณ์ในการทดลองครั้งนี้ ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณมูลนิธิศาสตราจารย์ ดร. แถบ นิละนิตี ที่ให้การสนับสนุนเรื่องทุนการศึกษา

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ บิดามารดา และทุกคนในครอบครัวที่คอยให้กำลังใจ ให้การสนับสนุน และส่งเสริมด้านการศึกษาดำเนินมา

ศิริพรรณ สุขขัง

พฤษภาคม 2552

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(7)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	17
อุปกรณ์	17
วิธีการ	18
ผลและวิจารณ์	24
ผล	24
วิจารณ์	62
สรุปและข้อเสนอแนะ	72
สรุป	72
ข้อเสนอแนะ	73
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	74
ภาคผนวก	84
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	100

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ผลของสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. ต่อปริมาณ MDA ในใบและรากของหญ้าจรจบ	24
2	ผลของสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. ต่อปริมาณ MDA ในใบและรากของไมยราบยักษ์	26
3	ผลของสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. ต่อปริมาณ MDA ในใบและรากของถั่วเหลือง	28
4	ผลของสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. ต่อปริมาณ MDA ในใบและรากของข้าว	30
5	ผลของสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. ต่อการสะสมปริมาณแอมโมเนียในใบและรากของหญ้าจรจบ	34
6	ผลของสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. ต่อการสะสมปริมาณแอมโมเนียในใบและรากของไมยราบยักษ์	36
7	ผลของสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. ต่อการสะสมปริมาณแอมโมเนียในใบและรากของถั่วเหลือง	38
8	ผลของสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. ต่อการสะสมปริมาณแอมโมเนียในใบและรากของข้าว	40
9	ผลของสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. ต่อปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสงในใบหญ้าจรจบ	44
10	ผลของสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. ต่อปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสงในใบไมยราบยักษ์	46
11	ผลของสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. ต่อปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสงในใบถั่วเหลือง	48
12	ผลของสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. ต่อปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสงในใบข้าว	50

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
13	ผลของอุณหภูมิที่เก็บรักษาและระยะเวลาการเก็บรักษาสารสกัดหยาบต่อปริมาณ MDA ในใบและรากของไมยราบยักษ์	59
ตารางผนวกที่		
1	ปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร BG-11 ปริมาตร 1 ลิตร	91
2	ผลของสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. ต่อปริมาณ MDA ในใบและรากของพืชชนิดต่างๆ	92
3	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. ต่อปริมาณ MDA ในใบและรากของพืชชนิดต่างๆ	93
4	ผลของสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. ต่อปริมาณแอมโมเนียในใบและรากของพืชชนิดต่างๆ	94
5	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. ต่อปริมาณแอมโมเนียในใบและรากของพืชชนิดต่างๆ	95
6	ผลของสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. ต่อปริมาณรงควัตถุในใบของพืชชนิดต่างๆ	96
7	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. ต่อปริมาณรงควัตถุในใบของพืชชนิดต่างๆ	97
8	ผลของอุณหภูมิที่เก็บรักษาและระยะเวลาในการเก็บรักษาสารสกัดหยาบต่อปริมาณ MDA ในใบและรากของไมยราบยักษ์	98
9	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของอุณหภูมิที่เก็บรักษาและระยะเวลาการเก็บรักษาสารสกัดหยาบต่อปริมาณ MDA ในใบและรากของไมยราบยักษ์	99

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	<i>Hapalosiphon</i> sp. กำลังขยาย 400 เท่า	5
2	ความสัมพันธ์ระหว่างออกซิเจนและ ROS	10
3	กลไกการเกิด lipid peroxidation ในพืช	11
4	กระบวนการ ammonia assimilation โดยเอนไซม์ GS/GOGAT	13
5	กระบวนการ ammonia assimilation โดยเอนไซม์ GDH	13
6	โครงสร้างของรงควัตถุที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง	15
7	ผลของสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. ต่อปริมาณ MDA ในใบและรากของ หญ้าจรจบ	25
8	ผลของสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. ต่อปริมาณ MDA ในใบและรากของ ไมยราบยักษ์	27
9	ผลของสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. ต่อปริมาณ MDA ในใบและรากของ ถั่วเหลือง	29
10	ผลของสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. ต่อปริมาณ MDA ในใบและรากของ ข้าว	31
11	ผลของสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. ต่อปริมาณ MDA ในใบของวัชพืช และพืชปลูกชนิดต่างๆ เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ที่เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม	32
12	ผลของสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. ต่อปริมาณ MDA ในรากวัชพืชและ พืชปลูกชนิดต่างๆ เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ที่เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม	33
13	ผลของสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. ต่อการสะสมปริมาณแอมโมเนียใน ใบและรากของหญ้าจรจบ	35
14	ผลของสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. ต่อการสะสมปริมาณแอมโมเนียใน ใบและรากของไมยราบยักษ์	37
15	ผลของสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. ต่อการสะสมปริมาณแอมโมเนียใน ใบและรากของถั่วเหลือง	39

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
16	ผลของสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. ต่อการสะสมปริมาณแอมโมเนียในใบและรากของข้าว	41
17	ผลของสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. ต่อการสะสมปริมาณแอมโมเนียในใบของวัชพืชและพืชปลูกชนิดต่างๆ เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ที่เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม	42
18	ผลของสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. ต่อการสะสมปริมาณแอมโมเนียในรากของวัชพืชและพืชปลูกชนิดต่างๆ เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ที่เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม	43
19	ผลของสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. ต่อปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสงในใบหญ้าจรจบ	45
20	ผลของสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. ต่อปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสงในใบไมยราบยักษ์	47
21	ผลของสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. ต่อปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสงในใบถั่วเหลือง	49
22	ผลของสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. ต่อปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสงในใบข้าว	51
23	ผลของสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. ต่อปริมาณคลอโรฟิลล์เอในใบของวัชพืชและพืชปลูกชนิดต่างๆ เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ที่เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม	52
24	ผลของสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. ต่อปริมาณคลอโรฟิลล์บีในใบของวัชพืชและพืชปลูกชนิดต่างๆ เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ที่เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม	53
25	ผลของสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. ต่อปริมาณแคโรทีนอยด์ในใบของวัชพืชและพืชปลูกชนิดต่างๆ เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ที่เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม	54
26	ลักษณะของไมยราบยักษ์เมื่อได้รับสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. ความเข้มข้นต่างๆ	55
27	ลักษณะของหญ้าจรจบเมื่อได้รับสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. ความเข้มข้นต่างๆ	56

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
28	ลักษณะของถั่วเหลืองเมื่อได้รับสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. ความเข้มข้นต่างๆ	57
29	ลักษณะของข้าวเมื่อได้รับสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. ความเข้มข้นต่างๆ	58
30	ลักษณะของไมยราบยักษ์เมื่อได้รับสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. ความเข้มข้น 175 กรัม/น้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ	61
31	ผลของสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. ต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาของพืชชนิดต่างๆ	68
ภาพผนวกที่		
1	กราฟมาตรฐานของสารละลายแอมโมเนียมาตรฐาน	85
2	ปริมาณ MDA ในใบของไมยราบยักษ์เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ที่เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม หลังจากได้รับสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. และสารกำจัดวัชพืช paraquat ที่ความเข้มข้นต่างๆ	86
3	ปริมาณ MDA ในใบของหญ้าจรจบเมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ที่เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม หลังจากได้รับสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. และสารกำจัดวัชพืช paraquat ที่ความเข้มข้นต่างๆ	87
4	ปริมาณแอมโมเนียในใบของหญ้าจรจบเมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ที่เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม หลังจากได้รับสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. และสารกำจัดวัชพืช glufosinate ที่ความเข้มข้นต่างๆ	88
5	ปริมาณแอมโมเนียในใบของถั่วเหลืองเมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ที่เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม หลังจากได้รับสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. และสารกำจัดวัชพืช glufosinate ที่ความเข้มข้นต่างๆ	89
6	ปริมาณคลอโรฟิลล์เอในใบของไมยราบยักษ์เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ที่เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม หลังจากได้รับสารสกัดหยาบจาก <i>Hapalosiphon</i> sp. และสารกำจัดวัชพืช oxyfluorfen ที่ความเข้มข้นต่างๆ	90

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

MDA	malondialdehyde
ROS	reactive oxygen species
$O_2^{\cdot-}$	superoxide anion radical
H_2O_2	hydrogen peroxide
$HO^{\cdot}$	hydroxyl radical
1O_2	singlet oxygen
SOD	superoxide dismutase
$R^{\cdot}$	lipid radical
$ROO^{\cdot}$	peroxyl radical
ROOH	lipid hydroperoxide
$RO^{\cdot}$	alkoxyl radical
GS	glutamine synthetase
GOGAT	glutamine: 2-oxoglutarate aminotransferase
GDH	glutamate dehydrogenase

**ผลของสารสกัดหยาบจากไซยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon* sp. ต่อการเกิด
lipid peroxidation, ammonia assimilation และปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้อง
ในกระบวนการสังเคราะห์แสงในพืชบางชนิด**

**Effects of Crude Extract from Cyanobacterium *Hapalosiphon* sp. on
Lipid Peroxidation, Ammonia Assimilation and Photosynthetic Pigment Content
in Some Plants**

คำนำ

วัชพืชจัดเป็นศัตรูพืชที่สำคัญ และก่อให้เกิดปัญหาทางการเกษตร เนื่องจากวัชพืชเป็นคู่แข่งแย่งปัจจัยต่างๆ ที่ใช้ในการเจริญเติบโตของพืช ทั้งยังเป็นแหล่งสะสมของโรคและแมลง จึงมีความจำเป็นที่จะต้องกำจัดวัชพืชเหล่านี้ออกไปจากพื้นที่การเกษตร วิธีการป้องกันและกำจัดวัชพืชทำได้หลายวิธี เช่น การใช้แรงงานคนถอนกำจัด การป้องกันกำจัดวัชพืชโดยชีววิธี และการใช้สารเคมีกำจัดวัชพืช ซึ่งการใช้สารเคมีเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวก เกษตรกรจึงนิยมใช้ และจากรายงานการนำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตรปี 2549 ของสำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร พบว่าการนำเข้าสารกำจัดวัชพืชมีปริมาณและมูลค่ามากที่สุดเมื่อเทียบกับสารอื่น (สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, 2549) ทำให้เกิดผลเสียคือ เป็นอันตรายต่อผู้ใช้ มีสารพิษตกค้างในดิน ปนเปื้อนลงในแหล่งน้ำ เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม อีกทั้งยังสิ้นเปลืองงบประมาณในการนำเข้า ดังนั้นเพื่อที่จะลดปัญหาเหล่านี้ จึงมีแนวคิดที่จะนำสารจากธรรมชาติมาใช้แทนสารเคมี นอกจากสารจากธรรมชาติที่ได้จากพืชแล้ว ไซยาโนแบคทีเรียหลายชนิดมีความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิที่มีผลต่อกระบวนการทางชีวเคมีภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต และมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตอื่นที่เจริญอยู่ร่วมกัน (Smith and Doan, 1999; Leflaive and Ten-Hage, 2007) ด้วยเหตุนี้จึงทำให้สารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรียได้รับความสนใจในการใช้เป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อใช้ในทางการเกษตร จากการทดลองของณัฐฐา (2543) พบว่า สารสกัดหยาบจากไซยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon* sp. มีผลยับยั้งการงอก ความยาวยอด และความยาวรากของพืชบางชนิด มีผลยับยั้งการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของปลายรากหอม (ศิริพรรณ, 2550) แต่การศึกษาผลของสารสกัดหยาบต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาของพืชในระยะต้นกล้ายังมีน้อย ซึ่งกระบวนการเหล่านี้ อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้พืชตายได้ การทดลองครั้งนี้จึงนำสารสกัดหยาบจากไซยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon* sp. มาศึกษาผลของสารสกัดหยาบต่อการเกิด lipid peroxidation การสะสม

แอมโมเนียในกระบวนการ ammonia assimilation และปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืชบางชนิด และศึกษาความเสถียร (stability) ของสารสกัดหยาบ โดยพิจารณาปัจจัยที่มีผลต่อความเสถียรคือ อุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษาและระยะเวลาในการเก็บรักษา ซึ่งผลที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลเพื่อที่จะนำสารสกัดหยาบจากไซยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon* sp. ไปพัฒนาใช้เป็นสารกำจัดวัชพืชที่มาจากธรรมชาติทดแทนการใช้สารเคมี ซึ่งเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทดสอบผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อการเกิด lipid peroxidation ในวัชพืชและพืชปลูกบางชนิด
2. เพื่อทดสอบผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อกระบวนการ ammonia assimilation ในวัชพืชและพืชปลูกบางชนิด
3. เพื่อทดสอบผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสง (photosynthetic pigment) ในวัชพืชและพืชปลูกบางชนิด
4. เพื่อศึกษาความเสถียรของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp.

การตรวจเอกสาร

ลักษณะทั่วไปของไซยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon* sp.

ไซยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon* sp. จัดอยู่ใน

Division Cyanophyta

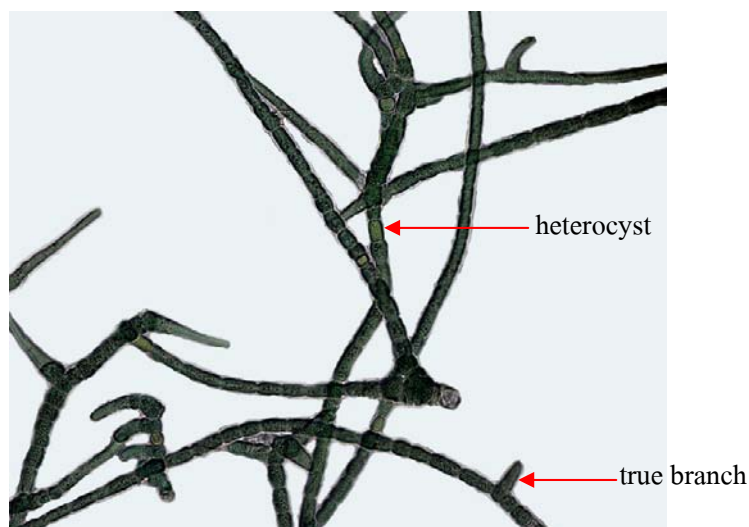
Class Cyanophyceae

Order Stigonematales

Family Stigonemataceae

Genus *Hapalosiphon*

ไซยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon* sp. (ภาพที่ 1) เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีขนาดเล็ก จำพวกโปรแคริโอต (prokaryote) เช่นเดียวกับแบคทีเรีย แต่มีความแตกต่างจากแบคทีเรียตรงที่มีคลอโรฟิลล์เอ จึงสามารถสังเคราะห์แสงได้ พบได้ทั่วไปบริเวณผิวดินที่ชื้นแฉะ กลุ่มเซลล์มีสีเขียว เขียวเหลือง หรือเขียวคล้ำ รังควัตถุประกอบด้วย chlorophyll a, β -carotene, xanthophyll หลายชนิด และ phycobilin ได้แก่ c-phycocyanin, c-allophycocyanin และ c-phycoerythrin เซลล์มีรูปร่างคล้ายถังเบียร์ (subbarrel) ทรงกระบอก และค่อนข้างกลม อยู่รวมกันรูปร่างเป็นเส้นสาย (filament) ประกอบด้วยทริโคม (trichome) ซึ่งเป็นส่วนของเซลล์เรียงกันเป็นแถวรวมกับส่วนที่เป็นชีท (sheath) โดยแต่ละสายมีเซลล์เรียงต่อกัน 1 หรือ 2 แถว ทริโคมกว้างประมาณ 3-11 ไมครอน มีขี้ทหุ้ม มีการแตกแขนงแท้ (true branch) และมีการสร้างเฮเทอโรซิสต์ (heterocyst) กลางสายเซลล์ ซึ่งเฮเทอโรซิสต์เป็นเซลล์พิเศษแตกต่างจากเซลล์ธรรมดาตรงที่เซลล์มีขนาดใหญ่ มีผนังเซลล์หนา ภายในเซลล์มีลักษณะใสเป็นสีเหลืองจางๆ ไม่มีคลอโรฟิลล์ ในไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสาย (filamentous cyanobacteria) เฮเทอโรซิสต์จะทำหน้าที่ตรึงไนโตรเจนจากอากาศและเปลี่ยนเป็นแอมโมเนียม โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase) แอมโมเนียมนี้สามารถเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโน เช่น กลูตามีน และอะลานีนได้ นอกจากนี้ยังเป็นจุดที่ทำให้เกิดการขาดท่อน แต่ละท่อนที่ขาดออกมาเรียก ฮอร์โมโกน (hormogone) ซึ่งสามารถแบ่งเซลล์และเจริญเติบโตเป็นเส้นสายใหม่ได้ (กาญจนาภรณ์, 2527; สมศักดิ์, 2530; Desikachary, 1959; Lee, 1995)



ภาพที่ 1 *Hapalosiphon* sp. กำลังขยาย 400 เท่า

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากไซยาโนแบคทีเรีย

ไซยาโนแบคทีเรียหลายชนิดมีความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่มีผลต่อกระบวนการทางชีวเคมีภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต สารเหล่านี้บางครั้งอาจถูกเรียกว่าเป็นสารประกอบอัลลิโลเคมี เนื่องจากมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตอื่นที่เจริญอยู่ร่วมกัน (Smith and Doan, 1999; Leflaive and Ten-Hage, 2007) ไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดสามารถผลิตสารพิษซึ่งทำให้เกิดพิษต่อสัตว์ได้ โดยมีผลต่ออวัยวะที่สำคัญ เช่น สารพิษที่มีผลต่อตับ (hepatotoxins) ได้แก่ สาร microcystins และ nodularins สารพิษที่มีผลต่อระบบประสาท (neurotoxins) ได้แก่ สาร anatoxins และ saxitoxins (Chorus and Bartram, 1999) นอกจากนี้ สารประกอบอัลลิโลเคมีจากไซยาโนแบคทีเรียหลายชนิดยังมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตอื่นๆ โดยเฉพาะสิ่งมีชีวิตที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ โดยมีกลไกการทำลายแตกต่างกันไป เช่น การยับยั้งการสังเคราะห์แสง การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ การทำให้เซลล์ตาย (cellular paralysis) การยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก และการชักนำให้เกิด reactive oxygen species (ROS generation) (Leflaive and Ten-Hage, 2007) ตัวอย่างเช่น สารสกัดหยาบจากไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp. ที่สกัดด้วยอีเทอร์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียหลายชนิดสำหรับสาหร่ายสีเขียวบางชนิด และพืชน้ำบางชนิด เช่น แหนใหญ่ *Spirodela polyrrhiza* (Chauhan and Bagchi, 1992) รงควัตถุสีม่วงที่มีชื่อ nostocine A จาก *Nostoc spongiaeforme* TISTR 8169 มีแนวโน้มในการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวได้ดีกว่าการยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย และยังมีผลยับยั้งการช่ียวของราก barnyard grass (Hirata et al., 2003) สาร

microcystin-RR ที่สกัดได้จากไซยาโนแบคทีเรีย *Microcystis aeruginosa* สามารถชักนำให้เซลล์ยาสูบมีการสะสม ROS มากขึ้น (Yin *et al.*, 2005) สาร fischerellin A ที่สกัดได้จาก *Fischerella muscicola* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย ยับยั้งการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนในแผ่นเล็ก *Lemna minor* และยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราบางชนิดได้ (Hagmann and Juttner, 1996) ส่วนสารสกัดหยาบจาก *Fischerella muscicola* TISTR 8215 และ *Fischerella* sp. TISTR 8975 ที่สกัดด้วยน้ำกลั่นและเมทานอล มีผลยับยั้งการงอกของเมล็ดวัชพืชและพืชปลูกบางชนิด มีผลยับยั้งการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนในปฏิกิริยา Hill reaction (วิชชา, 2549) สาร cyanobacterin จาก *Scytonema hofmanni* มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียหลายชนิด ทำให้เชื้อหุ้มโพลาคอยด์ถูกทำลาย และมีผลยับยั้งการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสง (Gleason and Paulson, 1984) นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชหลายชนิด และสามารถยับยั้งการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนในปฏิกิริยา Hill reaction (Gleason and Case, 1986) และสารสกัดหยาบด้วยเมทานอลจาก *Scytonema varium* ซึ่งมีการเจริญเติบโตอยู่ในช่วง exponential สามารถยับยั้งการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนใน PS II และสารที่สกัดด้วยน้ำและเมทานอลจากเซลล์ซึ่งมีการเจริญเติบโตอยู่ในช่วง exponential และ stationary มีผลยับยั้งการงอกของพืชบางชนิด นอกจากนี้ยังทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์ในพืชบางชนิดลดลง (พุดิตา, 2550)

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากไซยาโนแบคทีเรียสกุล *Hapalosiphon*

Bonjouklian *et al.* (1995) รายงานว่า *Hapalosiphon hibernicus* ATCC 55225 สามารถสร้างสาร Hapalindole alkaloid A89271 ชนิด B และ F ซึ่งส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและใช้รักษาเนื้องอกบางชนิด และมีรายงานว่า สารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon fontinalis* มีผลทำให้เกิด lipid peroxidation ในลำต้นและรากของผักกาดหัวและข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (อินทรา, 2548) และยังมีผลในการยับยั้งการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ยับยั้งการงอก ความยาวยอดและความยาวรากของพืชบางชนิดด้วย (ณรงค์, 2548) อีกทั้งยังสามารถยับยั้งกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของเซลล์ปลายรากหอมได้ (พหลรัฐ, 2549) และจากการทดลองของสุภาพร (2544) พบว่า สารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. สามารถยับยั้งการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงได้ และสามารถยับยั้งการงอกของถั่วเขียวและผักกวาง ยับยั้งความยาวยอดของถั่วเขียว ถั่วเหลืองและผักกวาง (เพ็ญนภา, 2547) ยับยั้งการแตกหน่อใหม่ของเห็ดหูหนู (จุฬาพันธุ์, 2549) และสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ที่สกัดด้วยน้ำความเข้มข้น 10 กรัม/น้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ทำให้ปริมาณ MDA ซึ่งเป็นผลผลิตเมื่อเกิด lipid

peroxidation ในลำต้นของต้นกล้าไมยราบยักษ์สูงกว่าชุดควบคุม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบมีผลต่อการเกิด lipid peroxidation ส่วนที่ความเข้มข้น 20 กรัม/น้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร มีผลยับยั้งการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของปลายรากหอม (ศิริพรรณ, 2550) นอกจากนี้สารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ที่สกัดด้วยเมทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ ยังมีผลยับยั้งการยืดยาวของราก ยับยั้งการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของปลายรากหอม (Sanevas *et al.*, 2006) ชักนำให้เกิดกระบวนการ lipid peroxidation และทำให้เกิดการแตกหักของสายดีเอ็นเอในปลายรากหอม (Sanevas *et al.*, 2007)

กลไกการทำลายของสารกำจัดวัชพืช (herbicide mode of action)

สารกำจัดวัชพืช หมายถึง สารเคมีที่นำมาใช้เพื่อฆ่าทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของวัชพืช การที่จะทราบว่าพืชนั้นถูกทำลายหรือถูกยับยั้งการเจริญเติบโตอย่างไรนั้น จำเป็นที่จะต้องทราบกลไกการทำลายของสารกำจัดวัชพืช (mode of action) ซึ่งเป็นลำดับขั้นตอนหลังจากที่พืชได้รับสารกำจัดวัชพืชแล้ว สารจะมีผลยับยั้งกระบวนการทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของพืชอย่างไร และควรทราบถึงตำแหน่งที่สารแสดงปฏิกิริยาในการยับยั้งหรือทำลาย (target site) ซึ่งกลไกการทำลายของสารกำจัดวัชพืชแต่ละชนิดนั้นแตกต่างกัน โดยจะมีผลต่อกระบวนการที่สำคัญต่างๆ ภายในพืช (ทศพล, 2545; Devine *et al.*, 1993) เช่น

1. การทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ โดยทั่วไปสารในกลุ่มที่มีฤทธิ์ในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์นี้จะมี การเคลื่อนย้ายในเนื้อเยื่อพืชได้ค่อนข้างจำกัด หลังจากที่ได้รับสารสัมผัสทางใบ จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอนุมูลของสารประกอบ ทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อพืช และเมื่อเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายทำให้มีการเคลื่อนย้ายของสารประกอบภายในเซลล์ไหลออกสู่ช่องว่างภายนอกเซลล์และบริเวณรอบๆ เนื้อเยื่อพืช ทำให้ใบเหี่ยวแห้ง และต่อมาเมื่อน้ำที่ไหลออกนอกเซลล์ระเหยออกจากเนื้อเยื่อพืชจะทำให้เกิดอาการแห้งและซีด ยกตัวอย่างสารในกลุ่ม bipyridiliums เช่น paraquat ซึ่งสามารถถูกรีดิวซ์โดย ferredoxin ที่บริเวณ photosystem I เกิดเป็น paraquat radical และทำปฏิกิริยากับโมเลกุลออกซิเจนเกิดเป็น superoxide anion radical ($O_2^{\cdot -}$) ซึ่งเป็นโมเลกุลที่สามารถชักนำให้เกิด lipid peroxidation และทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียหายได้ นอกจากนี้สารในกลุ่ม bipyridiliums ยังมีสารในกลุ่ม diphenylethers และ oxadiazoles

2. การยับยั้งการสังเคราะห์กรดอะมิโน โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดอะมิโน ทำให้ปริมาณกรดอะมิโนลดลง มีผลต่อการสังเคราะห์โปรตีนที่จำเป็น

สำหรับการเจริญเติบโตให้เป็นปกติ โดยทั่วไปการสังเคราะห์กรดอะมิโนในพืชชั้นสูงนั้นมีเอนไซม์ 3 ชนิดที่เกี่ยวข้องและจะถูกยับยั้งดังนี้

2.1 ยับยั้งการสังเคราะห์กรดอะมิโนที่เป็นอะโรมาติก (aromatic amino acids) โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase (EPSP synthase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ใน shikimate pathway เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดอะมิโนพวกอะโรมาติกที่จำเป็น ได้แก่ phenylalanine, tryptophan และ tyrosine สารกำจัดวัชพืชที่ยับยั้งการสังเคราะห์กรดอะมิโนเหล่านี้ ได้แก่ สาร glyphosate และ glyphosate analogues เป็นต้น

2.2 ยับยั้งการสังเคราะห์กรดอะมิโนที่เป็นลูกโซ่ (branched chain amino acids) โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetolactate synthase (ALS) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดอะมิโนที่เป็นลูกโซ่ ได้แก่ valine, leucine และ isoleucine สารกำจัดวัชพืชที่ยับยั้งการสังเคราะห์กรดอะมิโนเหล่านี้ ได้แก่ สารในกลุ่ม sulfonylureas และ imidazolinones เป็นต้น

2.3 ยับยั้งการสังเคราะห์กรดอะมิโนกลูตามีน โดยยับยั้งการทำงานของ glutamine synthetase (GS) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนรูปสารประกอบอินทรีย์แอมโมเนีย (NH_3) ให้เป็นกลูตามีนซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ในโตรเจน กระบวนการนี้เรียกว่า ammonia assimilation การยับยั้งการทำงานของ GS ทำให้มีแอมโมเนียสะสมในพืช และเป็นสาเหตุให้พืชตาย สารกำจัดวัชพืชที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้คือ สารในกลุ่ม phosphinic acids ได้แก่ สาร glufosinate และ bialaphos เป็นต้น

3. การยับยั้งการสังเคราะห์รงควัตถุ โดยสารมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ และแคโรทีนอยด์ ตัวอย่างเช่น สาร fluridone, diflufenican และ dichlormate เป็นต้น สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ desaturase ที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ และสารกลุ่ม diphenylethers เช่น acifluorfen, nitrofen และ oxyfluorfen เป็นต้น มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ protoporphyrinogen oxidase ที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ และในสภาพที่มีแสงยังทำให้เกิดออกซิเจนในรูปที่เป็นพิษกับพืชที่เรียกว่า singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) ด้วย การยับยั้งการสังเคราะห์รงควัตถุเหล่านี้มีผลลดประสิทธิภาพของการสังเคราะห์แสง และเมื่อแคโรทีนอยด์ถูกยับยั้งจะทำให้คลอโรฟิลล์ถูกทำลายด้วยแสง (photooxidation) มีผลทำให้พืชแสดงอาการการฟอกขาวซีด (bleaching) ต่อมากระบวนการต่างๆ ภายในต้นพืชจะถูกทำลาย พืชจะแสดงอาการเหี่ยวแห้งและตายในที่สุด

Lipid peroxidation

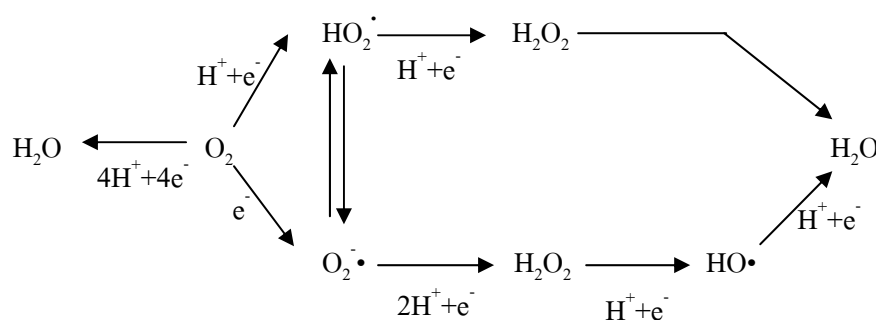
Lipid peroxidation เป็นกระบวนการที่ไขมัน (lipid) ถูกทำลาย เมื่อเกิด oxidative stress ซึ่งเป็นความเครียดที่เกิดจากโมเลกุลของ reactive oxygen species (ROS) โดยโมเลกุลเหล่านี้จะไปออกซิไดซ์ polyunsaturated fatty acid ในเซลล์ เป็นสาเหตุให้เกิดการเสื่อมสภาพของเซลล์ และทำให้เซลล์ตาย (Inze' and Montagu, 2002)

ชนิดของ reactive oxygen species และแหล่งที่เกิด

Reactive oxygen species เป็นโมเลกุลของออกซิเจนที่มีความสามารถในการออกซิไดซ์สูง ได้แก่ superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical ($HO^{\cdot}$) และ singlet oxygen (1O_2) โมเลกุลเหล่านี้สามารถเกิดขึ้นได้ในหลายออร์แกเนลล์ (organelles) ในพืช โดย superoxide anion radical ซึ่งเป็นผลผลิตตัวแรกในปฏิกิริยารีดักชันของ ground state-oxygen เกิดขึ้นในคลอโรพลาสต์ที่ PS I โดยออกซิเจนไปแย่งรับอิเล็กตรอนจาก ferredoxin และที่ PS II ในช่วงที่เกิดการแตกตัวของน้ำเพื่อให้ได้อิเล็กตรอนและออกซิเจน และในไมโทคอนเดรียขณะที่มีการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอน ส่วน hydrogen peroxide ซึ่งไม่จัดเป็นอนุมูลอิสระ แต่เป็นตัวออกซิไดซ์และตัวรีดิวซ์ในปฏิกิริยาระดับเซลล์หลายชนิด มีความสามารถในการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มและส่วนที่เป็นของเหลวได้ ก่อนข้างเสถียรและมีพิษน้อยกว่า ROS ชนิดอื่น เกิดขึ้นในไมโทคอนเดรียและคลอโรพลาสต์ขณะที่มีการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอน และในเพอรอกซิโซมระหว่างการเกิด photorespiration สำหรับ hydroxyl radical ซึ่งเป็น ROS ที่มีความสามารถในการออกซิไดซ์สูงสุด เกิดขึ้นในไมโทคอนเดรียและคลอโรพลาสต์ เมื่อมีไอออนของโลหะทรานซิชันคือ เหล็กและทองแดง ซึ่งจะเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน superoxide anion radical และ hydrogen peroxide ไปเป็น hydroxyl radical และสำหรับ singlet oxygen จะเกิดขึ้นในคลอโรพลาสต์ เมื่อออกซิเจนได้รับพลังงานที่ปล่อยออกมาจาก chlorophyll ที่ถูกกระตุ้นซึ่งเกิดขึ้นได้ทั้งใน PSI และ PSII (Inze' and Montagu, 2002)

อาจกล่าวได้ว่าคลอโรพลาสต์ (chloroplast) เป็นบริเวณที่สำคัญของการเกิด ROS ในพืช ซึ่ง ROS แต่ละชนิด มีความสัมพันธ์กัน โดยเมื่อโมเลกุลของออกซิเจน (O_2) ได้รับอิเล็กตรอนจะเปลี่ยนเป็น superoxide anion radical และจะถูกเปลี่ยนเป็น hydrogen peroxide โดยเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) และ hydrogen peroxide นี้สามารถเปลี่ยนรูปไปเป็น hydroxyl radical

และน้ำต่อไป หรือเมื่อโมเลกุลของออกซิเจนได้รับโปรตอนและอิเล็กตรอน จะเปลี่ยนเป็น hydroperoxyl ซึ่งสามารถเปลี่ยนรูปต่อไปเป็น hydrogen peroxide และน้ำได้เช่นเดียวกัน (ภาพที่ 2)

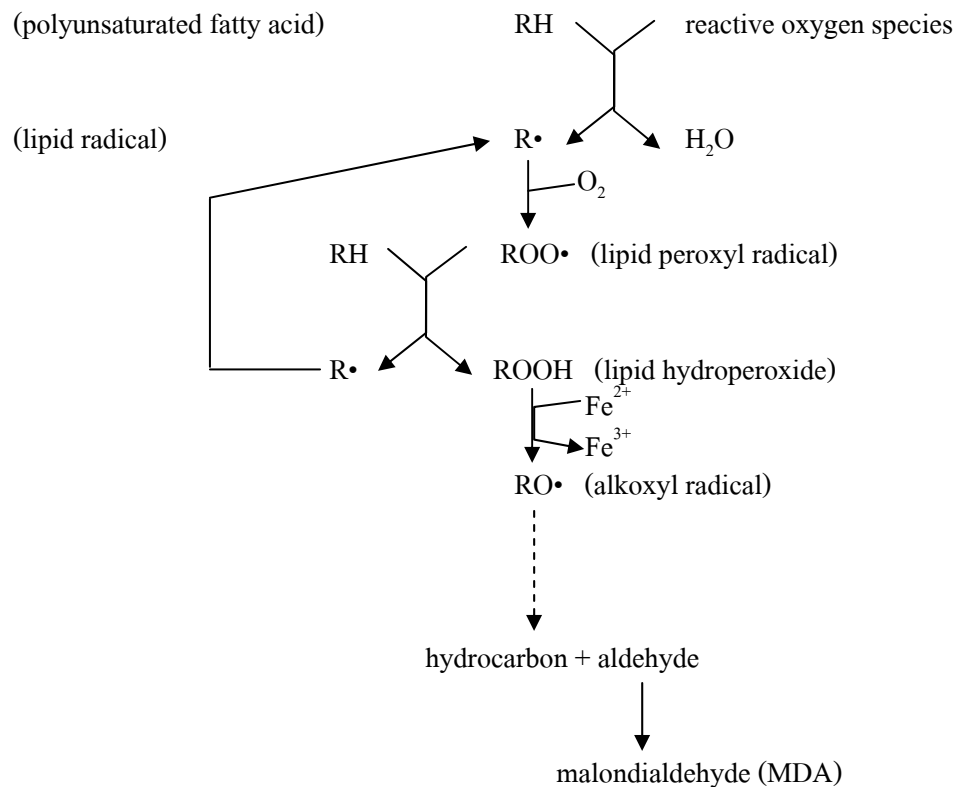


ภาพที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างออกซิเจนและ ROS

ที่มา: Baskin and Salem (1997)

กลไกการเกิด lipid peroxidation ในพืช

กระบวนการเกิด lipid peroxidation ในพืชเริ่มจาก reactive oxygen species เช่น hydroxyl radical ($HO^\bullet$) ไปออกซิไดซ์ polyunsaturated fatty acids (ภาพที่ 3) โดยทำปฏิกิริยาที่หมู่ methylene ($-CH_2-$) เกิดเป็น lipid radical ($R^\bullet$) กับน้ำ ซึ่ง lipid radical ($R^\bullet$) เป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและจะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนเกิดเป็น peroxy radical ($ROO^\bullet$) ซึ่งไม่เสถียร สามารถทำปฏิกิริยากับ polyunsaturated fatty acids ตัวต่อไป ได้เป็น lipid hydroperoxide ($ROOH$) และ lipid radical ซึ่งสามารถไปรวมกับออกซิเจนตัวต่อไป เกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ต่อเนื่องไปเรื่อยๆ ในขั้นตอนสุดท้าย ซึ่งเป็นขั้นตอนที่จะยับยั้งปฏิกิริยาต่อเนื่องของอนุมูลอิสระเหล่านี้ โดยการทำให้เกิดเป็น non-radical species ซึ่งโดยปกติในสิ่งมีชีวิต เมื่อมีไอออนของเหล็ก (Fe^{2+}) lipid hydroperoxide จะเปลี่ยนเป็น alkoxyl radical ($RO^\bullet$) และจะเกิดปฏิกิริยาต่อไปหลายปฏิกิริยาจนกระทั่งได้เป็น hydrocarbons และ aldehydes (ภาพที่ 3) โดย aldehydes ที่สำคัญคือ malondialdehyde (MDA) ซึ่งใช้เป็นดัชนีชี้วัดการเกิด lipid peroxidation (Halliwell and Gutteridge, 1999; Hodge *et al.*, 1999)



ภาพที่ 3 กลไกการเกิด lipid peroxidation ในพืช
ที่มา: ดัดแปลงจาก Halliwell and Gutteridge (1999)

สารสกัดจากธรรมชาติและสารเคมีที่มีผลต่อการเกิด lipid peroxidation

สารสกัดหยาบจากไซยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon fontinalis* ที่สกัดด้วยน้ำกลั่นมีผลทำให้เกิดกระบวนการ lipid peroxidation ในลำต้นและรากของไมยราบยักษ์ (อินทรา, 2548) นอกจากนี้สารเคมีบางชนิดมีผลต่อกระบวนการ lipid peroxidation เช่น abscisic acid (ABA) ความเข้มข้น 10 และ 20 ไมโครโมลาร์ ทำให้ปริมาณ superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$) และ hydrogen peroxide (H_2O_2) ในใบของต้นกล้าข้าวโพดเพิ่มขึ้น ซึ่งส่งผลทำให้เกิด lipid peroxidation เพิ่มขึ้น (Jiang and Zhang, 2001) และสาร atrazine ซึ่งเป็นสารกำจัดวัชพืชที่สามารถยับยั้งการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนในคลอโรพลาสต์เป็นสาเหตุให้เกิด ROS และมีผลทำให้เกิดกระบวนการ lipid peroxidation ใน *Arabidopsis thaliana* ได้ (Ivanov *et al.*, 2005) ส่วนใน *Pisum sativum* L. cv Lincoln ที่ได้รับสารกำจัดวัชพืช paraquat ทำให้การสังเคราะห์แสง ปริมาณโปรตีน และสารต้านอนุมูลอิสระลดลง และทำให้มีการสะสม zeaxanthin และโปรตีนที่ถูกทำลาย ซึ่งเหล่านี้อาจเป็นผลมาจากการเกิด lipid peroxidation (Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 1998)

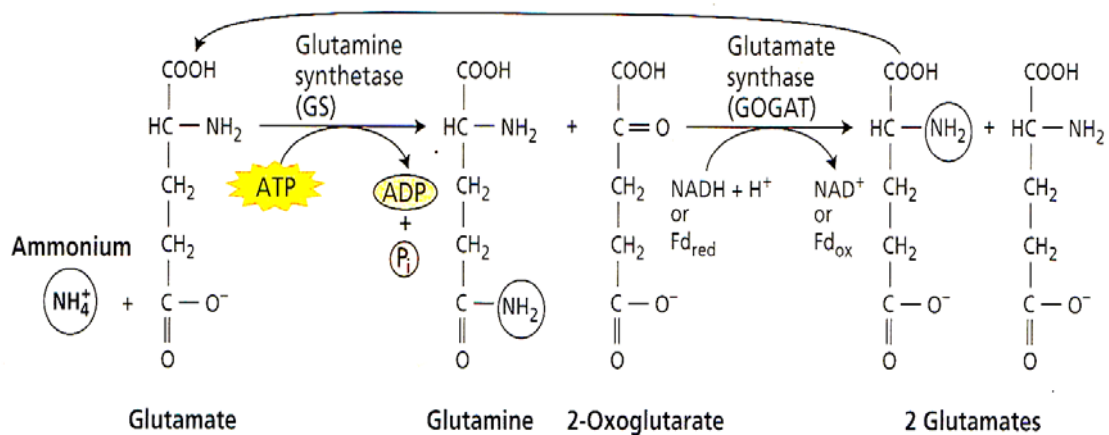
Ammonia assimilation

Ammonia assimilation เป็นกระบวนการเปลี่ยนแอมโมเนีย ซึ่งเป็นสารประกอบอนินทรีย์ไนโตรเจนให้เป็นการคอะมิโนซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจน ในเซลล์พืชนั้นพบแอมโมเนีย (NH_3) หรือแอมโมเนียมไอออน (NH_4^+) ซึ่งเกิดจากกระบวนการ nitrogen fixation, photorespiration หรือได้จากดิน โดยแอมโมเนียมไอออนจะมีผลต่อการสร้างพลังงานของเซลล์ แม้มีในปริมาณน้อยก็สามารถยับยั้งการสร้าง ATP จากการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนในไมโทคอนเดรียและคลอโรพลาสต์ ถ้ามีการสะสมแอมโมเนียมไอออนมากเกินไปจะทำให้พืชตายได้ ดังนั้นพืชจึงหลีกเลี่ยงความเป็นพิษของแอมโมเนียมไอออน โดยเปลี่ยนแอมโมเนียมไอออนหรือแอมโมเนียให้เป็นการคอะมิโนผ่านทางกระบวนการ ammonia assimilation ซึ่งมี 2 pathway คือ

1. อาศัยการทำงานของเอนไซม์ 2 ชนิด คือ glutamine synthetase (GS) ซึ่งพบในคลอโรพลาสต์และ cytosol ของเซลล์ใบและของเซลล์ราก และ glutamate synthase (GOGAT หรือ glutamine: 2-oxoglutarate aminotransferase) พบในคลอโรพลาสต์ของเซลล์ใบ และในพลาสติดของเซลล์ราก เริ่มจากแอมโมเนียทำปฏิกิริยากับกลูตาเมต (glutamate) โดยเอนไซม์ GS ได้กลูตามีน (glutamine) ซึ่งปฏิกิริยานี้ต้องการ ATP ส่วนกลูตามีนที่เพิ่มขึ้นจะไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ GOGAT ซึ่งทำหน้าที่เคลื่อนย้ายหมู่ amide จากกลูตามีนให้กับ 2-oxoglutarate ให้เป็นกลูตาเมต 2 โมเลกุล โดยมีสารที่ให้อิเล็กตรอนคือ ferredoxin (ในเซลล์ที่มีการสังเคราะห์แสง) หรือ NADH (ในเซลล์ที่ไม่มีการสังเคราะห์แสง) (ภาพที่ 4)

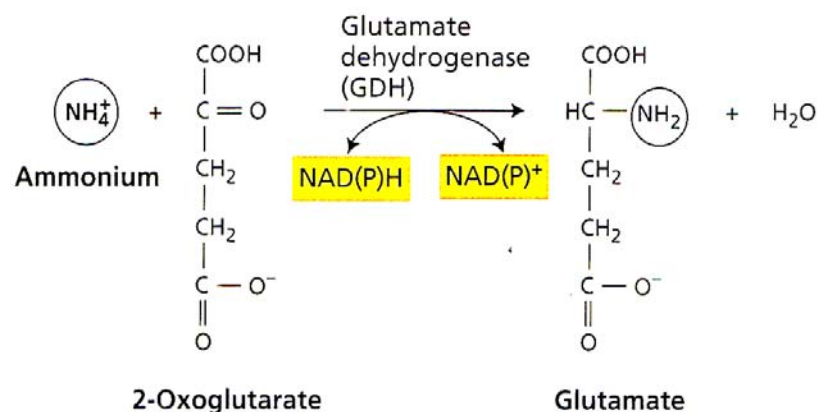
2. อาศัยเอนไซม์ glutamate dehydrogenase (GDH) ซึ่งพบทั้งในคลอโรพลาสต์และไมโทคอนเดรีย โดยเร่งปฏิกิริยาการรวมกันของแอมโมเนียกับ 2-oxoglutarate เปลี่ยนไปเป็นกลูตาเมต สารที่ให้อิเล็กตรอนคือ NADPH หรือ NADH (ภาพที่ 5)

จากการศึกษาพบว่า pathway ที่สำคัญในกระบวนการ ammonia assimilation คือ pathway ที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ GS/GOGAT เนื่องจาก GS มีความสามารถในการทำปฏิกิริยา (affinity) กับแอมโมเนียสูงมาก (ศรีสม, 2549ข; Hopkins, 1999; Taiz and Zeiger, 2002)



ภาพที่ 4 กระบวนการ ammonia assimilation โดยเอนไซม์ GS/GOGAT

ที่มา: Tiaz and Zeiger (2002)



ภาพที่ 5 กระบวนการ ammonia assimilation โดยเอนไซม์ GDH

ที่มา: Tiaz and Zeiger (2002)

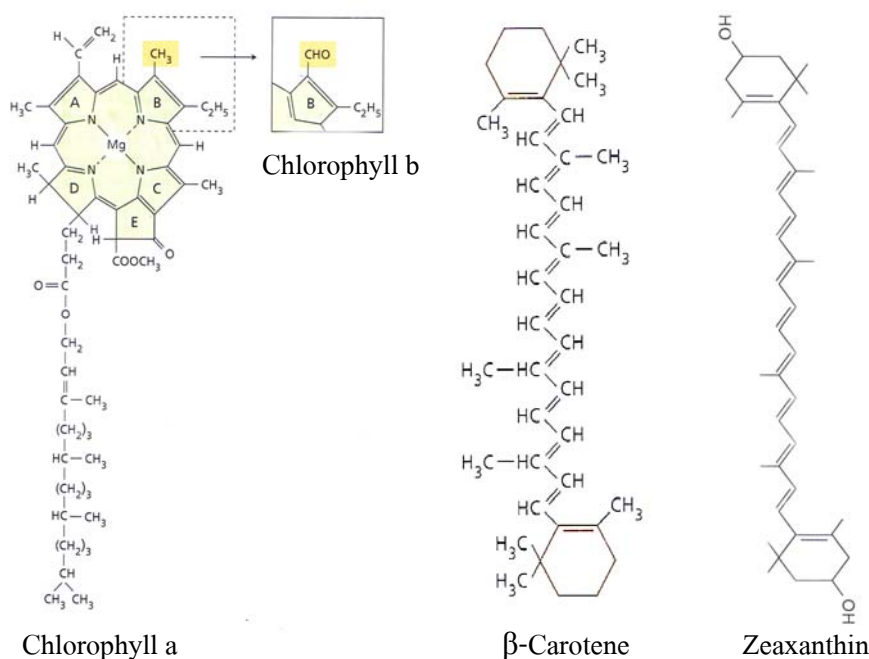
สารสกัดจากธรรมชาติและสารเคมีที่มีผลต่อกระบวนการ ammonia assimilation

สารสกัดหยาบจากไซยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon fontinalis* ที่สกัดด้วยน้ำ ความเข้มข้น 100 กรัม/น้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ทำให้มีการสะสมแอมโมเนียในลำต้นและรากของไมยราบยักษ์ หญ้าหาง หูฝรั่งนก และข้าวพันธุขาวดอกมะลิ 105 เพิ่มขึ้น ส่วนสารที่สกัดด้วยเมทานอลทำให้ปริมาณแอมโมเนียเพิ่มขึ้นเฉพาะในรากไมยราบยักษ์ และลำต้นของผักกาดเขียวปลี (อินทรา, 2550) และการทดลองของ Lin and Kao (1996) พบว่าโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของราก โดยกระตุ้นให้มีการสะสมแอมโมเนียในรากของต้นกล้าข้าว และทำให้กิจกรรมของ

เอนไซม์ glutamine synthetase และ glutamate synthase ลดลง แต่ส่งผลให้กิจกรรมของ glutamate dehydrogenase เพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับเมื่อต้นกล้าได้รับ ammonium chloride หรือ methionine sulfoximine (MSO) นอกจากนี้สาร glufosinate มีผลลดกิจกรรมของเอนไซม์ glutamine synthetase และทำให้ปริมาณแอมโมเนียในใบของ *Amaranthus palmeri* เพิ่มขึ้น (Coetzer and Al-Khatib, 2001) และ Wendler *et al.* (1990) ได้ศึกษาเปรียบเทียบผลของ glufosinate ต่อพืช C3 (*Sinapis alba*) และพืช C4 (*Zea mays*) พบว่า ทำให้เกิดการสะสมแอมโมเนียมไอออนในพืช C3 มากกว่าในพืช C4

รงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสง (photosynthetic pigments)

พืชมีรงควัตถุชนิดต่างๆ ที่มีความสามารถในการดูดซับพลังงานแสงสำหรับนำไปใช้ในการเปลี่ยนคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ให้เป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรต ซึ่งรงควัตถุสำหรับการสังเคราะห์แสงประกอบด้วยรงควัตถุที่สำคัญ (primary pigment) คือ คลอโรฟิลล์เอ (chlorophyll a) (ภาพที่ 6) ซึ่งเป็นรงควัตถุที่มีสีเขียวอมน้ำเงิน และดูดซับพลังงานแสงได้ดีที่สุดที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร (แสงสีน้ำเงิน) และ 662 นาโนเมตร (แสงสีแดง) และรงควัตถุประกอบ (accessory pigment) ซึ่งเป็นรงควัตถุชนิดอื่น ที่ช่วยดูดซับพลังงานแสงในช่วงความยาวคลื่นที่คลอโรฟิลล์เอไม่สามารถดูดซับได้ ได้แก่ คลอโรฟิลล์บี (chlorophyll b) (ภาพที่ 6) เป็นรงควัตถุที่มีสีเขียวอมเหลือง และดูดซับพลังงานแสงได้ดีที่สุดที่ความยาวคลื่น 454 และ 643 นาโนเมตร และแคโรทีนอยด์ (carotenoids) ซึ่งเป็นรงควัตถุที่มีสีแดง ส้ม เหลือง หน้าที่สำคัญของแคโรทีนอยด์คือ ช่วยป้องกันไม่ให้แสงทำลายคลอโรฟิลล์ (photooxidation) แคโรทีนอยด์แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ แคโรทีน (carotenes) เป็นแคโรทีนอยด์ที่พบมากในพืช มีสีส้มหรือส้มอมแดง ตัวอย่างเช่น β -carotene และ α -carotene อีกชนิดหนึ่งคือ แซนโทฟิลล์ (xanthophyll) โดยทั่วไปมีสีเหลือง แซนโทฟิลล์เกิดจากการออกซิไดซ์แคโรทีน ตัวอย่างเช่น lutein และ zeaxanthin (ภาพที่ 6) (ศรีสม, 2549ก; Taiz and Zeiger, 2002)



ภาพที่ 6 โครงสร้างของรงควัตถุที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง
ที่มา: Taiz and Zeiger (2002)

สารสกัดจากธรรมชาติและสารเคมีที่มีผลต่อปริมาณรงควัตถุในกระบวนการสังเคราะห์แสง

สารสกัดหยาบจากไซยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon fontinalis* ที่สกัดด้วยน้ำ ความเข้มข้น 100 กรัม/น้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร มีผลทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ของไมยราบ ยักษ์ลดลง ส่วนสารที่สกัดด้วยเมทานอล มีแนวโน้มทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ของ ผักกาดเขียวปลีลดลง (อินทรา, 2550) Batish *et al.* (2004) ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากใบของ *Eucalyptus citriodora* ต่อปริมาณคลอโรฟิลล์ของ *Cassia occidentalis* และ *Echinochloa crus-galli* โดยฉีดพ่นน้ำมันหอมระเหยความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ไปที่พืชที่มีอายุ 1 เดือน พบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดลดลงมากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ และสาร phenolic acids ที่แยกได้จาก ชังอ้อย (sugar-cane straw) ทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบเลี้ยงของผักกาดหอม *Lactuca sativa* L. ลดลง เมื่อความเข้มข้นของสารเพิ่มขึ้น (Sampietro *et al.*, 2006) นอกจากนี้สารกำจัดวัชพืช diuron, fluridone และ sulcotrione มีผลทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ในใบเลี้ยงของแตงกวา *Cucumis sativus* L. ลดลง (Kim *et al.*, 2002)

การทดสอบความเสถียร (stability) ของสารสกัดหยาบ

นอกจากการพิจารณาศักยภาพของสารสกัดจากธรรมชาติในการพัฒนาเป็นสารควบคุมหรือกำจัดวัชพืชแล้ว สิ่งที่ต้องคำนึงถึงเพื่อใช้เป็นแนวทางในการพิจารณา คือ การศึกษาความเสถียร (stability) หรืออายุการเก็บรักษา (shelf-life) (อัญชลี, 2551; Haig *et al.*, 2005) ปัจจัยที่มีผลต่อความเสถียรของสารสกัดได้แก่ อุณหภูมิ และระยะเวลาในการเก็บรักษา โดย Haig *et al.* (2005) ทดสอบความเสถียรของสารสกัดหยาบจากพืชท้องถิ่นของออสเตรเลีย (Australian native) ชนิดหนึ่งซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งความยาวรากของ annual ryegrass โดยเปรียบเทียบอุณหภูมิในการเก็บรักษาสารสกัด คือ 4 และ 25 °C และระยะเวลาในการเก็บรักษา 2, 4, 8, 16 และ 32 วันหลังจากสกัดสาร พบว่า ระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นทำให้ความยาวรากของ annual ryegrass ถูกยับยั้งมากขึ้น และเมื่อเก็บสารสกัดที่ 4 °C นาน 32 วัน จะมีผลยับยั้งความยาวรากได้น้อยลง อุไรวรรณ (2544) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชในการควบคุมโรคเหี่ยวจากแบคทีเรียของมะเขือเทศ โดยนำไปพืชทดสอบที่แห้งและบดเป็นผงแล้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง เก็บไว้นาน 1, 2, 3, 4, 5 และ 8 เดือน จึงนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ พบว่าอุณหภูมิในการเก็บรักษาให้ผลไม่แตกต่างกัน ส่วนระยะเวลาในการเก็บรักษามีผลต่อประสิทธิภาพของสารสกัด การทดลองของ Chansang *et al.* (2005) พบว่าสารสกัดหยาบจากคิปลี (*Piper retrofractum* Vahl) ที่สกัดด้วยน้ำและเก็บไว้เป็นระยะเวลานาน 2, 4 และ 8 วัน จะทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดลูกน้ำยุงได้ลดลง และพบว่าการเก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จะทำให้ประสิทธิภาพของสารลดลงมากกว่าเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และจากการทดลองของ deMaria *et al.* (1995) พบว่าสาร sennosides ในสารสกัดจาก senna ที่สกัดด้วยน้ำ จะมีการสลายตัวอย่างช้าๆ เมื่อเก็บไว้นานขึ้น แต่จะมีการสลายตัวเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษาสูงขึ้น นอกจากนี้แสงอาจมีผลต่อความเสถียรของสารสกัดด้วย เช่น Gouveia and Empis (2003) ทดสอบความเสถียรของสารสกัดแคโรทีนอยด์จาก *Chlorella vulgaris* และ *Haematococcus pluvialis* ที่สกัดด้วยอะซิโตน พบว่า เมื่อเก็บรักษาสารสกัดที่อุณหภูมิห้องในที่ที่มีแสงทำให้ปริมาณแคโรทีนอยด์ลดลงและหมดไปในระหว่างวันที่ 15 และ 30 วันหลังจากการสกัด

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ไชยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon* sp. ที่บริสุทธิ์ซึ่งเก็บมาจากผิวน้ำดินที่ขึ้นและในบริเวณเรือนเพาะชำภาควิชาพฤกษศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน (ณัฐา, 2543)

2. เมล็ดพืชที่ใช้ทดลอง ได้แก่

เมล็ดไมยราบยักษ์ (giant mimosa: *Mimosa pigra* L.)

เมล็ดหญ้าจรจบ (feather pennisetum: *Pennisetum polystachyon* Schult.)

เมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 (soybean: *Glycine max* L.)

เมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (rice: *Oryza sativa* L. cv. Khao Dawk Mali 105)

3. สารเคมี ได้แก่

สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงไชยาโนแบคทีเรีย สูตร BG-11 (Rippka *et al.*, 1979) (ตารางผนวกที่ 1)

สารเคมีสำหรับทดสอบการเกิด lipid peroxidation โดยวิธีวัดปริมาณ MDA (Velikova *et al.*, 2000)

สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียในกระบวนการ ammonia assimilation (Weatherburn, 1967)

สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสง คือ dimethyl sulfoxide (DMSO)

4. เครื่องมือต่างๆ ได้แก่ เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) เครื่องปั๊มอากาศ เครื่องเขย่า หม้อนึ่งความดัน (autoclave) ตู้อบ ไก่รงบด เครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียด water bath เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

วิธีการ

การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon* sp.

นำไซยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon* sp. ที่บริสุทธิ์แล้ว เลี้ยงในโหลแก้วปากกว้างความจุ 4 ลิตร ที่บรรจุอาหารเหลวสูตร BG-11 ระดับ pH 9.0 ที่นิ่งมาเชื้อแล้ว ประมาณ 3 ลิตร เมื่อครบเวลา 14 วัน เก็บเซลล์และนำมาปั่นให้กลุ่มเซลล์แยกจากกันเพื่อทำเป็นสต็อกสำหรับการเลี้ยงแบบเพิ่มปริมาณ โดยนำกลุ่มเซลล์ที่แยกจากกันนี้ เลี้ยงในบ่อพลาสติกสีขาวขนาด 30 x 50 x 30 เซนติเมตร ความจุ 45 ลิตร ที่บรรจุอาหารเหลวสูตร BG-11 ระดับ pH 9.0 ที่ไม่ได้ผ่านการนิ่งมาเชื้อ ปริมาตร 30 ลิตร โดยให้ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นมีค่า optical density เมื่อวัดด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 และทำให้น้ำมีการหมุนวนโดยใช้ปั๊มน้ำที่มีแรงดัน 1.8 เมตร กำลัง 25 วัตต์ ปิดปากบ่อด้วยแผ่นพลาสติกบางใสเพื่อลดการปนเปื้อน วางบ่อไว้บนชั้นที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้อุณหภูมิแสงเฉลี่ย 300 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที

การเตรียมสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp.

นำ *Hapalosiphon* sp. ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบบเพิ่มปริมาณเป็นระยะเวลา 22 วัน ซึ่งมีการเจริญเติบโตอยู่ในช่วง stationary กรองด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้น นำเซลล์ที่ได้ไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักแห้งคงที่ บดเซลล์แห้งที่ได้ให้ละเอียดด้วยโกร่งบด สกัดสารด้วยน้ำกลั่น โดยชั่งน้ำหนักเซลล์แห้งแล้วนำมาแช่ในน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 75, 125 และ 175 กรัม น้ำหนักแห้งเซลล์ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง นำไปกรองเอาเซลล์ออก จะได้สารสกัดหยาบซึ่งนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาของพืช

ศึกษาผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาของพืช ได้แก่ การเกิด lipid peroxidation, ammonia assimilation และปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสง โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design: CRD) จัดสิ่งทดลอง (treatment) คือ ความเข้มข้นของสารสกัดเป็น 4 ระดับ ได้แก่ 0, 75, 125 และ 175 กรัม/น้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ชุดควบคุมคือ ตัวอย่างพืชที่ไม่ได้รับสารสกัด ทำการทดลองความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

ปลูกพืชทดสอบ (ไมยราบยักษ์ หนุ่ยขจรจบ ถั่วเหลือง หรือข้าว) โดยนำเมล็ดพืชเพาะลงในกระถางที่บรรจุดินผสมสำเร็จ (ไมยราบยักษ์ใช้ 70 เมล็ดต่อกระถาง หนุ่ยขจรจบใช้ 100 เมล็ดต่อกระถาง ถั่วเหลืองใช้ 15 เมล็ดต่อกระถาง และข้าวใช้ 70 เมล็ดต่อกระถาง) เมื่อครบระยะเวลา 5 วัน หลังปลูกสำหรับไมยราบยักษ์และหนุ่ยขจรจบ และ 7 วันหลังปลูกสำหรับถั่วเหลืองและข้าว นิฉิน สารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ไปที่บริเวณใบและส่วนเหนือดินของพืช โดยนิฉินกระถางละ 10 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง แต่ครั้งห่างกันเป็นระยะเวลา 3 วัน โดยครั้งสุดท้ายที่นิฉินสารสกัดหยาบทิ้งระยะเวลา 2 วัน บันทึกลักษณะอาการผิดปกติของพืช แล้วจึงเก็บต้นพืชไปวิเคราะห์การเกิดกระบวนการต่างๆ

1.1 ศึกษาผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อการเกิด lipid peroxidation

นำพืชทดสอบที่ได้รับสารสกัดหยาบตามวิธีข้างต้นแล้ว มาล้างน้ำให้สะอาด จากนั้นตัดแยกส่วนใบและราก เพื่อทดสอบการเกิด lipid peroxidation โดยวัดปริมาณ malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นดัชนีชี้วัดการเกิด lipid peroxidation โดยดัดแปลงจากวิธีของ Velikova *et al.* (2000) โดยใช้น้ำหนักพืชสด 0.5 กรัม บดให้ละเอียดด้วยโกร่งบดโดยไนโตรเจนเหลว ใส่สารละลาย trichloroacetic acid (TCA) ความเข้มข้น 0.1% (w/v) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 xg เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำสารละลายส่วนบน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเติม thiobarbituric acid (TBA) ความเข้มข้น 0.5% (w/v) ใน TCA ความเข้มข้น 20% (w/v) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นแช่ในน้ำอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และนำออกมาแช่ในน้ำแข็งทันที 5 นาที ถ้ามีตะกอนนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ 5,000 xg นาน 5 นาที

นำสารละลายส่วนบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 532 และ 600 นาโนเมตร นำมาคำนวณหาปริมาณ MDA จากสูตร

$$\text{ปริมาณ MDA } (\mu\text{mol/g FW.}) = \left[\frac{A_{532} - A_{600}}{155 \times 1} \times V_f \times \frac{V_e}{V_a} \right] \div W$$

A_{532} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร

A_{600} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

V_f = ปริมาตรสุดท้าย (มิลลิลิตร)

V_e = ปริมาตร TCA ที่ใช้ในการสกัด (มิลลิลิตร)

V_a = ปริมาตรสารละลายตัวอย่างพืชที่ใช้ในการวิเคราะห์ (มิลลิลิตร)

W = น้ำหนักตัวอย่างพืช (กรัม)

บันทึกค่าปริมาณ MDA ในส่วนใบและราก แล้วนำไปวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ

1.2 ศึกษาผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อกระบวนการ ammonia assimilation

นำพืชทดสอบที่ได้รับสารสกัดหยาบตามวิธีข้างต้นแล้ว มาล้างน้ำให้สะอาด จากนั้นตัดแยกส่วนใบและราก เพื่อวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย โดยชั่งตัวอย่างพืชหนัก 2 กรัม บดด้วยไนโตรเจนเหลว เติมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 6 มิลลิลิตร และกรดซัลโฟซาลิไซลิก 0.18 กรัม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที (rpm) นาน 15 นาที นำสารละลายใส (supernatant) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เติมสารละลาย A ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และเติมสารละลาย B ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร และนำไปหาความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐาน โดยใช้สารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) เป็นสารละลายมาตรฐาน (ภาพผนวกที่ 1)

หมายเหตุ: สารละลาย A ประกอบด้วยฟีนอล 1 กรัม และโซเดียมไนโตรพรัสไซด์ 5 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

สารละลาย B ประกอบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 กรัม และโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 0.84 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

คำนวณหาปริมาณแอมโมเนีย จากสูตร

$$\text{ปริมาณแอมโมเนียในตัวอย่างพืช (ppm)} = \frac{C \times V_f \times V_e}{W \times V_a}$$

C = ความเข้มข้นแอมโมเนียจากกราฟมาตรฐาน (ppm)

V_f = ปริมาตรสุดท้าย (มิลลิลิตร)

V_e = ปริมาตรกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการสกัด (มิลลิลิตร)

W = น้ำหนักตัวอย่างพืช (กรัม)

V_a = ปริมาตรสารละลายตัวอย่างพืชที่ใช้ในการวิเคราะห์ (มิลลิลิตร)

(Weatherburn, 1967)

บันทึกค่าปริมาณแอมโมเนียในส่วนใบและราก แล้วนำไปวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ

1.3 ศึกษาผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสง

นำพืชทดสอบที่ได้รับสารสกัดหยาบตามวิธีข้างต้นแล้ว มาล้างน้ำให้สะอาด จากนั้นตัดแยกเอาส่วนใบมาวิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสง คัดแปลงจากวิธีการของ Hiscox and Israelstam (1978) โดยชั่งใบพืชหนัก 0.5 กรัม หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แช่ใบพืชในขวดแก้วขนาดเล็ก (vial) ที่บรรจุ DMSO ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปิดฝาขวดให้แน่น ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อสกัดรงควัตถุ จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 664, 648 และ 470 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์ และแคโรทีนอยด์ จากสูตร

$$\text{Chlorophyll a (Chl a)} = 12.25A_{664} - 2.79A_{648} \quad \text{มิลลิกรัมต่อลิตร}$$

$$\text{Chlorophyll b (Chl b)} = 21.50A_{648} - 5.10A_{664} \quad \text{มิลลิกรัมต่อลิตร}$$

$$\text{Carotenoids} = (1000A_{470} - 1.82\text{Chl a} - 85.02\text{Chl b})/198 \quad \text{มิลลิกรัมต่อลิตร}$$

(Chappelle and Kim, 1992)

บันทึกค่าปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์ แล้วนำไปวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ

การทดลองที่ 2 ศึกษาความเสถียร (stability) ของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp.

ศึกษาความเสถียรของสารสกัดหยาบที่เกิดจากผลของอุณหภูมิที่เก็บรักษาและระยะเวลาในการเก็บรักษาหลังจากการสกัดสาร ต่อประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบในการทำให้เกิด lipid peroxidation ในไมยราบยักษ์ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ โดยจัดสิ่งทดลองแบบ factorial ประกอบด้วย 2 ปัจจัย คือ

ปัจจัย A: อุณหภูมิที่เก็บรักษา คือ 4 องศาเซลเซียส และ 30 องศาเซลเซียส

ปัจจัย B: ระยะเวลาการเก็บรักษา คือ 0, 30 และ 60 วันหลังจากการสกัด
โดยให้ระยะเวลาการเก็บรักษา 0 วัน และอุณหภูมิที่เก็บรักษา 4 องศาเซลเซียส เป็นชุดควบคุม

เตรียมสารสกัดหยาบตามวิธีข้างต้นที่กล่าวมาแล้ว โดยใช้ความเข้มข้น 175 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร จากนั้นแบ่งสารสกัดหยาบเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ในตู้เย็น) ส่วนที่สองเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิห้อง) โดยสารสกัดหยาบทั้ง 2 ส่วนเก็บในภาชนะทึบแสงเป็นระยะเวลา 0, 30 และ 60 วัน ปลุกพืชทดสอบ คือ ไมยราบยักษ์จำนวน 35 เมล็ดต่อกระถาง เมื่อครบระยะเวลา 5 วันหลังปลูก ฉีดพ่นสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ไปที่บริเวณใบและส่วนเหนือดินของพืช โดยฉีดพ่นกระถางละ 5 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกันเป็นระยะเวลา 3 วัน โดยครั้งสุดท้ายที่ฉีดพ่นสารสกัดหยาบทิ้งระยะเวลา 2 วัน แล้วจึงเก็บต้นพืชไปวิเคราะห์การเกิด lipid peroxidation โดยแยกวิเคราะห์ในส่วนใบและรากของพืชตามวิธีของ Velikova *et al.* (2000)

บันทึกค่าปริมาณ MDA ในส่วนใบและราก แล้วนำไปวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

นำผลการทดลองที่ได้ ไปวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป IRRISTAT เพื่อตรวจสอบว่าสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ที่ความเข้มข้นต่างๆ มีผลต่อการเกิด lipid peroxidation, ammonia assimilation และปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสงหรือไม่ และตรวจสอบว่าอุณหภูมิและระยะเวลาในการเก็บรักษาสารสกัดมีผลต่อประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบหรือไม่ โดยวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของสิ่งทดลองด้วย F-test และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Fisher's LSD test (Fisher's Least Significant Difference test)

ผลและวิจารณ์

ผล

การทดลองที่ 1 ผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาของพืช

1.1 ผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อการเกิด lipid peroxidation

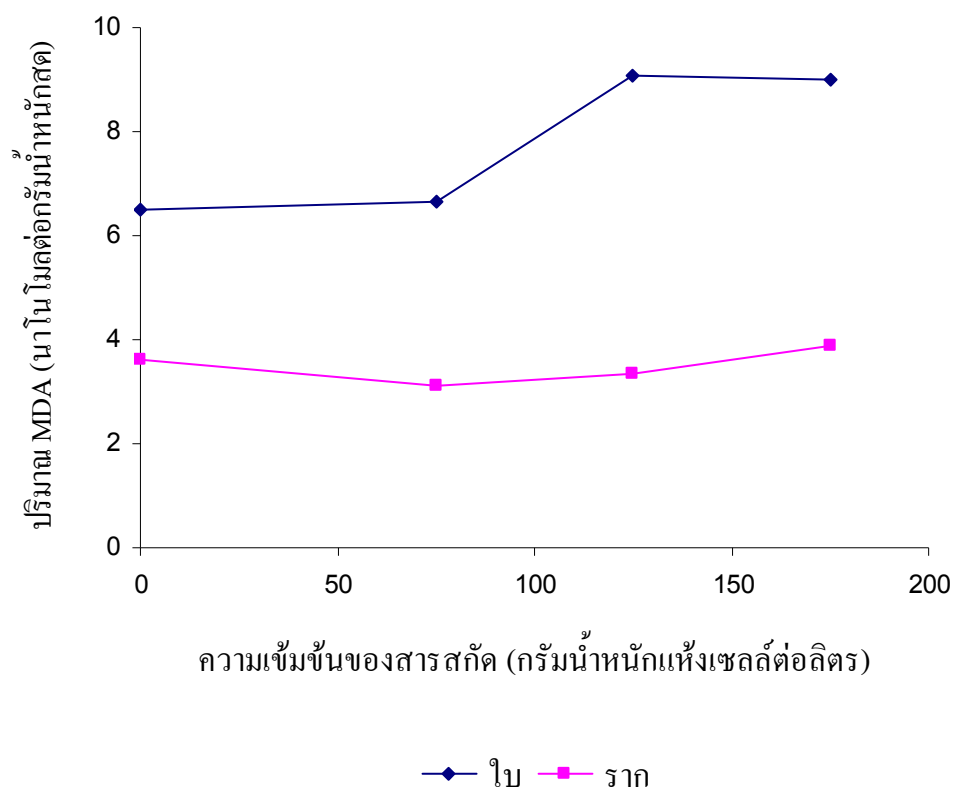
หญ้าขจรจบ สารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ทำให้ปริมาณ MDA ในใบของหญ้าขจรจบเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้น โดยสารสกัดหยาบความเข้มข้น 125 และ 175 กรัม/น้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ทำให้มีการสะสม MDA 9.069 และ 8.995 นาโนโมลต่อกรัม/น้ำหนักสด ตามลำดับ ซึ่งมีค่าเพิ่มขึ้นแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่สารสกัดหยาบไม่ทำให้ปริมาณ MDA ในรากมีความแตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม (ตารางที่ 1 และ ภาพที่ 7)

ตารางที่ 1 ผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อปริมาณ MDA ในใบและรากของหญ้าขจรจบ

ความเข้มข้นของสารสกัด (กรัม/น้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร)	ปริมาณ MDA (นาโนโมลต่อกรัม/น้ำหนักสด)	
	ใบ	ราก
0	6.488 b ^{1/}	3.613 ^{ns}
75	6.636 b	3.097
125	9.069 a	3.355
175	8.995 a	3.871
CV (%)	10.0	12.3

^{1/} = ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ โดยวิธี Fisher's LSD test

ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ



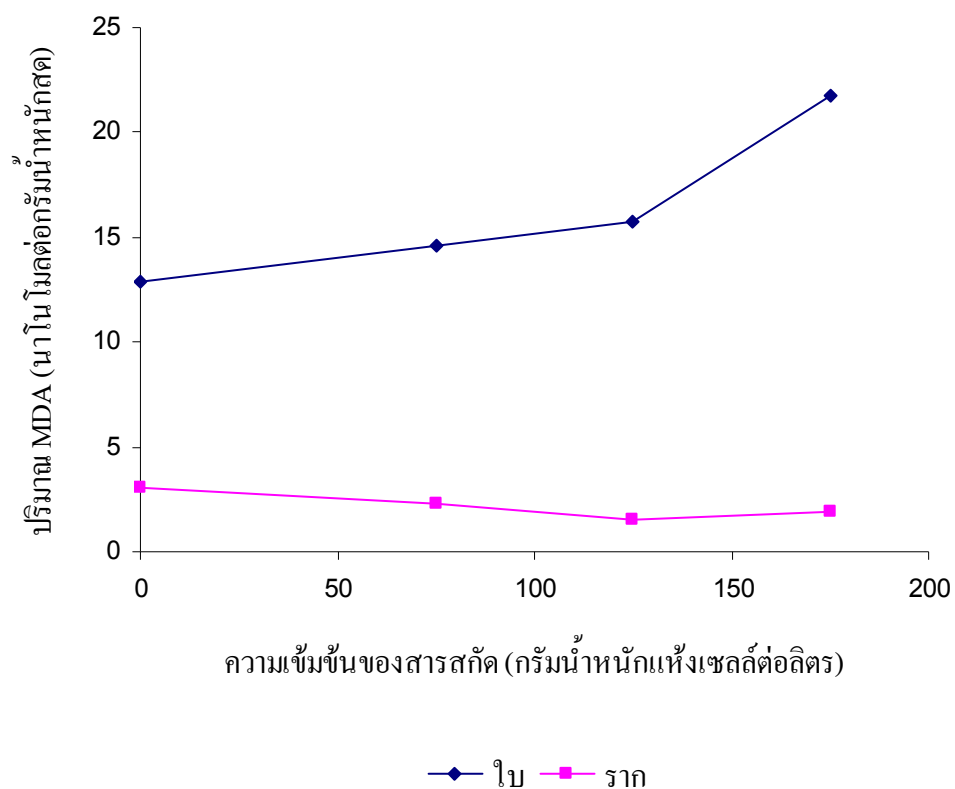
ภาพที่ 7 ผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อปริมาณ MDA ในใบและรากของหญ้าจรจบ

ไมยราบยักษ์ สารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. มีผลทำให้ปริมาณ MDA ในใบของไมยราบยักษ์เพิ่มสูงขึ้นเมื่อได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้น โดยสารสกัดหยาบความเข้มข้น 175 กรัม/น้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ทำให้มีการสะสม MDA 21.742 นาโนโมลต่อกรัมน้ำหนักสด ซึ่งมีค่าเพิ่มขึ้นแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่สารสกัดหยาบทำให้ปริมาณ MDA ในรากลดลง โดยสารสกัดหยาบความเข้มข้น 125 และ 175 กรัม/น้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ทำให้ปริมาณ MDA มีค่า 1.548 และ 1.871 นาโนโมลต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ ซึ่งลดลงแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 2 และภาพที่ 8)

ตารางที่ 2 ผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อปริมาณ MDA ในใบและรากของไมยราบยักษ์

ความเข้มข้นของสารสกัด (กรัม/น้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร)	ปริมาณ MDA (นาโนโมลต่อกรัมน้ำหนักสด)	
	ใบ	ราก
0	12.903 b ^{1/}	3.032 a ^{1/}
75	14.645 b	2.258 ab
125	15.742 b	1.548 b
175	21.742 a	1.871 b
CV (%)	13.3	19.2

^{1/} = ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ โดยวิธี Fisher's LSD test



ภาพที่ 8 ผลของสารสกัดหยาดจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อปริมาณ MDA ในใบและรากของไมยราบยักษ์

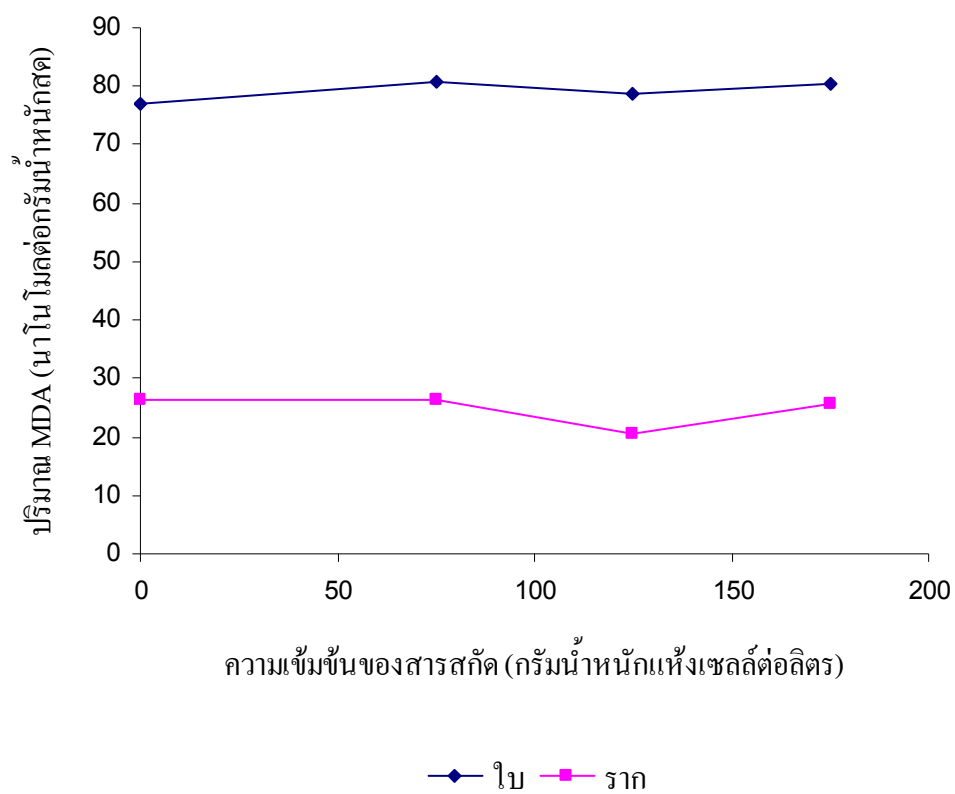
ถั่วเหลือง สารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ในทุกความเข้มข้นไม่มีผลทำให้ปริมาณ MDA ในใบของถั่วเหลืองมีความแตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม แต่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น และสารสกัดหยาบทำให้ปริมาณ MDA ในรากมีแนวโน้มลดลง โดยสารสกัดหยาบความเข้มข้น 125 กรัม/น้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ทำให้ปริมาณ MDA มีค่าลดลงแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3 และภาพที่ 9)

ตารางที่ 3 ผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อปริมาณ MDA ในใบและรากของถั่วเหลือง

ความเข้มข้นของสารสกัด (กรัม/น้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร)	ปริมาณ MDA (นาโนโมลต่อกรัมน้ำหนักสด)	
	ใบ	ราก
0	77.078 ^{ns}	26.472 a ^{1/}
75	80.668	26.367 a
125	78.682	20.400 b
175	80.355	25.735 a
CV (%)	4.4	3.7

^{1/} = ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ โดยวิธี Fisher's LSD test

ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ



ภาพที่ 9 ผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อปริมาณ MDA ในไตและร่าของถั่วเหลือง

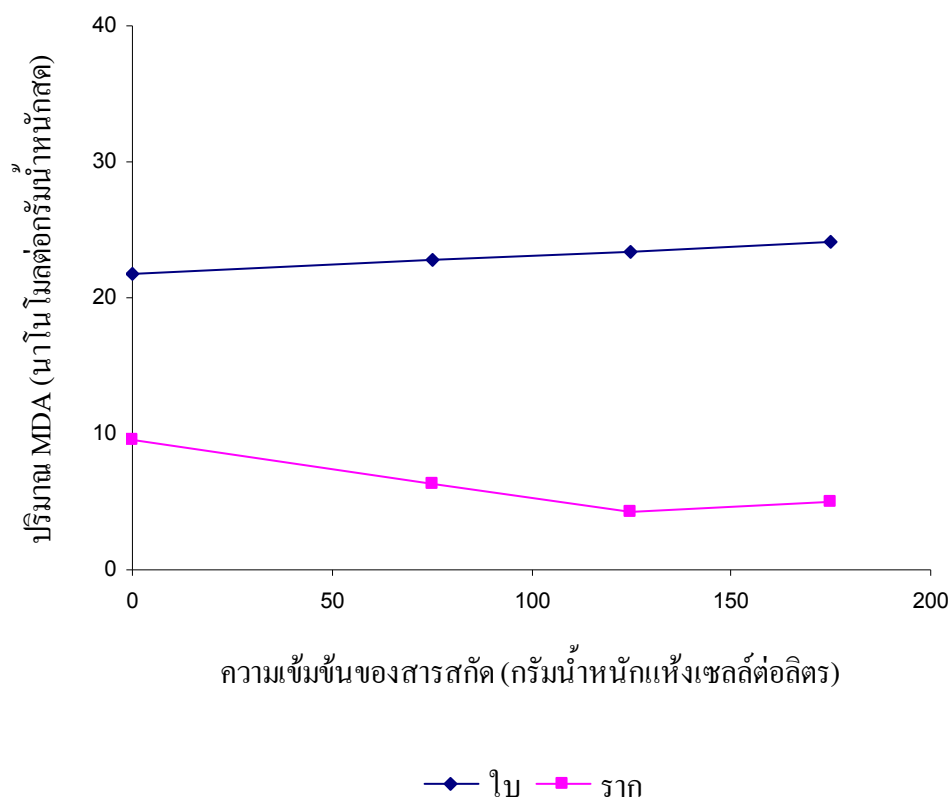
ข้าว สารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ในทุกความเข้มข้นไม่มีผลทำให้ปริมาณ MDA ในใบมีความแตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม โดยสารสกัดหยาบความเข้มข้น 75, 125 และ 175 กรัม น้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ทำให้ปริมาณ MDA มีค่า 22.795, 23.318 และ 24.074 นาโน โมลต่อกรัม น้ำหนักสด ตามลำดับ สำหรับในรากของข้าว พบว่าปริมาณ MDA ลดลง โดยสารสกัดหยาบความเข้มข้น 125 และ 175 กรัม น้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ทำให้ปริมาณ MDA มีค่า 4.198 และ 5.022 นาโน โมลต่อกรัม น้ำหนักสด ตามลำดับ ซึ่งลดลงต่ำกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4 และภาพที่ 10)

ตารางที่ 4 ผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อปริมาณ MDA ในใบและรากของข้าว

ความเข้มข้นของสารสกัด (กรัม น้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร)	ปริมาณ MDA (นาโน โมลต่อกรัม น้ำหนักสด)	
	ใบ	ราก
0	21.718 ^{ns}	9.598 a ^{1/}
75	22.795	6.387 ab
125	23.318	4.198 b
175	24.074	5.022 b
CV (%)	22.9	29.7

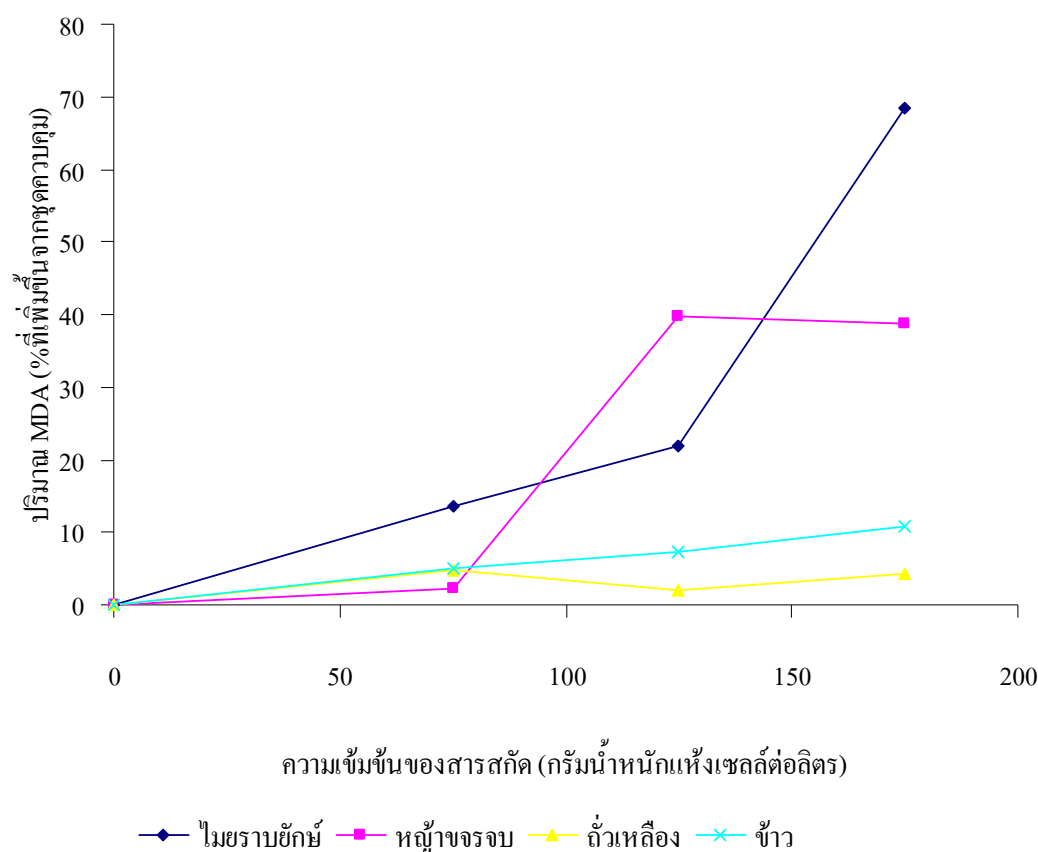
^{1/} = ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Fisher's LSD test

ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

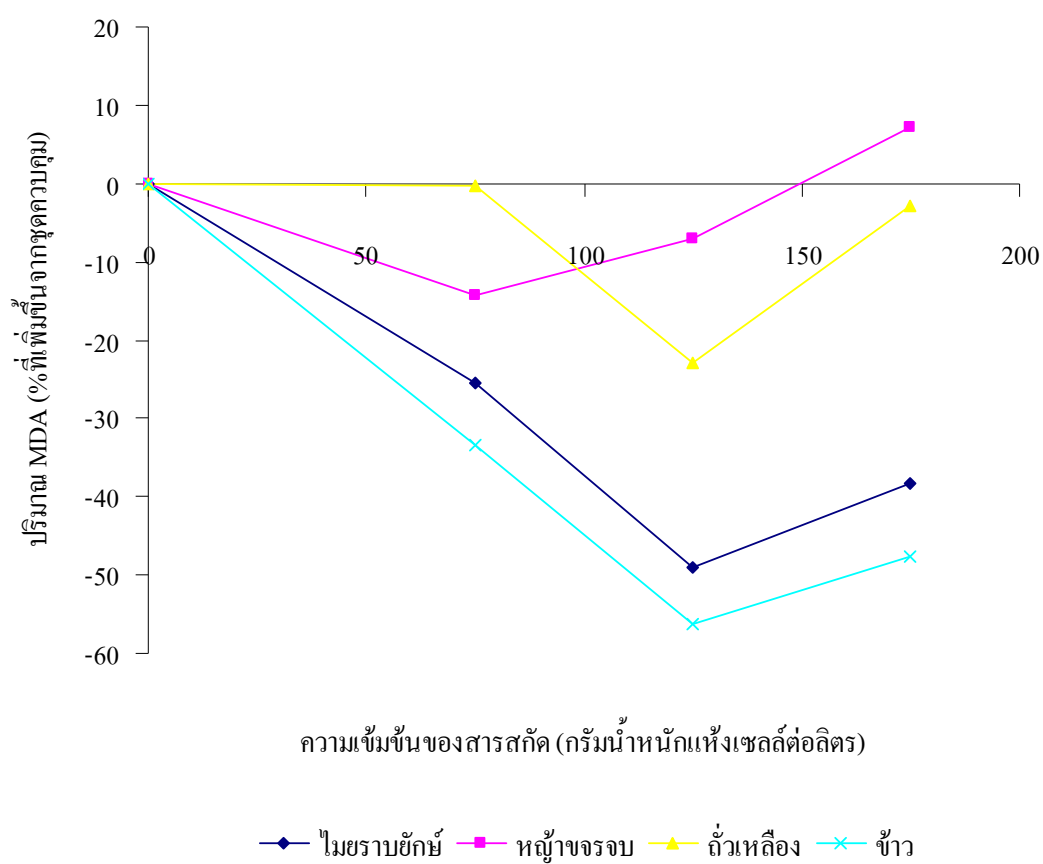


ภาพที่ 10 ผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อปริมาณ MDA ในไบและรากของข้าว

เมื่อนำค่าปริมาณ MDA ในใบและรากของวัชพืชและพืชปลูกชนิดต่างๆ หลังจากได้รับสารสกัดหยาบมาเขียนกราฟเปรียบเทียบ โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของ MDA ที่เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม พบว่า ปริมาณ MDA ในใบของไมยราบยักษ์และหญ้าจรจบมีค่าเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม โดยปริมาณ MDA ที่เพิ่มขึ้นในไมยราบยักษ์มีค่ามากกว่าในหญ้าจรจบ ขณะที่ปริมาณ MDA ในถั่วเหลืองและข้าวไม่แตกต่างจากชุดควบคุม (ภาพที่ 11) สำหรับในราก พบว่า ปริมาณ MDA ในรากของหญ้าจรจบไม่แตกต่างจากชุดควบคุม แต่ปริมาณ MDA ในรากของไมยราบยักษ์ ถั่วเหลือง และข้าว มีค่าลดลงจากชุดควบคุม (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 11 ผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อปริมาณ MDA ในใบของวัชพืชและพืชปลูกชนิดต่างๆ เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ที่เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม



ภาพที่ 12 ผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อปริมาณ MDA ในรากวัชพืชและพืชปลูก ชนิดต่างๆ เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ที่เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม

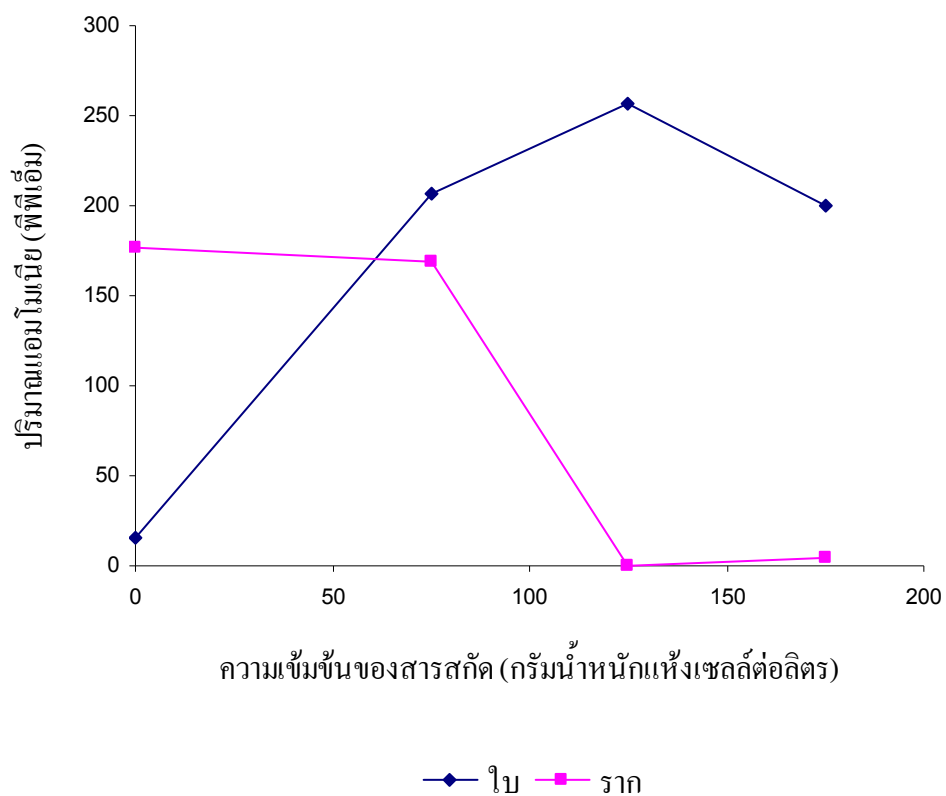
1.2 ผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อกระบวนการ ammonia assimilation

หญ้าจรรยา สารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ส่งผลให้มีการสะสมแอมโมเนียในใบของหญ้าจรรยาเพิ่มขึ้น โดยสารสกัดหยาบความเข้มข้น 75, 125 และ 175 กรัม/น้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ทำให้ปริมาณแอมโมเนียมีค่า 206.154, 256.923 และ 200 พีพีเอ็ม ตามลำดับ ซึ่งมีค่าเพิ่มขึ้นแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสารสกัดหยาบความเข้มข้น 125 และ 175 กรัม/น้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร มีผลทำให้ปริมาณแอมโมเนียในรากลดลงแตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม โดยปริมาณแอมโมเนียมีค่า 0 และ 3.971 พีพีเอ็ม ตามลำดับ (ตารางที่ 5 และภาพที่ 13)

ตารางที่ 5 ผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อการสะสมปริมาณแอมโมเนียในใบและรากของหญ้าจรรยา

ความเข้มข้นของสารสกัด (กรัม/น้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร)	ปริมาณแอมโมเนีย (พีพีเอ็ม)	
	ใบ	ราก
0	15.385 c ^{1/}	176.923 a ^{1/}
75	206.154 b	169.231 a
125	256.923 a	0.000 b
175	200.000 b	3.971 b
CV (%)	8.2	7.8

^{1/} = ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ โดยวิธี Fisher's LSD test

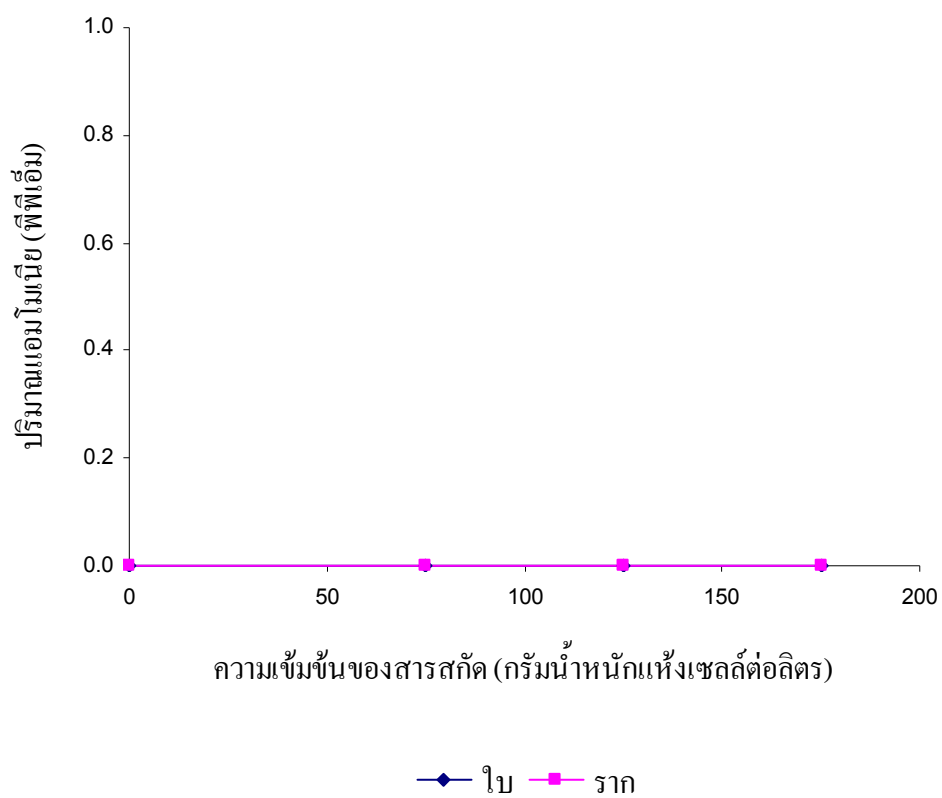


ภาพที่ 13 ผลของสาหร่ายจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อการสะสมปริมาณแอมโมเนียในใบและรากของหญ้าจวบ

ไมยราบยักษ์ สารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ในทุกความเข้มข้นไม่มีผลต่อการสะสมปริมาณแอมโมเนียในใบและรากของไมยราบยักษ์ โดยไม่สามารถวัดปริมาณแอมโมเนียในใบและรากของไมยราบยักษ์ได้ (ตารางที่ 6 และภาพที่ 14)

ตารางที่ 6 ผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อการสะสมปริมาณแอมโมเนียในใบและรากของไมยราบยักษ์

ความเข้มข้นของสารสกัด (กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร)	ปริมาณแอมโมเนีย (พีพีเอ็ม)	
	ใบ	ราก
0	0.000	0.000
75	0.000	0.000
125	0.000	0.000
175	0.000	0.000
CV (%)	0.0	0.0



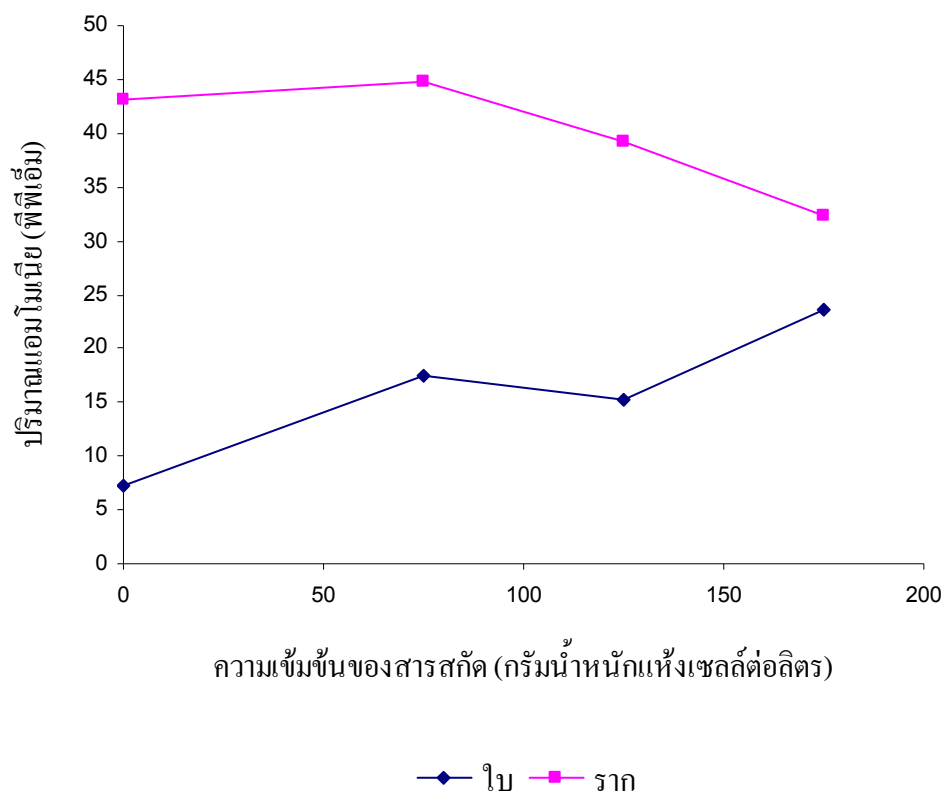
ภาพที่ 14 ผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อการสะสมปริมาณแอมโมเนียในใบและรากของไมยราบยักษ์

ถั่วเหลือง สารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ส่งผลให้มีการสะสมแอมโมเนียในใบของถั่วเหลืองเพิ่มขึ้น โดยสารสกัดหยาบความเข้มข้น 75, 125 และ 175 กรัม/น้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ทำให้ปริมาณแอมโมเนียมีค่า 17.426, 15.176 และ 23.584 พีพีเอ็ม ตามลำดับ ซึ่งมีค่าเพิ่มขึ้นแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสารสกัดหยาบความเข้มข้น 175 กรัม/น้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร มีผลทำให้ปริมาณแอมโมเนียในรากลดลงแตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม โดยปริมาณแอมโมเนียมีค่า 32.431 พีพีเอ็ม ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างทางสถิติกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 125 กรัม/น้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร (ตารางที่ 7 และภาพที่ 15)

ตารางที่ 7 ผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อการสะสมปริมาณแอมโมเนียในใบและรากของถั่วเหลือง

ความเข้มข้นของสารสกัด (กรัม/น้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร)	ปริมาณแอมโมเนีย (พีพีเอ็ม)	
	ใบ	ราก
0	7.178 c ^U	43.182 a ^U
75	17.426 b	44.751 a
125	15.176 b	39.247 ab
175	23.584 a	32.431 b
CV (%)	19.9	10.0

^U = ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ โดยวิธี Fisher's LSD test



ภาพที่ 15 ผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อการสะสมปริมาณแอมโมเนียในไบและรากของถั่วเหลือง

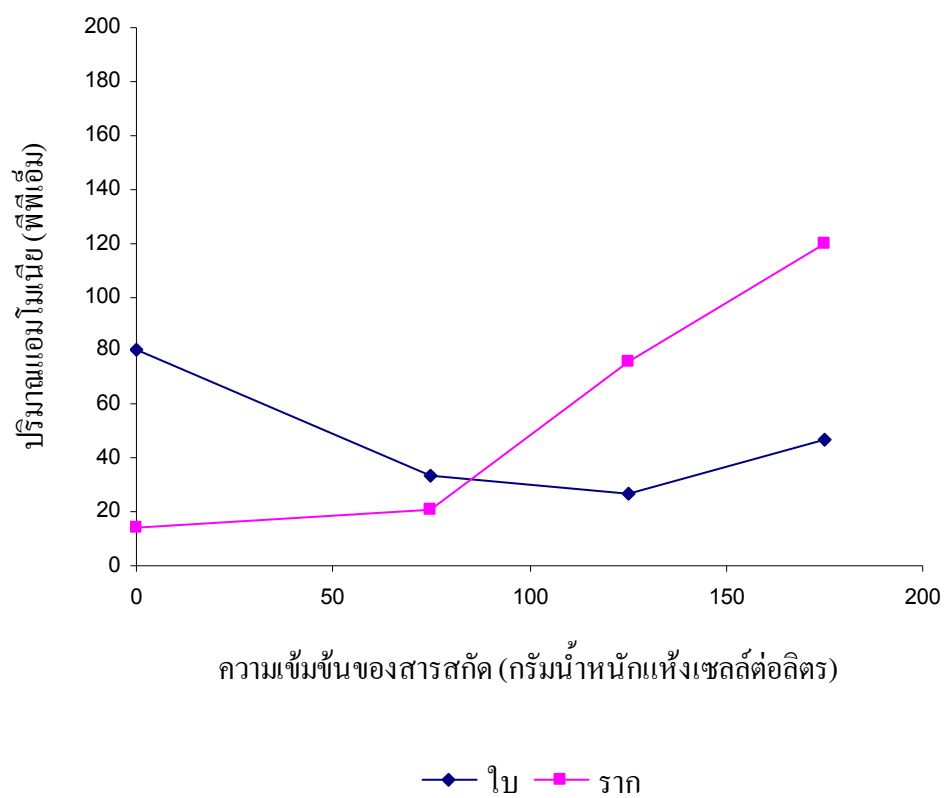
ข้าว สารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ไม่มีผลทำให้มีการสะสมแอมโมเนียในใบของข้าว แต่สารสกัดหยาบมีผลส่งเสริมให้มีการสะสมแอมโมเนียในราก โดยเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเพิ่มขึ้นทำให้ปริมาณแอมโมเนียเพิ่มขึ้น โดยที่ความเข้มข้น 175 กรัม/น้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ทำให้ปริมาณแอมโมเนียมีค่า 119.527 พีพีเอ็ม ซึ่งมีค่าเพิ่มขึ้นแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีค่าไม่แตกต่างทางสถิติกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 125 กรัม/น้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร (ตารางที่ 8 และภาพที่ 16)

ตารางที่ 8 ผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อการสะสมปริมาณแอมโมเนียในใบและรากของข้าว

ความเข้มข้นของสารสกัด (กรัม/น้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร)	ปริมาณแอมโมเนีย (พีพีเอ็ม)	
	ใบ	ราก
0	80.403 ^{ns}	14.363 c ^{1/}
75	33.332	20.763 bc
125	27.007	75.568 abc
175	47.050	119.527 a
CV (%)	84.6	59.1

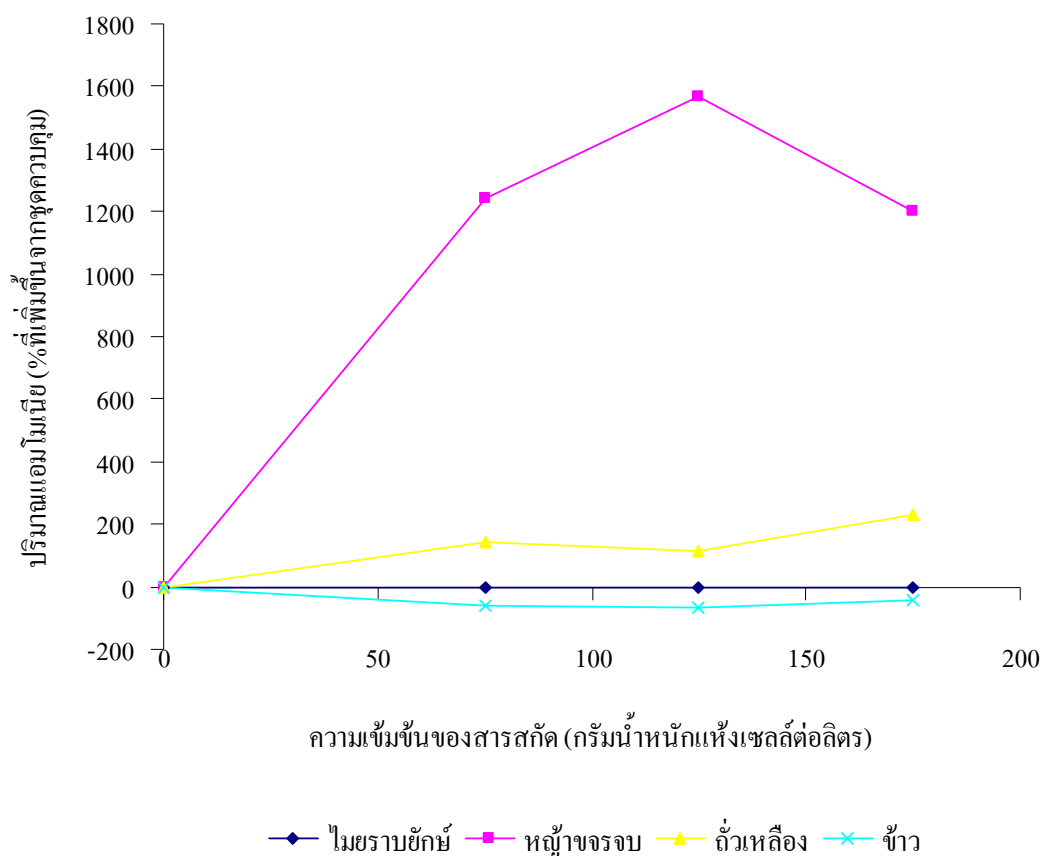
^{1/} = ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ โดยวิธี Fisher's LSD test

ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

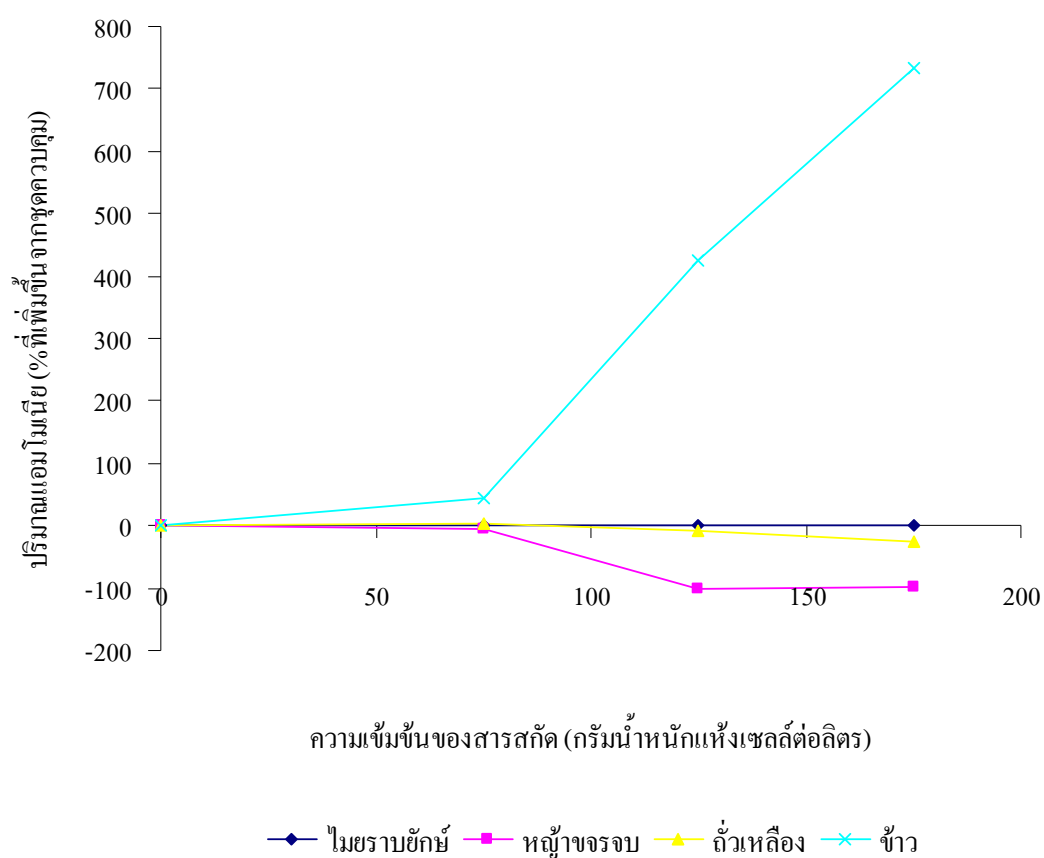


ภาพที่ 16 ผลของสาหร่ายจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อการสะสมปริมาณแอมโมเนียในใบและรากของข้าว

เมื่อนำค่าปริมาณแอมโมเนียในใบและรากของวัชพืชและพืชปลูกชนิดต่างๆ หลังจากได้รับสารสกัดหยาบมาเขียนกราฟเปรียบเทียบ โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของแอมโมเนียที่เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม พบว่า ปริมาณแอมโมเนียในใบของหญ้าจรจบและถั่วเหลืองมีค่าเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม โดยปริมาณแอมโมเนียที่เพิ่มขึ้นในหญ้าจรจบมีค่ามากกว่าในถั่วเหลือง ขณะที่ปริมาณแอมโมเนียในไมยราบยักษ์และข้าวไม่แตกต่างจากชุดควบคุม (ภาพที่ 17) สำหรับในราก พบว่า ปริมาณแอมโมเนียในรากของหญ้าจรจบและถั่วเหลืองมีค่าลดลง แต่ปริมาณแอมโมเนียในรากของข้าวมีค่าเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 18)



ภาพที่ 17 ผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อการสะสมปริมาณแอมโมเนียในใบของวัชพืชและพืชปลูกชนิดต่างๆ เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ที่เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม



ภาพที่ 18 ผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อการสะสมปริมาณแอมโมเนียในรากของ
วัชพืชและพืชปลูกชนิดต่างๆ เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ที่เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม

1.3 ผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสง

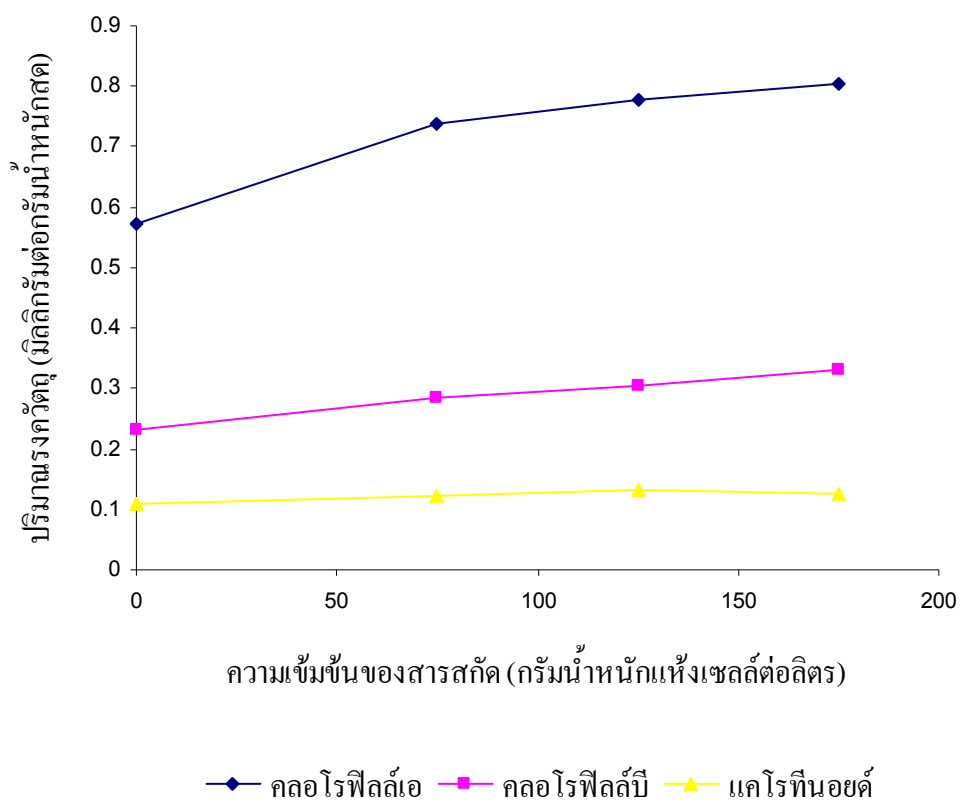
หญ้าขจรจบ สารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ในทุกความเข้มข้นไม่มีผลทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์ในใบของหญ้าขจรจบ มีความแตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม แต่มีผลทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์เอมีค่าเพิ่มขึ้นแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสารสกัดหยาบความเข้มข้น 75, 125 และ 175 กรัม/น้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์เอมีค่า 0.739, 0.776 และ 0.803 มิลลิกรัมต่อกรัม/น้ำหนักสด ตามลำดับ (ตารางที่ 9 และภาพที่ 19)

ตารางที่ 9 ผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสงในใบหญ้าขจรจบ

ความเข้มข้น ของสารสกัด (กรัม/น้ำหนักแห้งเซลล์ ต่อลิตร)	ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ (มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักสด)	ปริมาณคลอโรฟิลล์บี (มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักสด)	ปริมาณแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักสด)
0	0.572 b ^{1/}	0.231 ^{ns}	0.109 ^{ns}
75	0.739 a	0.286	0.122
125	0.776 a	0.303	0.132
175	0.803 a	0.332	0.126
CV (%)	9.9	13.6	11.3

^{1/} = ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ โดยวิธี Fisher's LSD test

ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ



ภาพที่ 19 ผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสงในใบหญ้าจรจบ

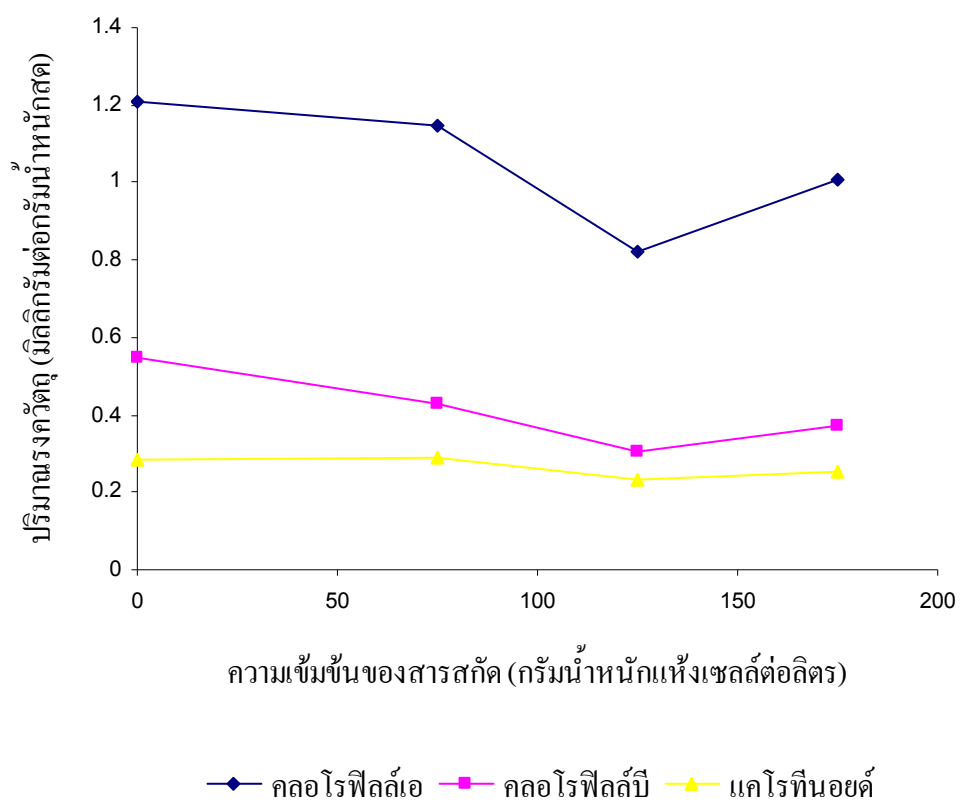
ไมยราบยักษ์ สารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ในทุกความเข้มข้นไม่มีผลทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์ในใบของไมยราบยักษ์ มีความแตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม แต่มีแนวโน้มทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์เอมีค่าลดลง โดยสารสกัดหยาบความเข้มข้น 125 กรัม/น้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์เอมีค่าลดลงแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์เอมีค่า 0.820 มิลลิกรัมต่อกรัม/น้ำหนักสด ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างทางสถิติกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 175 กรัม/น้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร (ตารางที่ 10 และภาพที่ 20)

ตารางที่ 10 ผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสงในใบไมยราบยักษ์

ความเข้มข้น ของสารสกัด (กรัม/น้ำหนักแห้งเซลล์ ต่อลิตร)	ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ (มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักสด)	ปริมาณคลอโรฟิลล์บี (มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักสด)	ปริมาณแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักสด)
0	1.208 a ^{1/}	0.548 ^{ns}	0.282 ^{ns}
75	1.147 a	0.429	0.289
125	0.820 b	0.303	0.231
175	1.005 ab	0.370	0.253
CV (%)	13.0	22.4	12.4

^{1/} = ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ โดยวิธี Fisher's LSD test

ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ



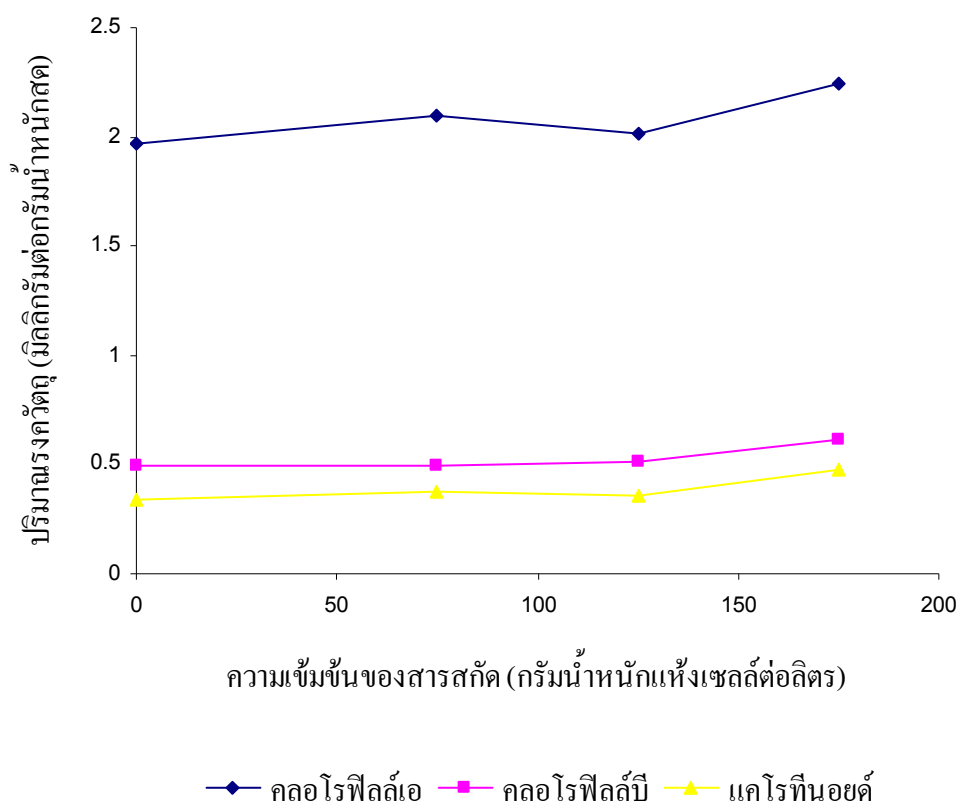
ภาพที่ 20 ผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสงในใบไมยราบยักษ์

ถั่วเหลือง สารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. มีผลทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์ในใบของถั่วเหลืองเพิ่มขึ้น โดยสารสกัดหยาบความเข้มข้น 175 กรัม/น้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์ มีค่า 2.242, 0.613 และ 0.473 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ ซึ่งมีค่าเพิ่มขึ้นต่างจากชุดควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 11 และภาพที่ 21)

ตารางที่ 11 ผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องใน กระบวนการสังเคราะห์แสงในใบถั่วเหลือง

ความเข้มข้น ของสารสกัด (กรัม/น้ำหนักแห้งเซลล์ ต่อลิตร)	ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ (มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักสด)	ปริมาณคลอโรฟิลล์บี (มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักสด)	ปริมาณแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักสด)
0	1.966 c ^{1/}	0.490 b ^{1/}	0.343 b ^{1/}
75	2.097 b	0.495 b	0.375 b
125	2.015 bc	0.509 b	0.360 b
175	2.242 a	0.613 a	0.473 a
CV (%)	3.2	4.2	5.7

^{1/} = ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ โดยวิธี Fisher's LSD test



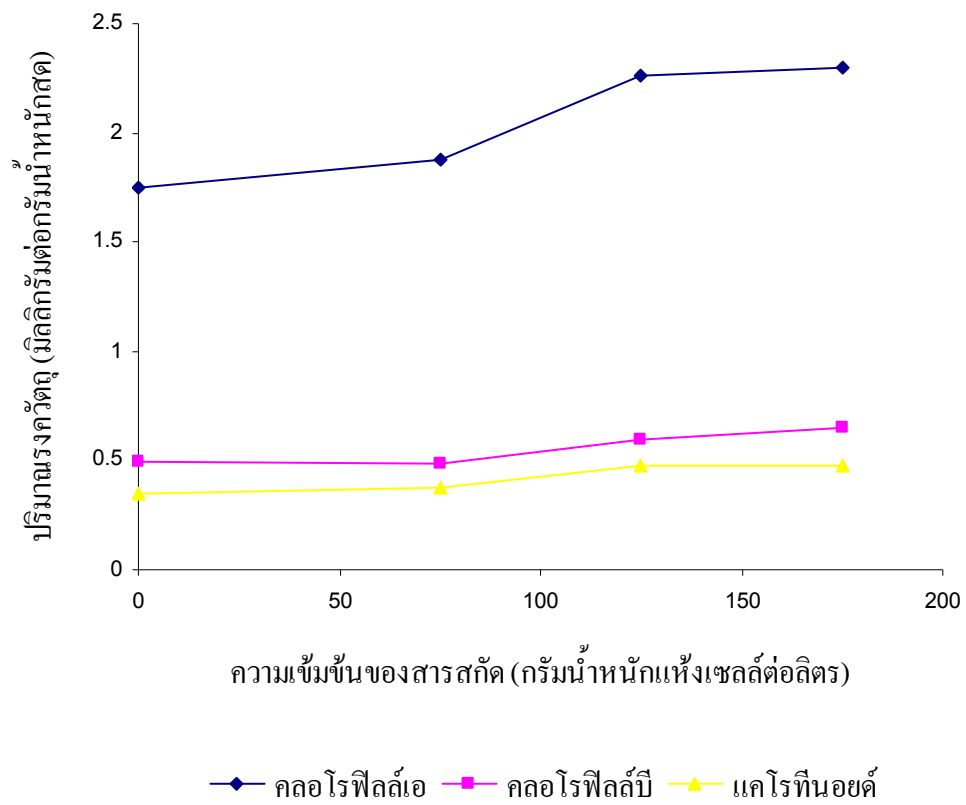
ภาพที่ 21 ผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสงในใบถั่วเหลือง

ข้าว สารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ในทุกความเข้มข้นไม่มีผลทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์ในใบของข้าว มีความแตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม (ตารางที่ 12 และภาพที่ 22)

ตารางที่ 12 ผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสงในใบข้าว

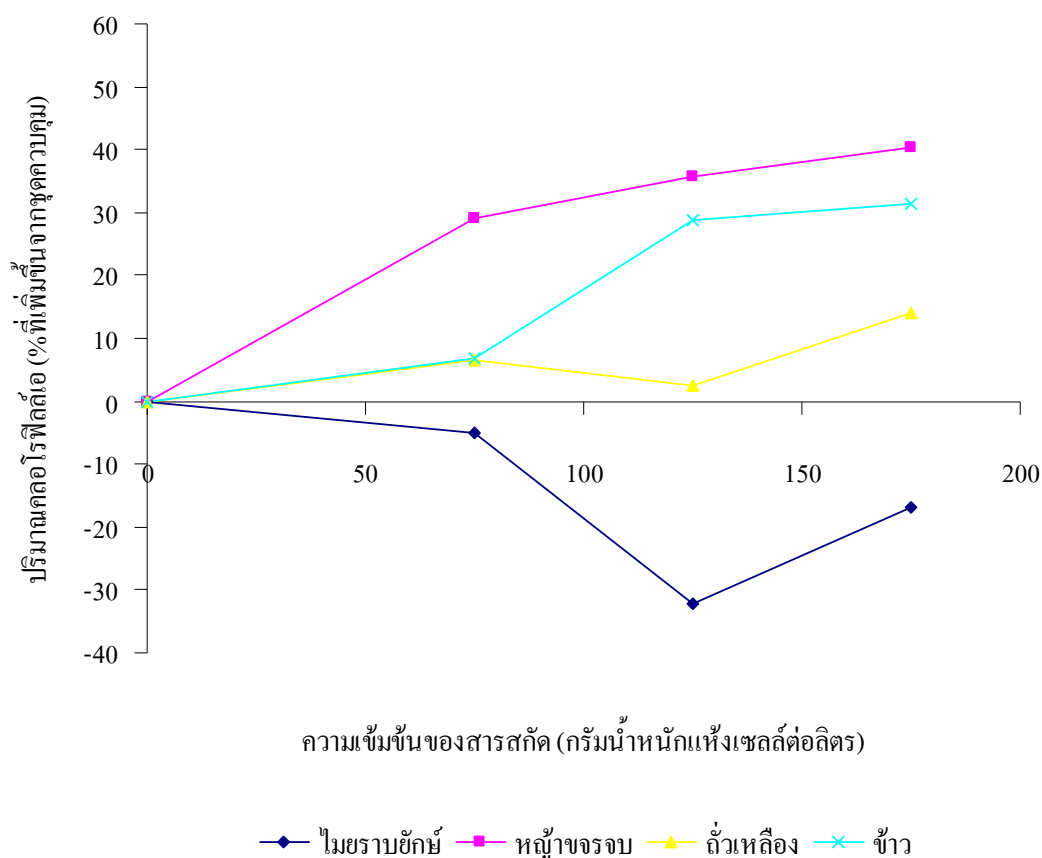
ความเข้มข้น ของสารสกัด (กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ ต่อลิตร)	ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ (มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักสด)	ปริมาณคลอโรฟิลล์บี (มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักสด)	ปริมาณแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักสด)
0	1.753 ^{ns}	0.495 ^{ns}	0.344 ^{ns}
75	1.873	0.482	0.379
125	2.259	0.597	0.472
175	2.301	0.646	0.472
CV (%)	16.2	15.7	18.7

ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

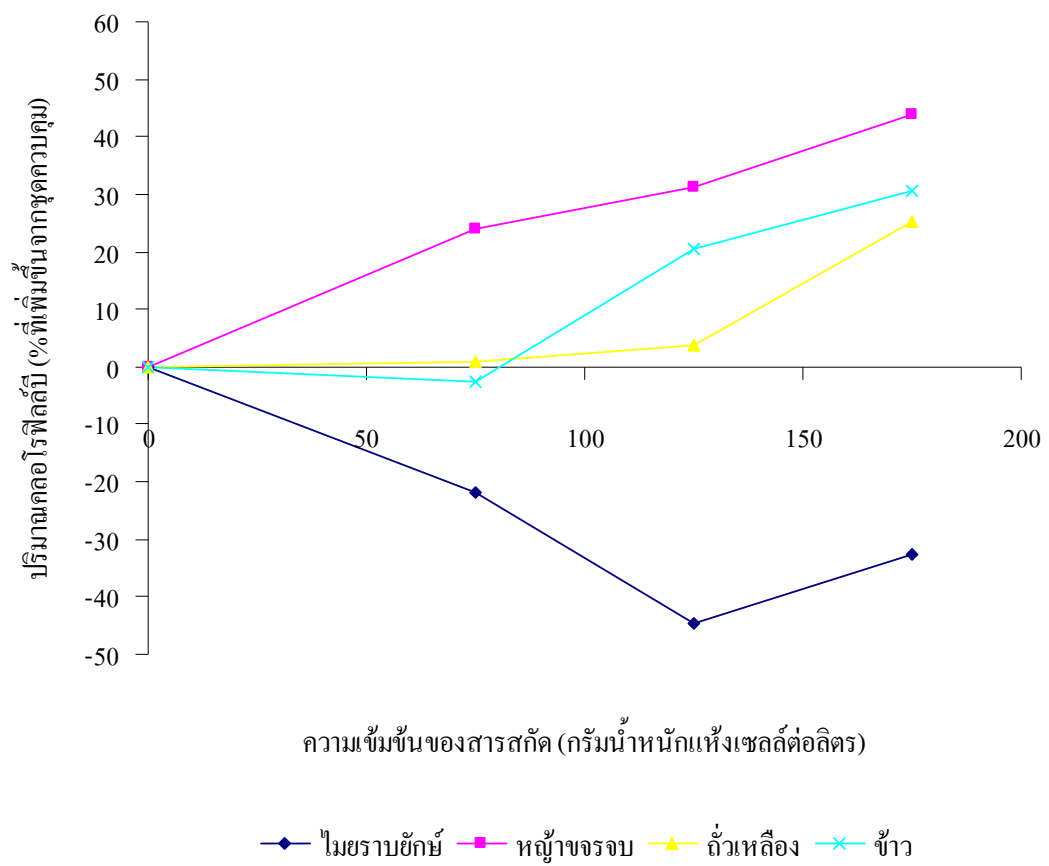


ภาพที่ 22 ผลของสาหร่ายจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสงในใบข้าว

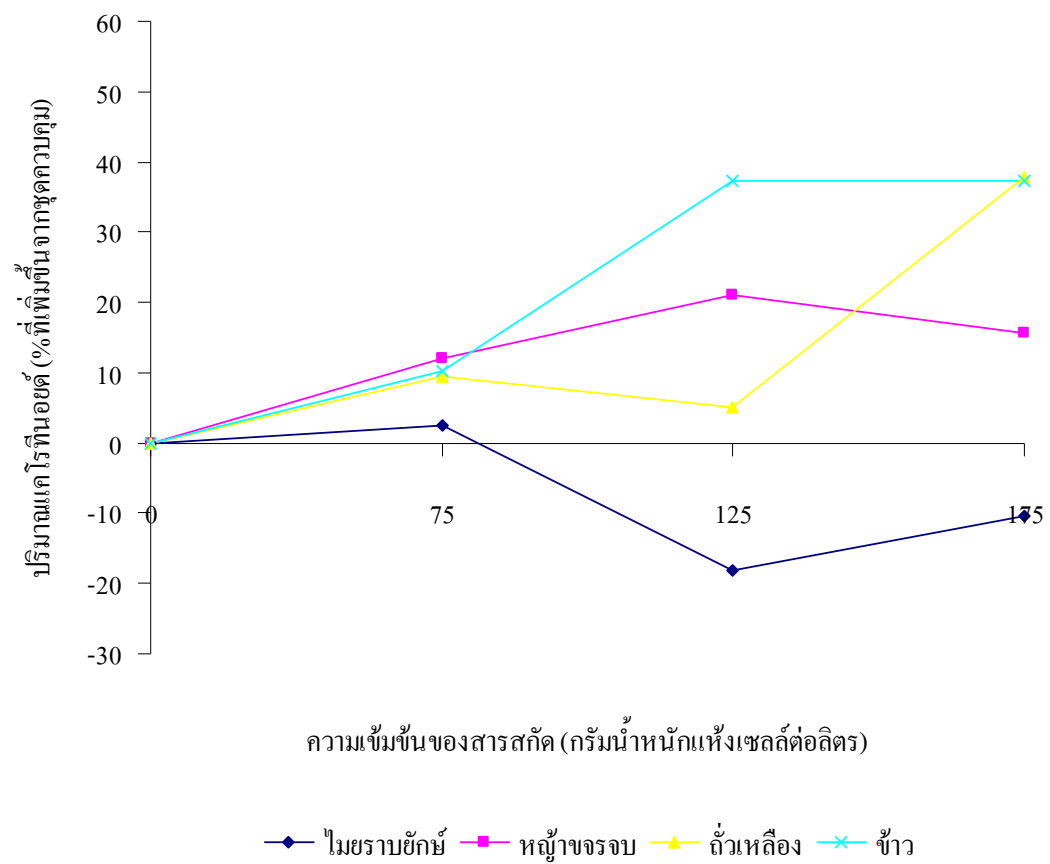
เมื่อนำค่าปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์ในใบของวัชพืชและพืชปลูกชนิดต่างๆ หลังจากได้รับสารสกัดหยาบมาเขียนกราฟเปรียบเทียบ โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ที่เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม พบว่า ปริมาณคลอโรฟิลล์เอในใบของไมยราบยักษ์มีค่าลดลง แต่ปริมาณคลอโรฟิลล์เอในใบหญ้าจรจบ ถั่วเหลืองและข้าวมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม (ภาพที่ 23) และพบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์บีและแคโรทีนอยด์ในหญ้าจรจบ ถั่วเหลือง และข้าวมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ส่วนปริมาณคลอโรฟิลล์บีและแคโรทีนอยด์ในไมยราบยักษ์มีแนวโน้มลดลง (ภาพที่ 24 และ 25)



ภาพที่ 23 ผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อปริมาณคลอโรฟิลล์เอในใบของวัชพืชและพืชปลูกชนิดต่างๆ เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ที่เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม



ภาพที่ 24 ผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบของวัชพืช และพืชปลูกชนิดต่างๆ เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ที่เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม



ภาพที่ 25 ผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อปริมาณแคโรทีนอยด์ในใบของวัชพืช และพืชปลูกชนิดต่างๆ เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ที่เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม

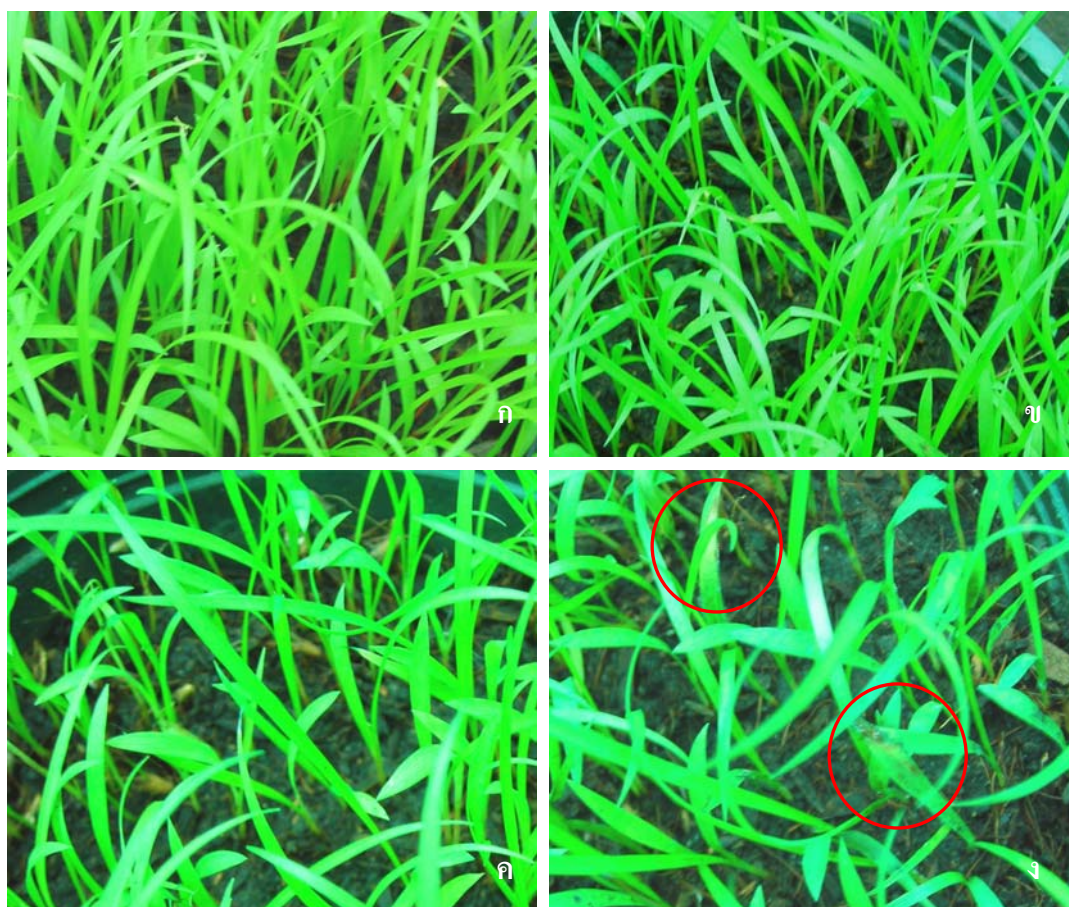
ลักษณะอาการของพืชหลังจากฉีดพ่นสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ในการทดลองที่ 1

หลังจากฉีดพ่นสารสกัดหยาบด้วยน้ำจาก *Hapalosiphon* sp. จำนวน 3 ครั้ง ไปที่บริเวณใบ และส่วนเหนือดินของพืชทดสอบ 4 ชนิด ได้แก่ ไมยราบยักษ์ หนุ่ยขจรจบ ถั่วเหลือง และข้าว พบว่า พืชแต่ละชนิดแสดงอาการผิดปกติแตกต่างกัน โดยไมยราบยักษ์มีลักษณะผิดปกติชัดเจนกว่า พืชชนิดอื่น ใบของไมยราบยักษ์บริเวณที่ได้รับสารสกัดหยาบจะแสดงอาการใบไหม้และเหี่ยวแห้ง และเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเพิ่มขึ้น พบว่าอาการผิดปกติมากขึ้น (ภาพที่ 26) ส่วนใบของหนุ่ยขจรจบบริเวณที่ได้รับสารสกัดหยาบจะแสดงอาการผิดปกติเล็กน้อยคือ ใบช้ำเป็นจุด แต่ต้นที่เกิดอาการผิดปกติมีจำนวนน้อย (ภาพที่ 27) ขณะที่ไม่พบอาการผิดปกติเกิดขึ้นในถั่วเหลือง และข้าว (ภาพที่ 28 และ 29)



ภาพที่ 26 ลักษณะของไมยราบยักษ์เมื่อได้รับสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ความเข้มข้นต่างๆ

ก) ชุดควบคุม ข) 75 กรัม/น้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ค) 125 กรัม/น้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร
ง) 175 กรัม/น้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร



ภาพที่ 27 ลักษณะของหญ้าจรจบเมื่อได้รับสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ความเข้มข้นต่างๆ
 ก) ชุดควบคุม ข) 75 กรัม/น้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ค) 125 กรัม/น้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร
 ง) 175 กรัม/น้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร



ภาพที่ 28 ลักษณะของถั่วเหลืองเมื่อได้รับสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ความเข้มข้นต่างๆ
 ก) ชุดควบคุม ข) 75 กรัม/น้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ค) 125 กรัม/น้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร
 ง) 175 กรัม/น้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร

หมายเหตุ: คราบจุดสีน้ำตาลที่ปรากฏในภาพเกิดจากคราบของสารสกัดที่ติดค้างอยู่บนใบ



ภาพที่ 29 ลักษณะของข้าวเมื่อได้รับสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ความเข้มข้นต่างๆ
 ก) ชุดควบคุม ข) 75 กรัม/น้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ค) 125 กรัม/น้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร
 ง) 175 กรัม/น้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร

หมายเหตุ: คราบจุดสีน้ำตาลที่ปรากฏในภาพเกิดจากคราบของสารสกัดที่ติดค้างอยู่บนใบ

การทดลองที่ 2 การศึกษาความเสถียร (stability) ของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp.

จากการทดสอบความเสถียรของสารสกัดหยาบที่เกิดจากผลของอุณหภูมิที่เก็บรักษาและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบในการทำให้เกิด lipid peroxidation ในไมยราบยักษ์ โดยฉีดพ่นสารสกัดหยาบความเข้มข้น 175 กรัม/น้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ จำนวน 3 ครั้ง เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 พบว่าทั้งระยะเวลาการเก็บรักษา (0, 30 และ 60 วันหลังสกัด) และอุณหภูมิที่เก็บรักษาสารสกัด (4 และ 30 องศาเซลเซียส) ไม่ทำให้ปริมาณ MDA ในใบมีความแตกต่างกันทางสถิติ และไม่มีปฏิสัมพันธ์กันต่อปริมาณ MDA ในใบ (ตารางที่ 13) ส่วนในราก พบว่าระยะเวลาการเก็บรักษาและอุณหภูมิที่เก็บรักษาสารสกัดไม่ทำให้ปริมาณ MDA มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่เมื่อพิจารณาผลของระยะเวลาการเก็บรักษาสารสกัดเพียงอย่างเดียวจะพบว่าระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น มีผลทำให้ปริมาณ MDA ในรากลดลงจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ถ้าพิจารณาอุณหภูมิที่เก็บรักษาสารสกัด พบว่าไม่มีผลทำให้ปริมาณ MDA ในรากมีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 ผลของอุณหภูมิที่เก็บรักษาและระยะเวลาการเก็บรักษาสารสกัดหยาบต่อปริมาณ MDA ในใบและรากของไมยราบยักษ์

ระยะเวลาการเก็บ รักษาสารสกัด (วันหลังสกัด)	ปริมาณ MDA (นาโนโมลต่อกรัมน้ำหนักสด)					
	ใบ			ราก		
	อุณหภูมิ		เฉลี่ย	อุณหภูมิ		เฉลี่ย
	ที่เก็บรักษาสารสกัด			ที่เก็บรักษาสารสกัด		
	4 °c	30 °c		4 °c	30 °c	
0	27.767	28.967	28.367 ^{ns}	7.533	7.000	7.267 a ^U
30	32.600	30.933	31.767	6.300	5.933	6.117 b
60	29.300	28.700	29.000	4.733	5.033	4.883 c
เฉลี่ย	29.889 ^{ns}	29.533		6.189 ^{ns}	5.989	

^U = ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ โดยวิธี Fisher's LSD test

ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ลักษณะอาการของไมยราบยักษ์หลังจากฉีดพ่นสารสกัดหยาบที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆในการทดลองที่ 2

หลังจากฉีดพ่นสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ความเข้มข้น 175 กรัม/น้ำหนักแห้ง เซลล์ต่อลิตรที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 0, 30 และ 60 วันหลังสกัด ไปที่บริเวณใบและส่วนเหนือดินของไมยราบยักษ์ พบว่า ใบของไมยราบยักษ์บริเวณที่ได้รับสารสกัดหยาบจะแสดงอาการใบไหม้และเหี่ยวแห้งเหมือนกัน แต่ความรุนแรงแตกต่างกัน คือเมื่อพิจารณาอุณหภูมิที่เก็บรักษาจะเห็นว่าสารสกัดหยาบที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 30 ข ง และ ฉ) ทำให้ไมยราบยักษ์แสดงอาการผิดปกติมากกว่าเมื่อได้รับสารสกัดหยาบที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 30 ก ค และ จ) และอาการที่แสดงออกชัดเจนกว่าคือ ทำให้ใบแห้งและไหม้เป็นสีน้ำตาลจำนวนมาก ส่วนเมื่อพิจารณาระยะเวลาในการเก็บรักษาสารสกัด พบว่าเมื่อเก็บรักษาสารสกัดหยาบไว้เป็นระยะเวลานานขึ้น ทำให้ใบของไมยราบยักษ์แสดงอาการผิดปกติมากขึ้น คือใบมีลักษณะแห้งและไหม้มากขึ้น (ภาพที่ 30 ก-ฉ)



ภาพที่ 30 ลักษณะของไมยราบยักษ์เมื่อได้รับสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ความเข้มข้น 175 กรัม/น้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ

ก) 4 °C, 0 วัน (ชุดควบคุม) ข) 30 °C, 0 วัน

ค) 4 °C, 30 วัน ง) 30 °C, 30 วัน

จ) 4 °C, 60 วัน ฉ) 30 °C, 60 วัน

วิจารณ์

ไซยาโนแบคทีเรียหลายชนิดมีความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิที่มีผลต่อกระบวนการทางชีวเคมีภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต สารเหล่านี้บางครั้งอาจถูกเรียกว่าเป็นสารประกอบอัลลิโลเคมี เนื่องจากมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตอื่นที่เจริญอยู่ร่วมกัน (Smith and Doan, 1999; Leflaive and Ten-Hage, 2007) ด้วยเหตุนี้จึงทำให้สารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรียได้รับความสนใจในการใช้เป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อใช้ในทางการเกษตร จากการทดลองของณัฐฐา (2543) พบว่าสารสกัดหยาบจากไซยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon* sp. สามารถยับยั้งการงอก ความยาวยอด และความยาวรากของพืชบางชนิดได้ แต่การศึกษาผลของสารสกัดหยาบต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาของพืชยังมีน้อย จากการที่มีรายงานว่าสารประกอบอัลลิโลเคมีมีผลในการยับยั้งกระบวนการทางสรีรวิทยาที่สำคัญในพืช เช่น การแบ่งเซลล์ คุณสมบัติการเลือกผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ การสังเคราะห์คลอโรฟิลล์และการสังเคราะห์แสง การหายใจ กิจกรรมของเอนไซม์ และการสังเคราะห์กรดอะมิโนหรือโปรตีน รวมถึงยังสามารถทำให้เกิด reactive oxygen species (ROS) ซึ่งเป็นพิษกับพืชได้ (Leather and Einhellig, 1988; Weir *et al.*, 2004) ในการทดลองนี้จึงได้ศึกษาผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาของพืช ได้แก่ การเกิด lipid peroxidation, ammonia assimilation และปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสง โดยกระบวนการเหล่านี้อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้พืชมีการเจริญเติบโตลดลงหรือตายได้ เพื่อที่จะนำสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ไปพัฒนาใช้เป็นสารกำจัดวัชพืชต่อไป

ผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อการเกิด lipid peroxidation

กระบวนการ lipid peroxidation เป็นกระบวนการที่ไขมันถูกทำลายเมื่อเกิด oxidative stress ซึ่งเกิดจากโมเลกุลของ reactive oxygen species (ROS) โดยทั่วไป ROS สามารถเกิดขึ้นได้ในเซลล์ปกติ แต่เมื่อพืชอยู่ในสภาวะเครียดต่างๆ เช่น ความเข้มแสงสูง สภาวะแห้งแล้งและความเค็ม ความหนาวเย็น ความร้อน แสงอุลตราไวโอเลต และโลหะหนัก รวมทั้งสารเคมีต่างๆ เช่น สารกำจัดวัชพืชบางชนิด สามารถทำให้ปริมาณของ ROS เพิ่มขึ้นจนเป็นพิษกับเซลล์ (Dat *et al.*, 2000; Inze' and Montagu, 2002) จากการทดสอบผลของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยน้ำกลั่นจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อการเกิด lipid peroxidation ในวัชพืชและพืชปลูก พบว่าสารสกัดหยาบทำให้ใบของหญ้าขจรจบและไมยราบยักษ์มีการสะสม MDA เพิ่มขึ้น โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดหยาบทำให้ใบพืชทั้งสองชนิดมีปริมาณ MDA เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 1-2 และภาพที่ 7-8, 11) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. มีผลทำให้เกิด lipid peroxidation ในใบของทั้งหญ้าขจรจบ และ

ไมยราบยักษ์ สอดคล้องกับการทดลองของอินทรา (2550) ที่พบว่าเมื่อฉีดพ่นสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยน้ำกลั่นจาก *Hapalosiphon fontinalis* ส่งผลให้เกิด lipid peroxidation ในลำต้นหญ้าร้างนกและไมยราบยักษ์ และ Sanevas *et al.* (2007) ที่พบว่าสารสกัดหยาบด้วยเมทานอลจาก *Hapalosiphon* sp. สามารถชักนำให้เกิด lipid peroxidation ในรากของข้าวสาลีและรากหอม การเกิด lipid peroxidation ในใบพืชทั้งสองนี้ อาจเนื่องมาจากสารสกัดหยาบเป็นปัจจัยที่กระตุ้นให้เกิดออกซิเจนในรูปที่เป็นพิษกับพืช (ROS) เช่นเดียวกับสาร microcystin-RR ที่สกัดได้จากไซยาโนแบคทีเรีย *Microcystis aeruginosa* สามารถชักนำให้เซลล์ยาสูบมีการสะสม ROS มากขึ้น (Yin *et al.*, 2005) ซึ่งโมเลกุลของ ROS นี้สามารถไปออกซิไดซ์กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่เป็นองค์ประกอบของเมมเบรนส่งผลให้เกิด lipid peroxidation เป็นสาเหตุให้เมมเบรนถูกทำลาย และเกิดการเสื่อมสภาพของเซลล์ (Halliwell and Gutteridge, 1999) สอดคล้องกับลักษณะอาการผิดปกติที่ใบของไมยราบยักษ์คือ ใบไหม้และเหี่ยวแห้ง ส่วนใบของหญ้าจรจบผิดปกติเล็กน้อยคือ ใบช้ำเป็นจุด (ภาพที่ 26-27) ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการที่เมมเบรนถูกทำลายและเกิดการตายของเซลล์ เมื่อพิจารณาถึงประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบ จะเห็นว่าสารสกัดหยาบมีผลต่อไมยราบยักษ์มากกว่าหญ้าจรจบ เนื่องจากที่ความเข้มข้น 175 กรัม/น้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตรเท่ากัน ทำให้ปริมาณ MDA ในใบของไมยราบยักษ์ที่เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุมมีค่ามากกว่า (ภาพที่ 11) เช่นเดียวกับลักษณะอาการผิดปกติที่ใบของไมยราบยักษ์จะเห็นชัดเจนกว่า (ภาพที่ 26 ง และ 27 ง)

สำหรับในใบของถั่วเหลืองและข้าว พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเพิ่มขึ้น ทำให้ปริมาณ MDA ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม (ตารางที่ 3-4 และภาพที่ 9-11) แสดงว่าสารสกัดหยาบไม่มีผลทำให้เกิด lipid peroxidation ในใบของถั่วเหลืองและข้าว หรืออีกนัยหนึ่งคือพืชทั้งสองชนิดมีความต้านทานต่อสารสกัด ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะภายนอกที่เห็นคือ ไม่มีลักษณะผิดปกติเกิดขึ้นที่ใบพืช (ภาพที่ 28-29) เช่นเดียวกับสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยน้ำกลั่นจาก *Hapalosiphon fontinalis* ไม่มีผลทำให้เกิด lipid peroxidation ในถั่วเหลืองและข้าว (อินทรา, 2550) โดยทั่วไปในพืชที่ต้านทานเมื่ออยู่ในสภาวะเครียด จะมีการสร้าง antioxidant enzyme และ/หรือ antioxidant molecule เพื่อใช้กำจัด ROS ที่มากเกินไปซึ่งเป็นพิษกับเซลล์และก่อให้เกิด lipid peroxidation (Mittler, 2002) โดยมีรายงานว่าในใบของถั่วเหลืองที่ได้รับสารกำจัดวัชพืช linuron และ dimethenamid ทำให้ปริมาณ MDA ไม่แตกต่างกับชุดควบคุม และพบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ catalase เพิ่มขึ้น (Malencic *et al.*, 2008) และในใบของข้าวที่ได้รับเกลือมีกิจกรรมของเอนไซม์ superoxide dismutase และ ascorbate peroxidase ซึ่งเป็น antioxidant enzyme เพิ่มขึ้น ส่วน glutathione ซึ่งเป็น antioxidant molecule มีปริมาณลดลง (Fadzilla *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2001) ซึ่งเหตุนี้น่าจะเป็นสาเหตุทำให้ปริมาณ MDA ในใบของถั่วเหลืองและข้าวไม่แตกต่างกับชุดควบคุม

สำหรับในรานั้น สารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นทำให้ปริมาณ MDA ในรากของหญ้าจรจบไม่แตกต่างกับชุดควบคุม ส่วนรากของไมยราบยักษ์ ถั่วเหลือง และข้าว ปริมาณ MDA มีแนวโน้มลดลง (ภาพที่ 12) อาจเนื่องมาจากสารสกัดหยาบไม่มีผลทำให้เกิด lipid peroxidation ที่รากพืชหรืออาจเนื่องจากสารสกัดหยาบสามารถเคลื่อนย้ายจากบริเวณที่ได้รับสารมาที่มีผลที่บริเวณราก ซึ่งสารสกัดหยาบอาจกระตุ้นให้เกิด ROS แต่รากพืชมีความสามารถในการกำจัด ROS ได้ โดยมีรายงานว่ารากพืชเมื่อได้รับความเครียด สามารถกระตุ้นให้มีกิจกรรมของ antioxidant enzyme เพิ่มขึ้น (Bandeoglu *et al.*, 2004; Posmyk *et al.*, 2005)

ผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อกระบวนการ ammonia assimilation

กระบวนการ ammonia assimilation เป็นกระบวนการที่พืชเปลี่ยนแอมโมเนีย หรือแอมโมเนียมไอออนให้เป็นกรดอะมิโน โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ที่สำคัญคือ glutamine synthetase (GS) และ glutamate synthase (GOGAT) ดังนั้นถ้าเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องถูกยับยั้งจะส่งผลให้มีการสะสมแอมโมเนียมากเกินไปซึ่งเป็นพิษกับเซลล์ และเป็นอันตรายต่อต้นพืช (Devine *et al.*, 1993; Hopkins, 1999) จากการทดสอบผลของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยน้ำกลั่นจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อกระบวนการ ammonia assimilation ในวัชพืชและพืชปลูก พบว่าสารสกัดหยาบทำให้มีการสะสมแอมโมเนียในใบของหญ้าจรจบและถั่วเหลือง (ตารางที่ 5-7 และภาพที่ 13, 15, 17) โดยสาเหตุสำคัญน่าจะเกิดจากสารสกัดหยาบมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ GS ในใบของพืชทั้งสองชนิด เช่นเดียวกับสารกำจัดวัชพืชในกลุ่ม phosphinic acids ได้แก่ phosphinothricin (glufosinate) และ bialaphos รวมทั้งสาร methionine sulfoximine (MSO) และ tabtoxinine- β -lactam (tabtoxin) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ GS โดยตรง (ทศพล, 2545; Devine *et al.*, 1993) โดยมีรายงานว่าพืชที่ได้รับสาร MSO, bialaphos และ glufosinate จะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ GS ลดลง และมีการสะสมของแอมโมเนียเพิ่มขึ้น (Fentem *et al.*, 1983; Tachibana *et al.*, 1986; Coetzer and Al-Khatib, 2001) อย่างไรก็ตาม การสะสมแอมโมเนียอาจเกิดขึ้นเนื่องมาจากสาเหตุอื่น เช่น การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ glutamate synthase โดยสาร azaserine (Fentem *et al.*, 1983) หรือในกรณีของหญ้าจรจบอาจเป็นผลเนื่องมาจากการเกิด lipid peroxidation โดย Chien *et al.* (2000) พบว่าใบของข้าวที่ได้รับแคดเมียมที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นในสภาพที่มีแสงจะส่งเสริมให้เกิด lipid peroxidation มีกิจกรรมของเอนไซม์ GS ลดลง และมีการสะสมของแอมโมเนียเพิ่มขึ้น ซึ่งกระบวนการ lipid peroxidation จะเกิดขึ้นก่อน และอาจมีผลทำให้เอนไซม์ GS ถูกออกซิไดซ์ไปอยู่ในรูปที่ไม่ทำงาน (inactive) และง่ายต่อการเสียสภาพ จึงทำให้เกิดการสะสมของแอมโมเนีย จากผลการทดลองสารสกัดหยาบทำให้เกิด lipid peroxidation ในใบของหญ้าจรจบ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุ

หนึ่งที่ทำให้มีการสะสมแอมโมเนียในใบเช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้วข้างต้น และลักษณะผิดปกติที่เกิดขึ้นที่ใบของหญ้าจรจบ เมื่อได้รับสารสกัดหยาบ (ภาพที่ 26 ง) อาจเนื่องมาจากผลของทั้งสองกระบวนการร่วมกัน ส่วนในถั่วเหลืองสารสกัดหยาบทำให้มีการสะสมแอมโมเนียที่ใบโดยไม่ทำให้เกิด lipid peroxidation และไม่พบลักษณะผิดปกติเกิดขึ้น (ภาพที่ 28) อาจเนื่องมาจากปริมาณแอมโมเนียที่เพิ่มขึ้นมีค่าน้อยกว่าปริมาณแอมโมเนียในใบของหญ้าจรจบ (ภาพที่ 17) และอยู่ในระดับที่ไม่มากพอที่จะทำให้พืชแสดงอาการผิดปกติ เช่นเดียวกับใน palmer amaranth หลังจากได้รับสาร glufosinate ทำให้มีการสะสมแอมโมเนียเพิ่มขึ้นอย่างสม่ำเสมอ ก่อนที่ใบพืชจะแสดงอาการจุดเหลืองและไหม้ (Coetzer and Al-Khatib, 2001) ส่วนในรากของหญ้าจรจบและถั่วเหลือง เมื่อได้รับสารสกัดหยาบ พบว่ามีปริมาณแอมโมเนียลดลงจากชุดควบคุม (ตารางที่ 5, 7 และภาพที่ 13, 15, 18) อาจเป็นไปได้ว่า เมื่อใบมีการสะสมแอมโมเนียซึ่งแสดงถึงการเปลี่ยนแอมโมเนียไปเป็นกรดอะมิโนได้น้อยลง อาจทำให้ในรากพืชต้องมีการเปลี่ยนแอมโมเนียไปเป็นกรดอะมิโนให้เร็วขึ้นเพื่อส่งขึ้นไปใช้ที่ใบ จึงทำให้ปริมาณแอมโมเนียที่วัดได้ในรากลดลง โดยทั่วไปแอมโมเนียในรากจะถูกใช้ในการสังเคราะห์กรดอะมิโน glutamine และ asparagine ซึ่งสามารถเคลื่อนย้ายไปที่ใบโดยผ่านทางท่อลำเลียงน้ำ (vessel) ได้ (Heldt, 2005)

สำหรับในไมยราบยักษ์ พบว่าสารสกัดหยาบไม่ทำให้เกิดการสะสมแอมโมเนียทั้งในใบและราก (ตารางที่ 6 และภาพที่ 14) แสดงว่าสารสกัดหยาบไม่มีผลต่อกระบวนการ ammonia assimilation ในไมยราบยักษ์ หรือไมยราบยักษ์มีความต้านทานต่อสารสกัด และในข้าว พบว่าสารสกัดหยาบไม่มีผลต่อการสะสมแอมโมเนียในใบของข้าว แต่ทำให้มีการสะสมแอมโมเนียในรากเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 8 และภาพที่ 16, 18) อาจเนื่องมาจากสารสกัดหยาบมีการเคลื่อนย้ายจากใบไปสู่ราก และไปมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ GS ที่บริเวณราก ซึ่ง Hirel and Gadai (1980) ได้ศึกษาเอนไซม์ GS ในใบและรากของข้าว (*Oryza sativa* var. Delta) พบว่ามี 3 รูปแบบ (isoform) ได้แก่ GS 1 และ GS 2 พบในใบและ GS R ซึ่งพบในราก และการศึกษาของ Chien *et al.* (2000) ที่พบว่าปริมาณแคดเมียมที่มากเกินไปทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ GS 1 ลดลงแต่ไม่มีผลต่อเอนไซม์ GS 2 ดังนั้นสารสกัดหยาบอาจมีความจำเพาะกับเอนไซม์ GS ต่างรูปแบบกัน โดยมีผลต่อเอนไซม์ GS ในราก แต่ไม่มีผลต่อเอนไซม์ GS ในใบ จึงทำให้มีการสะสมแอมโมเนียเฉพาะในราก

ผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสง

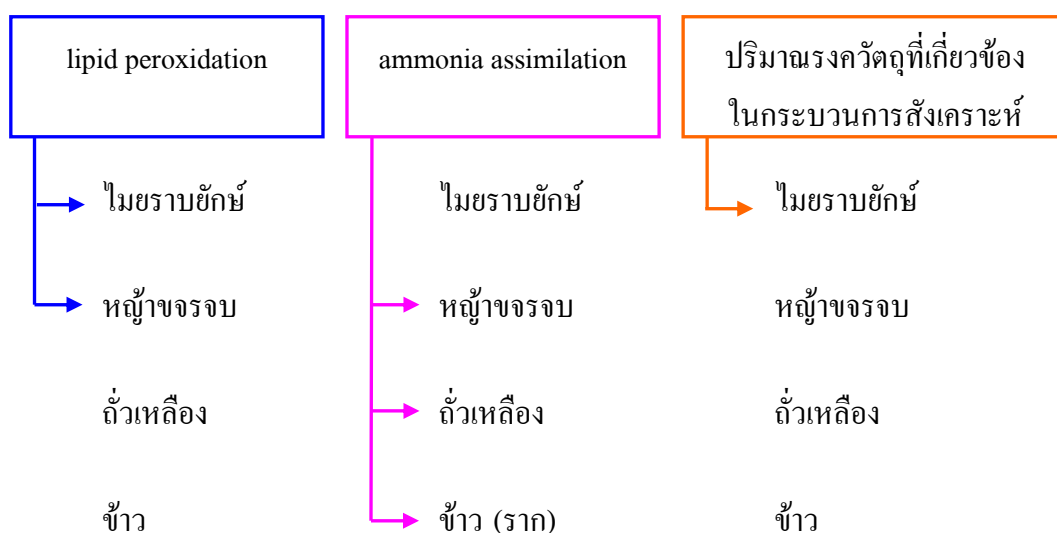
รงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสง ประกอบด้วยรงควัตถุที่สำคัญคือ คลอโรฟิลล์เอ และรงควัตถุประกอบได้แก่ คลอโรฟิลล์บีและแคโรทีนอยด์ (ศรีสม, 2549ก) ถ้ารงควัตถุเหล่านี้ถูกทำลายหรือมีปริมาณลดลง จะส่งผลให้ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงลดลงและทำให้การเจริญเติบโตของพืชลดลง จากการทดสอบผลของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยน้ำกลั่นจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์ในวัชพืชและพืชปลูก พบว่าสารสกัดหยาบมีผลทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์เอในไมยราบยักษ์ลดลงแตกต่างกับชุดควบคุม แต่ไม่มีผลต่อปริมาณคลอโรฟิลล์บีและแคโรทีนอยด์ (ตารางที่ 10 และภาพที่ 20, 23-25) อาจเนื่องมาจากสารสกัดหยาบมีผลไปทำลายคลอโรฟิลล์เอโดยตรง หรือสามารถยับยั้งการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์เอ โดยอาจมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์สำคัญที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ เช่น เอนไซม์ δ -aminolevulinic acid dehydratase, protoporphyrinogen oxidase และ Mg-chelatase (Devine *et al.*, 1993) โดยมีรายงานว่า สารกำจัดวัชพืชในกลุ่ม diphenylethers เช่น สาร acifluorfen, bifenox, nitrofen และ oxyfluorfen มีผลไปทำลายรงควัตถุของพืช โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ protoporphyrinogen oxidase ที่ทำหน้าที่เปลี่ยน protoporphyrinogen IX ให้เป็น protoporphyrin IX ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์เอ (ทศพล, 2545; Devine *et al.*, 1993) และการยับยั้งเอนไซม์ protoporphyrinogen oxidase นี้ อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิด ROS ส่งผลให้เกิดกระบวนการ lipid peroxidation ในใบของไมยราบยักษ์ดังที่รายงานไว้แล้วข้างต้น เนื่องจากเมื่อ protoporphyrinogen oxidase ถูกยับยั้ง ส่งผลให้เกิด singlet oxygen-generating protoporphyrin IX ในสภาพที่มีแสงและออกซิเจน จะทำให้เกิดเป็น singlet oxygen (1O_2) และเกิดปฏิกิริยา photooxidation ซึ่งสามารถทำลายโครงสร้างที่เป็น tetrapyrroles อย่างรวดเร็ว จึงทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลง (Haworth and Hess, 1988; Devine *et al.*, 1993) หรือในทางกลับกัน เมื่อสารสกัดหยาบทำให้เกิด lipid peroxidation ในใบของไมยราบยักษ์ อาจเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์เอลดลง รวมทั้งปริมาณคลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์ที่มีแนวโน้มลดลงเช่นกัน ดังที่กล่าวมาแล้วว่า เมื่อเกิด lipid peroxidation จะส่งผลให้ไขมันถูกทำลาย ซึ่งไขมันเป็นองค์ประกอบพื้นฐานของเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มออร์แกเนลล์ รวมถึงคลอโรพลาสต์ด้วย (Halliwell and Gutteridge, 1999) ดังนั้นเมื่อเกิด lipid peroxidation อาจเป็นผลให้เยื่อหุ้มไทลาคอยด์ถูกทำลาย คลอโรฟิลล์เอและรงควัตถุต่างๆ ที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มนั้นอาจถูกทำลายไปด้วย ดังรายงานของ Malanga *et al.* (1997) ที่พบว่าคลอโรพลาสต์ของ *Chlorella vulgaris* ที่ได้รับรังสี

UV-B จะได้รับความเสียหายที่เกิดจากโมเลกุลของ ROS โดยมีผลทำให้เชื้อหุ้มคลอโรพลาสต์เสื่อมสภาพ รวมทั้งทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์และกิจกรรมการสังเคราะห์แสงลดลง

สำหรับในหญ้าขจรจบ ถั่วเหลือง และข้าว พบว่าสารสกัดหยาบไม่มีผลทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์ลดลง (ตารางที่ 9, 11-12 และภาพที่ 19, 21-22) อาจเนื่องมาจากพืชทั้ง 3 ชนิดมีความต้านทานต่อสารสกัด โดยมีกลไกที่จะกำจัดความเป็นพิษที่เกิดขึ้น เช่น ในกรณีที่สารสกัดมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ พืชที่ต้านทานนั้น อาจมีความสามารถในการสังเคราะห์เอนไซม์เป้าหมายให้มากขึ้น เพื่อทดแทนเอนไซม์ที่ถูกทำลายไป (Sherman *et al.*, 1996) เช่นเดียวกับในข้าวสาลีที่ต้านทาน เมื่อได้รับสาร oxyfluorfen ที่ความเข้มข้นต่ำๆ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ protoporphyrinogen oxidase จะลดลงน้อยกว่าในข้าวบาร์เลย์ซึ่งเป็นพืชที่ไม่ต้านทาน และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ oxyfluorfen กิจกรรมของเอนไซม์จะค่อนข้างคงที่ในข้าวสาลี แต่จะลดลงอย่างต่อเนื่องในข้าวบาร์เลย์ อาจเพราะข้าวสาลีมีกลไกต้านทานที่ตำแหน่งของเอนไซม์เป้าหมาย (Choi *et al.*, 1999) ส่วนในหญ้าซึ่งมีปริมาณคลอโรฟิลล์เอเพิ่มขึ้น และในถั่วเหลืองที่มีปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นนั้น อาจเกิดจากพืชมีความสามารถกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์รงควัตถุต่างๆ เพิ่มขึ้น และสามารถป้องกันรงควัตถุต่างๆ ไว้ไม่ให้ถูกทำลายได้

จากการศึกษาผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาของพืช ได้แก่ การเกิด lipid peroxidation, ammonia assimilation และปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสง ทำให้สามารถทราบกลไกการทำลายของสารสกัดหยาบอย่างคร่าวๆ โดยที่สารสกัดหยาบมีผลต่อกระบวนการต่างๆ ในพืชแต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยพบว่าในพืชบางชนิด สารสกัดหยาบมีผลต่อกระบวนการหนึ่ง แต่ไม่มีผลต่ออีกกระบวนการหนึ่ง (ภาพที่ 31) ทั้งนี้ อาจเนื่องจากความสามารถหรือความต้านทานของพืชเองด้วย จากผลการทดลอง พบว่าสารสกัดหยาบส่งเสริมให้เกิด lipid peroxidation ในไมยราบยักษ์และหญ้าขจรจบ มีผลต่อ ammonia assimilation โดยทำให้มีการสะสมแอมโมเนียในใบของหญ้าขจรจบ ถั่วเหลือง และในรากของข้าว และยังมีผลทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์เอในไมยราบยักษ์ลดลง (ภาพที่ 31) และเมื่อพิจารณาควบคู่ไปกับลักษณะอาการผิดปกติที่เกิดขึ้น ในไมยราบยักษ์และหญ้าขจรจบ ซึ่งพบว่าเกิด lipid peroxidation จะแสดงอาการใบไหม้และเหี่ยวแห้ง และใบช้ำเป็นจุด ตามลำดับ อาจกล่าวได้ว่าสารสกัดหยาบมีกลไกหลักในการทำลายที่ทำให้พืชมีลักษณะผิดปกติเกิดขึ้นคือ การทำให้เกิด ROS จึงทำให้เกิด lipid peroxidation ในพืชทั้ง 2 ชนิด สำหรับในไมยราบยักษ์ ซึ่งพบว่าสารสกัดหยาบทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์เอลดลงด้วย อาจเนื่องมาจากเมื่อเกิด lipid peroxidation จึงส่งผลให้เชื้อหุ้มไทลาคอยด์ถูก

ทำลาย และทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลง ส่วนในหญ้าจรจบที่พบว่าสารสกัดหยาบทำให้เกิดการสะสมของแอมโมเนียด้วย อาจเกิดจาก ROS ไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ GS จึงทำให้เกิดการสะสมของแอมโมเนียดังที่ได้กล่าวมาแล้ว เช่นเดียวกับในสารกำจัดวัชพืชส่วนใหญ่ที่จะมีกลไกการทำลายหรือบริเวณเป้าหมายหลักเพียงหนึ่งตำแหน่งและส่งผลกระทบต่อกระบวนการอื่นเป็นลำดับขั้นต่อไป จนในที่สุดจะทำให้พืชตาย (Sherman *et al.*, 1996) ในขณะเดียวกันสารสกัดหยาบมีผลทำให้เกิดการสะสมของแอมโมเนียในถั่วเหลืองและรากของข้าว แต่ปริมาณแอมโมเนียอาจยังไม่มากพอที่จะทำให้มีลักษณะผิดปกติเกิดขึ้น อย่างไรก็ตาม การที่จะทราบกลไกการทำลายที่แท้จริงของสารประกอบอัลลิโลเคมีนั้นทำได้ยาก เนื่องจากสารนั้นมีบริเวณเป้าหมายที่จะเข้าทำลายได้หลายตำแหน่ง (Dayan *et al.*, 2000)



ภาพที่ 31 ผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาของพืชชนิดต่างๆ

นอกจากนี้ จากการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบกับสารกำจัดวัชพืชที่ทราบกลไกการทำลายแล้ว โดยฉีดพ่นสารกำจัดวัชพืช 1 ครั้ง (เมื่อวัชพืชอายุ 11 วัน หลังเพาะเมล็ด และพืชปลูกอายุ 13 วันหลังเพาะเมล็ด) ทั้งไว้ 2 วัน จึงเก็บตัวอย่างพืชมาวิเคราะห์การเกิดกระบวนการต่างๆ เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 โดยเทียบระหว่างประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบในการทำให้เกิด lipid peroxidation กับสารกำจัดวัชพืช paraquat ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิด ROS และส่งผลให้เกิด lipid peroxidation (Devine *et al.*, 1993) พบว่าปริมาณ MDA ที่เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุมในใบของทั้งไมยราบยักษ์และหญ้าจรจบเมื่อได้รับสารสกัดหยาบมีค่าน้อยกว่าเมื่อได้รับสาร paraquat ในความเข้มข้นที่เจือจางลงจากอัตราแนะนำ 4 เท่า (ภาพผนวกที่ 2 และ 3) เช่นเดียวกับ

เมื่อเทียบระหว่างประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบในการทำให้เกิดการสะสมแอมโมเนียกับสารกำจัดวัชพืช glufosinate ซึ่งเป็นสารที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ GS และส่งผลให้เกิดการสะสมแอมโมเนีย (Devine *et al.*, 1993) พบว่าปริมาณแอมโมเนียที่เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุมในใบของทั้งหญ้าจรจบและถั่วเหลืองเมื่อได้รับสารสกัดหยาบมีค่าน้อยกว่าเมื่อได้รับสาร glufosinate ในความเข้มข้นที่เจือจางลงจากอัตราแนะนำ 4 เท่า (ภาพผนวกที่ 3 และ 4) ซึ่งให้เห็นว่า ถึงแม้ว่าสารสกัดหยาบจะมีผลทำให้เกิด lipid peroxidation และการสะสมของแอมโมเนีย แต่เมื่อเทียบกับสารกำจัดวัชพืชแล้วยังมีผลน้อยกว่ามาก ส่วนเมื่อเทียบระหว่างประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบในการทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลง กับสารกำจัดวัชพืช oxyfluorfen ซึ่งเป็นสารที่สามารถยับยั้งการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์เอ (Devine *et al.*, 1993) พบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์เอในใบของไมยราบยักษ์เมื่อได้รับสารสกัดหยาบมีค่าลดลงจากชุดควบคุมมากกว่าเมื่อได้รับสาร oxyfluorfen (ภาพผนวกที่ 5) อาจเนื่องมาจากไมยราบยักษ์มีความต้านทานต่อสาร oxyfluorfen จึงทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์เอลดลงเล็กน้อย แต่ปริมาณคลอโรฟิลล์เอที่ลดลงเมื่อได้รับสารสกัดหยาบอาจเกิดขึ้นเนื่องจากผลของการเกิด lipid peroxidation ในไมยราบยักษ์

ความเสถียร (stability) ของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp.

การนำสารสกัดจากธรรมชาติมาประยุกต์ใช้เป็นสารควบคุมหรือสารกำจัดวัชพืชนั้น นอกจากการพิจารณาศักยภาพของสารสกัดที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและกระบวนการทางสรีรวิทยาต่างๆ ของทั้งวัชพืชและพืชปลูกแล้ว สิ่งที่ต้องคำนึงถึงเพื่อใช้เป็นแนวทางในการพิจารณา คือ การศึกษาความเสถียร (stability) ของสารสกัด หรืออายุการเก็บรักษา (shelf-life) (อัญชลี, 2551; Haig *et al.*, 2005) จากผลการทดลอง พบว่าทั้งระยะเวลาการเก็บรักษาสารสกัดหยาบและอุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษา ไม่ทำให้ปริมาณ MDA ในใบของไมยราบยักษ์มีความแตกต่างกันทางสถิติ แสดงว่าการเก็บรักษาสารสกัดหยาบไว้ 30 และ 60 วัน ไม่มีผลทำให้ประสิทธิภาพในการทำให้เกิด lipid peroxidation ของสารสกัดหยาบลดลงไม่ว่าจะเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 หรือ 30 องศาเซลเซียส อาจเป็นไปได้ว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสารสกัดหยาบที่ทำให้เกิด lipid peroxidation ยังมีความเสถียรอยู่ได้ในสารสกัด โดยไม่ขึ้นกับระยะเวลาและอุณหภูมิที่เก็บรักษา เช่นเดียวกับการทดลองของ Vieira and Fatibello-Filho (1998) ที่พบว่าเอนไซม์ peroxidase ในสารสกัดหยาบจาก zucchini (*Cucurbita pepo*) มีความเสถียรอยู่ได้ เมื่อมีการเติม polyvinylpyrrolidone ในขั้นตอนของการสกัด โดยทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเก็บรักษาสารสกัดหยาบไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 เดือน แต่แตกต่างกับความเสถียรของสารสกัดจากสะเดาที่สกัดด้วยน้ำ โดยอัญชลี (2551) กล่าวว่าสารสกัดสะเดาที่สกัดด้วยน้ำจะได้สารสกัดที่ไม่คงตัว หรือมีความเสถียรของสารต่ำ

มีเปอร์เซ็นต์ของสารออกฤทธิ์ลดลงอย่างรวดเร็ว และการทดลองของ Chansang *et al.* (2005) ซึ่งพบว่าสารสกัดหยาบจากคิปาลี (*Piper retrofractum* Vahl) ที่สกัดด้วยน้ำและเก็บรักษาเป็นระยะเวลานาน 2, 4 และ 8 วัน จะทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดลูกน้ำยุงได้ลดลง และพบว่าการเก็บรักษาสารสกัดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จะทำให้ประสิทธิภาพของสารลดลงมากกว่าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

แต่ในการทดลองนี้เมื่อดูจากแนวโน้มของลักษณะผิดปกติที่เกิดขึ้นกับไมยราบยักษ์ พบว่าสารสกัดหยาบที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 และ 60 วัน ทำให้ใบของไมยราบยักษ์แสดงลักษณะอาการไหม้และแห้งที่บริเวณใบและยอดมากขึ้น (ภาพที่ 30) แต่ปริมาณ MDA ไม่แตกต่างกัน และไม่แตกต่างกับการสกัดแล้วใช้ทันที (0 วัน) (ตารางที่ 13) อาจเนื่องมาจากสารสกัดหยาบที่ใช้น่าจะมีสารหลายชนิดรวมกัน ในช่วงเวลาของการเก็บรักษาสารสกัดหยาบ สารบางตัวอาจมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารไป ทำให้การออกฤทธิ์ของสารต่างไปจากเดิม โดย Macias *et al.* (2005) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและประสิทธิภาพของสารประกอบอัลลิโลเคมีในกลุ่ม benzoxazinones 2 ชนิด และสารที่เป็นผลผลิตจากการสลายตัวของสารนี้ ซึ่งมีสูตรโครงสร้างที่ต่างไปจากเดิมเล็กน้อย ต่อความสามารถในการยับยั้งความยาวราก พบว่าสารที่มีโครงสร้างต่างไปนี้ มีผลในการยับยั้งความยาวรากแตกต่างไปจากสารประกอบอัลลิโลเคมีเดิม จึงอาจกล่าวได้ว่า การเก็บรักษาสารสกัดหยาบไว้ที่อุณหภูมิสูง 4 และ 30 องศาเซลเซียส นาน 30 และ 60 วัน สารที่มีผลทำให้เกิดกระบวนการ lipid peroxidation ยังคงมีความเสถียรอยู่ในสารสกัดหยาบ จึงทำให้ปริมาณ MDA ไม่แตกต่างกัน และไม่แตกต่างกับการสกัดแล้วใช้ทันที แต่การเก็บรักษาสารสกัดหยาบไว้นานขึ้นและเก็บรักษาที่อุณหภูมิสูง อาจทำให้สารบางตัวเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไป เช่นเดียวกับสาร sennosides ในสารสกัดจาก senna ที่สกัดด้วยน้ำ จะมีการสลายตัวอย่างช้าๆ เมื่อเก็บไว้นานขึ้น แต่จะมีการสลายตัวเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิที่ใช้เก็บสูงขึ้น (deMaria *et al.*, 1995) และสารบางตัวที่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปนี้ อาจมีผลต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาอื่น จึงทำให้ไมยราบยักษ์ที่ได้รับสารสกัดหยาบที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 30 และ 60 วันแสดงลักษณะอาการใบไหม้และแห้งมากกว่าที่ 4 องศาเซลเซียส และ 0 วัน เช่นเดียวกับ Haig *et al.* (2005) ทดสอบความเสถียรของสารสกัดหยาบจากพืชประจำปีของออสเตรเลียชนิดหนึ่งซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งความยาวรากของ annual ryegrass โดยระยะเวลาในการเก็บรักษา คือ 2, 4, 8, 16 และ 32 วันหลังจากสกัดสาร และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นทำให้ความยาวรากของ annual ryegrass ถูกยับยั้งมากขึ้น

สำหรับในราก พบว่าเมื่อพิจารณาทั้งระยะเวลาการเก็บรักษาสารสกัดหยาบและอุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษา พบว่าไม่ทำให้ปริมาณ MDA มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่ถ้าพิจารณาทีละปัจจัยจะพบว่าระยะเวลาในการเก็บรักษา 30 และ 60 วัน ทำให้ปริมาณ MDA มีค่าลดลง แสดงว่าการเก็บสารสกัดหยาบไว้นาน 30 และ 60 วัน อาจมีสารบางตัวที่เปลี่ยนแปลงโครงสร้างไป และสามารถกระตุ้นให้รากพืชมีการสร้างสาร antioxidant enzyme และ/หรือ antioxidant molecule ได้มากขึ้น ซึ่งสามารถช่วยกำจัด ROS ที่เกิดขึ้นและทำให้ปริมาณ MDA ลดลง

จากการศึกษาผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาของพืช และการศึกษาความเสถียรของสารสกัดหยาบ อาจกล่าวโดยรวมได้ว่า สารสกัดหยาบมีกลไกหลักในการทำลายคือ การทำให้เกิด ROS ซึ่งจะส่งผลให้เกิด lipid peroxidation และอาจส่งผลเกี่ยวเนื่องต่อกระบวนการอื่นต่อไป จนในที่สุดทำให้พืชแสดงลักษณะอาการผิดปกติออกมา ซึ่งพบว่าสารสกัดหยาบมีผลทำให้ใบของไมยราบยักษ์ซึ่งเป็นตัวแทนของวัชพืชใบเลี้ยงคู่ มีลักษณะผิดปกติเห็นชัดเจนที่สุดรองลงมาคือ หญ้าขจรจบซึ่งเป็นตัวแทนของวัชพืชใบเลี้ยงเดี่ยว แต่ไม่มีผลในถั่วเหลืองและข้าวซึ่งเป็นตัวแทนของพืชปลูกชี้ให้เห็นว่าสารสกัดมีแนวโน้มที่จะทำลายวัชพืชใบเลี้ยงคู่ได้มากกว่าวัชพืชใบเลี้ยงเดี่ยว และไม่มีผลต่อพืชปลูก อย่างไรก็ตามการศึกษารั้งนี้ใช้พืชอย่างละชนิดเป็นตัวแทนของวัชพืชใบเลี้ยงคู่ วัชพืชใบเลี้ยงเดี่ยว พืชปลูกใบเลี้ยงคู่ และพืชปลูกใบเลี้ยงเดี่ยว ตามลำดับ จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงผลของสารสกัดหยาบต่อพืชชนิดอื่นๆ ต่อไป และในการทดลองนี้ พบว่าสารสกัดหยาบยังมีความเสถียรหรือมีประสิทธิภาพในการทำให้เกิด lipid peroxidation หลังจากการสกัด 60 วัน ไม่ว่าจะเก็บรักษาที่ 4 หรือ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. มีศักยภาพที่จะนำมาพัฒนาเป็นสารควบคุมหรือกำจัดวัชพืชได้ โดยมีแนวโน้มที่จะมีผลต่อวัชพืชได้มากกว่าพืชปลูก และถึงแม้ว่าสารสกัดหยาบจะไม่ทำให้วัชพืชตายในทันที แต่ก็ทำให้ใบมีลักษณะผิดปกติ และอาจทำให้การเจริญเติบโตลดลง รวมทั้งเมื่อเทียบกับสารกำจัดวัชพืชแล้ว สารสกัดหยาบมีผลน้อยกว่ามาก อย่างไรก็ตามสารสกัดหยาบน่าจะมีประโยชน์ในระยะยาวได้ โดย Chou (1995) กล่าวว่าสารประกอบอัลลิโลเคมีนั้นสามารถสลายตัวได้อย่างรวดเร็ว ทำให้ไม่เป็นพิษกับสิ่งแวดล้อม และมีประโยชน์ในการทำการเกษตรแบบยั่งยืน ดังนั้นสารสกัดหยาบจากไซยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon* sp. ก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการนำไปพัฒนาใช้เป็นสารควบคุมหรือกำจัดวัชพืชในการทำการเกษตรแบบยั่งยืนได้

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. สารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. มีผลทำให้เกิด lipid peroxidation ในใบของหญ้าขจรจบ และไมยราบยักษ์ โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดจะทำให้เกิด lipid peroxidation เพิ่มขึ้น และสารสกัดมีผลต่อไมยราบยักษ์มากกว่าหญ้าขจรจบ
2. สารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. มีผลต่อกระบวนการ ammonia assimilation โดยทำให้เกิดการสะสมแอมโมเนียในใบของหญ้าขจรจบ ถั่วเหลือง และในรากของข้าว และสารสกัดมีผลต่อหญ้าขจรจบมากกว่าถั่วเหลือง
3. สารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. มีผลต่อปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสงไม่มาก โดยไม่ทำให้ปริมาณรงควัตถุลดลง ยกเว้นในไมยราบยักษ์เท่านั้นที่มีปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลง
4. สารสกัดหยาบยังมีความเสถียรอย่างน้อย 60 วันหลังจากการสกัด ไม่ว่าจะเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 หรือ 30 องศาเซลเซียส และมีแนวโน้มที่จะทำให้พืชมีลักษณะอาการผิดปกติมากขึ้น เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิสูงเป็นระยะเวลานาน
5. สารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. มีแนวโน้มที่จะสามารถนำไปใช้กำจัดไมยราบยักษ์ได้ โดยไม่มีผลต่อพืชปลูก เช่น ถั่วเหลือง และข้าว

ข้อเสนอแนะ

1. จากการทดลองจะเห็นว่าสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ทำให้ไมยราบยักษ์และหญ้ายจรจบแสดงอาการผิดปกติ เพียงทำให้ใบแห้งไหม้ และใบช้ำ ตามลำดับ แต่ยังไม่ทำให้พืชตาย ดังนั้นในการฉีดพ่นควรมีการเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดให้สูงขึ้น หรือเพิ่มจำนวนครั้งในการฉีดพ่นให้มากขึ้น เพื่อจะทำให้เห็นผลชัดเจนขึ้น แต่อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องใช้ปริมาณเซลล์แห้งมากขึ้นด้วย และในขั้นตอนของการสกัดเมื่อใช้ปริมาณเซลล์แห้งมากขึ้นจะทำให้การกรองเอาเซลล์ออกจากสารสกัดทำได้ยาก ดังนั้นอาจต้องมีการพัฒนาในเรื่องการเลี้ยงให้ได้ปริมาณเซลล์แห้งมากขึ้น และวิธีการสกัดให้ง่ายขึ้น
2. เพื่อความสะดวกในการนำสารสกัดหยาบไปใช้จริง อาจต้องมีการทดสอบความเสถียรของสารสกัดหยาบในระยะเวลาที่นานกว่านี้ หรืออาจทดลองเก็บในรูปของเซลล์แห้ง เพื่อทดสอบว่าสามารถเก็บได้นานกว่าหรือไม่
3. ควรมีการศึกษาถึงผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อพืชชนิดอื่นๆ ด้วย และควรมีการทดลองในสภาพแปลงปลูกจริง

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กาญจนภานันท์ ลีวมนอนต์. 2527. สาหร่าย. คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- จุฬาพันธุ์ รัตนนิล. 2549. ผลของสารชีวภาพจากอาหารเลี้ยงและสารสกัดไชยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon* sp. ต่อการเจริญเติบโตของถั่วเขียวและหัวหอม. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ณัฐฐา เสนีवास. 2543. ผลของสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในสกุล *Scytonema* และ *Hapalosiphon* ต่อการเจริญเติบโตของวัชพืชและพืชปลูกบางชนิด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ณรงค์ วงศ์กันทรกร. 2548. ผลของสารสกัดจากไชยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon fontinalis* (Ag.) Borner TISTR 8437 ต่อการถ่ายทอดอิเล็กทรอนิกส์ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงและการงอกของเมล็ด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พหลรัฐ นพสิทธิพร. 2549. ผลของสารสกัดจากไชยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon fontinalis* (Ag.) Borner ต่อการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของปลายรากหอม (*Allium ascalonicum* L.). ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ทศพล พรพรหม. 2545. สารกำจัดวัชพืช: หลักและกลไกการทำลาย. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- พุดิตา พันจี. 2550.ฤทธิ์ของสารสกัดจากไชยาโนแบคทีเรีย *Scytonema varium* TISTR 8277 ต่อการเคลื่อนย้ายอิเล็กทรอนิกส์ในกระบวนการสังเคราะห์แสง การงอก และการเจริญเติบโตของวัชพืชและพืชปลูกบางชนิด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เพ็ญญา จำปาศรี. 2547. ผลของสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Hapalosiphon* sp. ต่อการเจริญเติบโตของพืชบางชนิด. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิชชา ครองยุติ. 2549. ผลของสารสกัดจากไชยานแบคทีเรีย *Fischerella muscicola* (Thuret)

Gomont TISTR 8215 และ *Fischerella* sp. TISTR 8975 ต่อการออกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของต้นกล้าวัชพืชและพืชปลูกบางชนิด และการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิริพรรณ สุขขัง. 2550. ผลของสารสกัดจากไชยานแบคทีเรีย *Hapalosiphon* sp. ต่อการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของปลายรากหอมและการเกิด lipid peroxidation ในไมยราบยักษ์. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศรีสม สุวรรณวงศ์. 2549ก. คาร์บอนเมแทบอลิซึม, น. 97-151. ใน ลิลลี่ กาวิตะ มาลี ณ นคร, ศรีสม สุวรรณวงศ์ และ สุริยา ตันติวิวัฒน์, ผู้รวบรวม. **สรีรวิทยาของพืช**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____. 2549ข. ไนโตรเจนเมแทบอลิซึม, น. 169-174. ใน ลิลลี่ กาวิตะ, มาลี ณ นคร, ศรีสม สุวรรณวงศ์ และ สุริยา ตันติวิวัฒน์, ผู้รวบรวม. **สรีรวิทยาของพืช**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร. 2549. รายงานสรุปการนำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตรปี พ.ศ. 2549. แหล่งที่มา:
<http://www.doa.go.th/ard/pdf/ImpPest49.pdf>, 10 กรกฎาคม 2550.

สุภาพร พันจี. 2544. อิทธิพลของสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (*Scytonema* sp. TISTR8208 และ *Hapalosiphon* sp.) ต่อการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมศักดิ์ แสนสุข. 2530. สาหร่าย. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒประสานมิตร.

อัญชลี สวงนพงษ์. 2551. ผลกระทบจากสละเค: เรื่อยอยู่ตรงไหน? และกำลังจะไปทางใด?. การ
ผลิตสารสกัดสละเคเชิงธุรกิจ. แหล่งที่มา: [www.ird.rmutt.ac.th/exec/data/paper/สละเค-เร
อยู่ตรงไหน.pdf](http://www.ird.rmutt.ac.th/exec/data/paper/สละเค-เร
อยู่ตรงไหน.pdf), 19 มิถุนายน 2551.

อินทิรา ชูดแก้ว. 2548. ผลของสารสกัดจากไชยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon fontinalis* (Ag.)
Bornet ต่อการเกิด lipid peroxidation ในพืชบางชนิด. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี,
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

_____. 2550. ผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากไชยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon fontinalis*
(Ag.) **Bornet** ต่อการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส การเกิด lipid peroxidation รงควัตถุที่
เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสง และกระบวนการ ammonia assimilation ในพืช
บางชนิด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อุไรวรรณ ดวงสิน. 2544. การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชในการควบคุมโรคเหี่ยวจาก
แบคทีเรียของมะเขือเทศ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Bandeoglu, E., F. Eyidogan, M. Yucel and H. A. Oktem. 2004. Antioxidant responses of shoots
and roots of lentil to NaCl-salinity stress. **Plant Growth Regulation** 42: 69-77.

Baskin, S. I. and H. Salem. 1997. **Oxidants, Antioxidants and Free Radicals**. Taylor &
Francis, London.

Batish, D. R., N. Setia, H.P. Singh and R.K. Kohli. 2004. Phytotoxicity of lemon-scented
eucalypt oil and its potential use as a bioherbicide. **Crop Protection** 23: 1209-1214.

Bonjouklian, R., R. E. Moore, G. M. L. Patterson and T. A. Smitka. 1995. **A89271 Factor and
Processes for Their Production**. U. S. Patent 5, 457, 119.

- Chansang, U., N. S. Zahiri, J. Bansiddhi, T. Boonruad, P. Thongsirak, J. Mingmuang, N. Benjapong and M. S. Mulla. 2005. Mosquito larvicidal activity of aqueous extracts of long pepper (*Piper retrofractum* Vahl) from Thailand. **Journal of Vector Ecology** 30 (2): 195-200.
- Chappelle, E. W. and M. S. Kim. 1992. Ratio analysis of reflectance spectra (RARS): an algorithm for the remote estimation of the concentrations of chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoids in soybean leaves. **Remote sensing of environment** 39: 239-247.
- Chauhan, V. S. and S. N. Bagchi. 1992. Effect of an antibiotic from *Oscillatoria* sp. on phytoplankters, higher plants and mice. **New Phytologist** 120: 251-257.
- Chien, H., C. C. Lin, J. Wang, C. T. Chen and C. H. Kao. 2000. Changes in ammonium ion content and glutamine synthetase activity in rice leaves caused by excess cadmium are a consequence of oxidative damage. **Plant Growth Regulation** 00: 1-7.
- Choi, J. S., H. J. Lee, I. T. Hwang, J. Y. Pyon and K. Y. Cho. 1999. Differential susceptibilities of wheat and barley to diphenyl ether herbicide oxyfluorfen. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 65: 62-72.
- Chorus, I. and J. Bartram. 1999. **Toxic Cyanobacteria in Water : A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management**. E & FN Spon, London.
- Chou, C. 1995. Allelopathy and sustainable agriculture, pp. 211-223. In Inderjit, K. M. M. Dakshini and F. A. Einhellig, eds. **Allelopathy: Organisms, Processes and Applications**. American Chemical Society, Washington, DC.
- Coetzer, E. and K. Al-Khatib. 2001. Photosynthetic inhibition and ammonium accumulation in palmer amaranth after glufosinate application. **Weed Science** 49: 454-459.

- Dat, J., S. Vandenabeele, E. Vranova, M. V. Montagu, D. Inze and F. V. Breusegem. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cellular and Molecular Life Sciences** 57: 779-795.
- Dayan, F. E., J. G. Romagni and S. O. Duke. 2000. Investigating the mode of action of natural phytotoxins. **Journal of Chemical Ecology** 26 (9): 2079-2094.
- deMaria, L., C. Lasciarrea, P. Micheli and H. Schmiersahl. 1995. **Stable Formulation of Plant Extract**. U.S. Patent 5, 389, 372.
- Desikachary, T. V. 1959. **Cyanophyta**. Indian Council of Agricultural Research, New Delhi.
- Devine, M. D., S. O. Duke and C. Fedtke. 1993. **Physiology of Herbicide Action**. P T R Prentice Hall, New Jersey.
- Fadzilla, N. M., R. P. Finch and R. H. Burdon. 1997. Salinity, oxidative stress and antioxidant responses in shoot cultures of rice. **Journal of Experimental Botany** 48(307): 325-331.
- Fentem, P. A., P. J. Lea and G. R. Stewart. 1983. Action of inhibitors of ammonia assimilation on amino acid metabolism in *Hordeum vulgare* L. (cv. Golden Promise). **Plant Physiology** 71: 502-506.
- Gleason, F. K. and J. L. Paulson. 1984. Site of action of the natural algicide, cyanobacterin, in the blue-green alga, *Synechococcus* sp. **Archives of Microbiology** 138:273-277.
- Gleason, F. K. and D. E. Case. 1986. Activity of the natural algicide, cyanobacterin, on angiosperms. **Plant Physiology** 80: 834-837.

- Gouveia L. and J. Empis. 2003. Relative stabilities of microalgal carotenoids in microalgal extracts, biomass and fish feed: effect of storage condition. **Innovative Food Science and Emerging Technologies** 4: 227-233.
- Haig, T., J. Pratley, T. Haig and S. Hildebrand. 2005. Using allelopathy to search for new natural herbicides from plants, pp. 565-568. *In* J. D. I. Harper, M. An, H. Wu and J. H. Kent, eds. **Fourth World Congress on Allelopathy**. Charles Sturt University, Wagga Wagga, Australia.
- Hagmann, L. and F. Jüttner. 1996. Fischerellin A, a novel photosystem-II-inhibiting allelochemical of the cyanobacterium *Fischerella muscicola* with antifungal and herbicidal activity. **Tetrahedron Letters** 37 (36): 6539-6542.
- Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge. 1999. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford Science Publication, London.
- Haworth, P. and F. D. Hess. 1988. The generation of singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) by the nitrodiphenyl ether herbicide oxyfluorfen is independent of photosynthesis. **Plant Physiology** 86: 672-676.
- Heldt, H. 2005. **Plant Biochemistry**. 3rd ed. Academic Press, Burlington, USA.
- Hirata, K., S. Yoshitomi, S. Dwi, O. Iwabe, A. Matakant, J. Polchai and K. Miyamoto. 2003. Bioactivities of nostocine produced by a freshwater cyanobacterium *Nostoc spongiaeforme* TISTR 8169. **Journal of Bioscience and Bioengineering** 95 (5): 512-517.
- Hirel, B. and P. Gadal. 1980. Glutamine synthetase in rice. **Plant Physiology** 66: 619-623.
- Hiscox, J. D. and G. F. Israelstam. 1978. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany** 57: 1332-1334.

- Hodges, D. M., J. M. Delong, C. F. Forney and R. K. Prange. 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissue containing anthocyanin and other interfering compounds. **Planta** 207: 604-611.
- Hopkins, W. G. 1999. **Introduction to Plant Physiology**. 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Inze, D. and M. V. Montagu. 2002. **Oxidative Stress in Plants**. Taylor & Francis, London.
- Iturbe-Ormaetxe, I., P. R. Escuredo, C. Arrese-Igor and M. Becana. 1998. Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat. **Plant Physiology** 116: 173-181.
- Ivanov, S. V., V. S. Alexieva and E. N. Karanov. 2005. Cumulative effect of low and high atrazine concentrations on *Arabidopsis thaliana* plants. **Russian Journal of Plant Physiology** 52 (2): 213-219.
- Jiang, M. and J. Zhang. 2001. Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defence system and oxidative damage in leaves of maize seedlings. **Plant Cell Physiology** 42 (11): 1265-1273.
- Kim, J. -S., T. -J. Kim, O. K. Kwon and K. Y. Cho. 2002. Mechanisms of action of sulcotrione, a 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitor, in developed plant tissues. **Photosynthetica** 40 (4): 541-545.
- Leather, G. R. and F. A. Einhellig. 1988. Bioassay of naturally occurring allelochemicals for phytotoxicity. **Journal of Chemical Ecology** 14 (10): 1821-1828.
- Lee, R. E. 1995. **Phycology**. 2nd Edition. Cambridge University Press, New York.
- Lee, D. H., Y. S. Kim and C. B. Lee. 2001. The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Plant Physiology** 158: 737-745.

- Leflaive, J. and L. Ten-Hage. 2007. Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. **Freshwater Biology** 52: 199-214.
- Lin, C. C. and C. H. Kao. 1996. Disturbed ammonium assimilation is associated with growth inhibition of roots in rice seedlings caused by NaCl. **Plant Growth Regulation** 18 (3): 233-238.
- Macias, F. A., D. Marin, A. Oliveros-Bastidas, D. Castellano, A. M. Simonet and J. M. G. Molinillo. 2005. Structure-activity relationships (SAR) studies of benzoxazinones, their degradation products and analogues. Phytotoxicity on standard target species (STS). **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 53: 538-548.
- Malanga, G., G. Calmanovici and S. Puntarulo. 1997. Oxidative damage to chloroplasts from *Chlorella vulgaris* exposed to ultraviolet-B radiation. **Physiologia Plantarum** 101: 455-462.
- Malencic, D. R., J. A. Miladinovic and M. T. Popovic. 2008. Effects of linuron and dimethenamid on antioxidant systems in weeds associated with soybean. **Central European Journal of Biology** 3(2): 155-160.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science** 7 (9): 405-410.
- Posmyk, M. M., C. Bailly, K. Szafranska, K. M. Janas and F. Corbineau. 2005. Antioxidant enzymes and isoflavonoids in chilled soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seedlings. **Journal of Plant Physiology** 162: 403-412.
- Rippka, R., J. Deruelles, J. B. Waterbury, M. Herdman and R. Y. Stanier. 1979. Genetic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology** 111: 1-61.

- Sampietro, D. A., M. A. Vattuone and M. I. Isla. 2006. Plant growth inhibitors isolated from sugarcane (*Saccharum officinarum*) straw. **Journal of Plant Physiology** 163: 837-846.
- Sanevas, N., Y. Sunohara and H. Matsumoto. 2006. Crude extract of the cyanobacterium, *Hapalosiphon* sp., causes a cessation of root elongation and cell division in several plant species. **Weed Biology and Management** 6 (1): 25-29.
- _____. 2007. Characterization of reactive oxygen species-involved oxidative damage in *Hapalosiphon* species crude extract-treated wheat and onion roots. **Weed Biology and Management** 7 (3): 172-177.
- Sherman, T. D., K. C. Vaughn and S. O. Duke. 1996. Mechanisms of action and resistance to herbicides, pp. 13-35. In S. O. Duke, ed. **Herbicide-Resistant Crops**. CRC Press, New York.
- Smith, G. D. and N. T. Doan. 1999. Cyanobacterial metabolites with bioactivity against photosynthesis in cyanobacteria, algae and higher plants. **Journal of Applied Phycology** 11: 337-344.
- Tachibana, K., T. Watanabe, Y. Sekizawa and T. Takematsu. 1986. Accumulation of ammonia in plants treated with bialaphos. **Journal of Pesticide Science** 11: 33-37.
- Taiz, L. and E. Zeiger. 2002. **Plant Physiology**. 3rd Edition. Sinauer Associates, Inc., Massachusetts.
- Velikova, V., I. Yordanov and A. Edreva. 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants protective role of exogenous polyamines. **Plant Science** 151: 59-66.

Vieira, I. C. and O. Fatibello-Filho. 1998. Flow injection spectrophotometric determination of hydrogen peroxide using a crude extract of zucchini (*Cucurbita pepo*) as a source of peroxidase. **The Analyst** 123: 1809-1812.

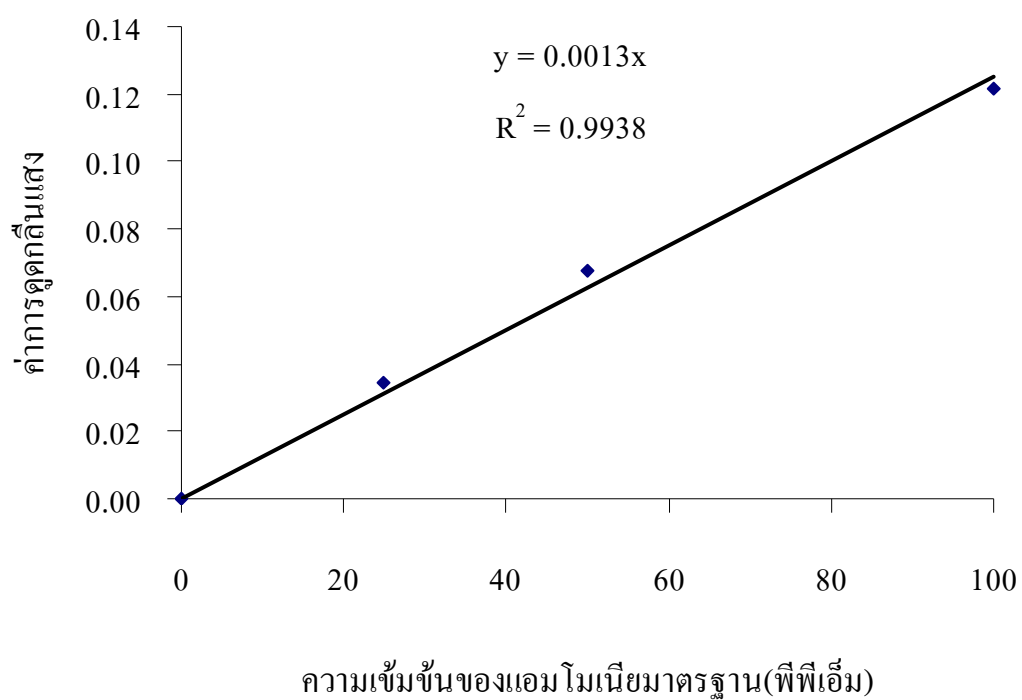
Weatherburn, M. W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Analytical Chemistry** 39 (8): 971-974.

Weir, T. L., S. W. Park and J. M. Vivanco. 2004. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. **Current Opinion in Plant Biology** 7: 472-479.

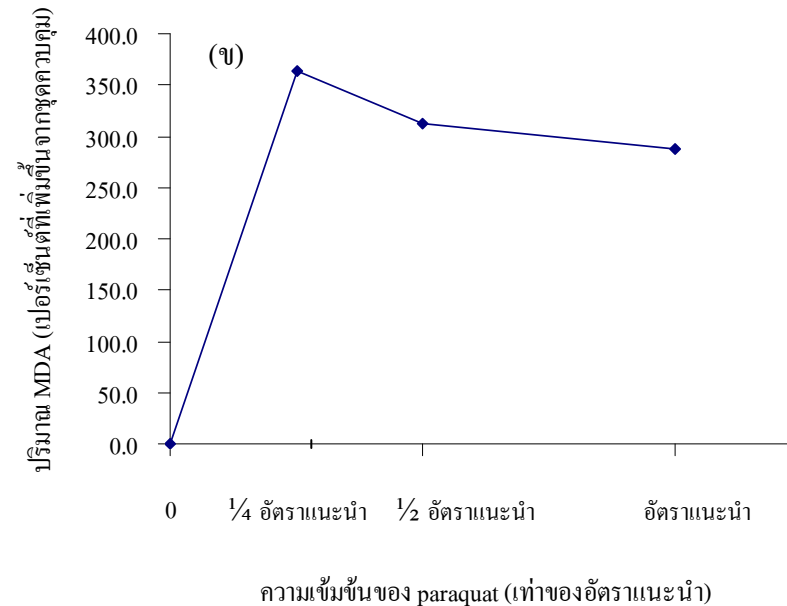
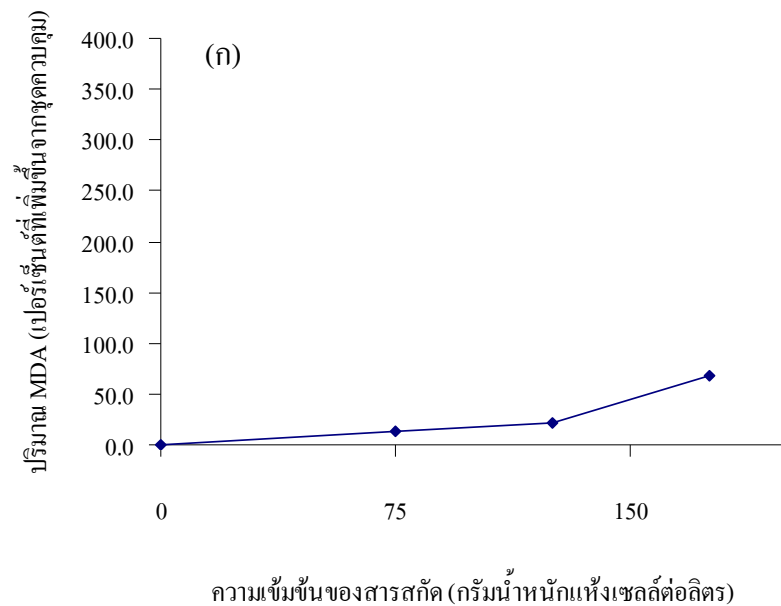
Wendler, C., M. Barniske and A. Wild. 1990. Effect of phosphinothricin (glufosinate) on photosynthesis and photorespiration of C₃ and C₄ plants. **Photosynthesis Research** 24 (1): 55-61.

Yin, L., J. Huang, W. Huang, D. Li, G. Wang and Y. Liu. 2005. Microcystin-RR-induced accumulation of reactive oxygen species and alteration of antioxidant systems in tobacco BY-2 cells. **Toxicon** 46: 507-512.

ภาคผนวก

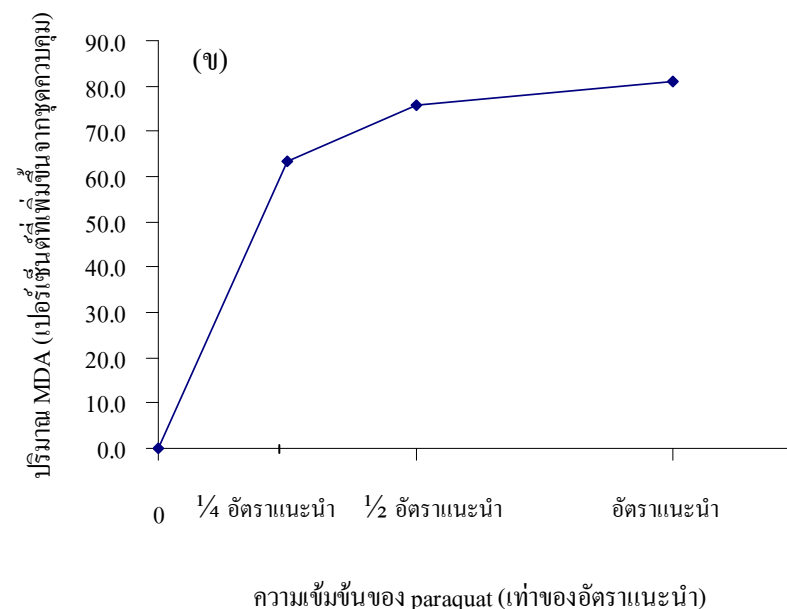
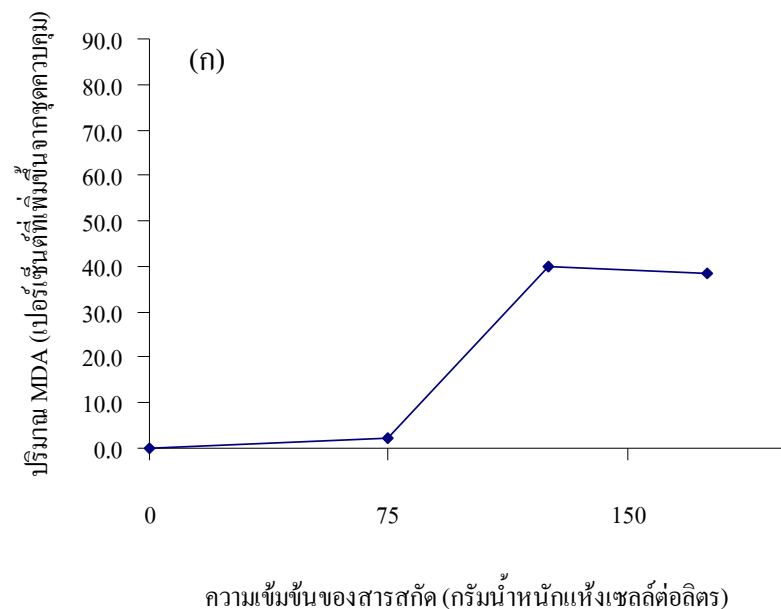


ภาพผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานของสารละลายแอมโมเนียมาตรฐาน



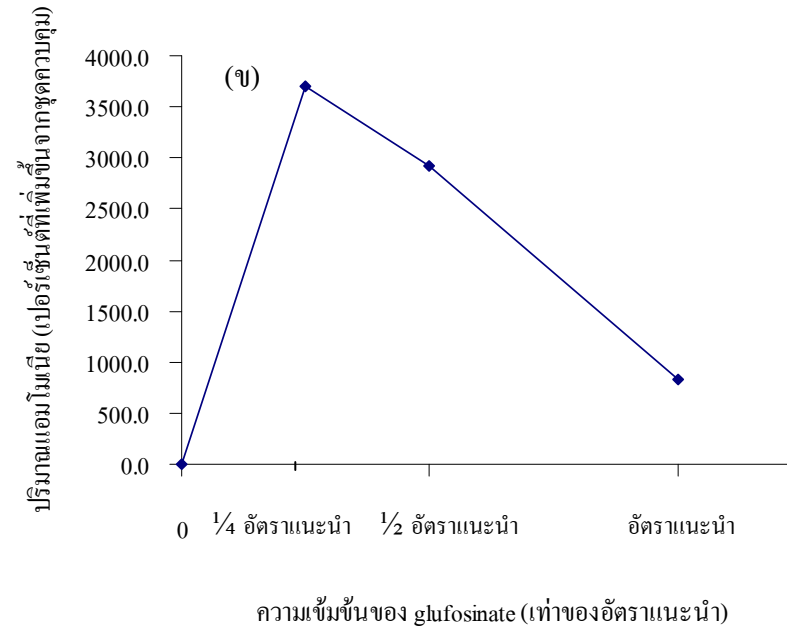
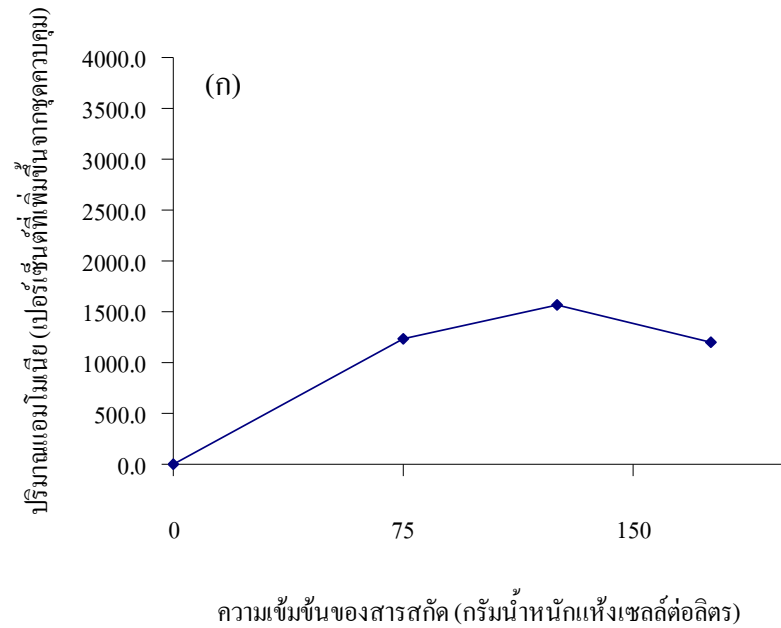
ภาพผนวกที่ 2 ปริมาณ MDA ในใบของไมยราบยักษ์เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ที่เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม หลังจากได้รับ (ก) สารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. (ข) สารกำจัดวัชพืช paraquat ที่ความเข้มข้นต่างๆ

หมายเหตุ: สำหรับสารกำจัดวัชพืช paraquat ฉีดพ่น 1 ครั้ง เมื่อไมยราบยักษ์อายุ 11 วันหลังเพาะเมล็ด และทิ้งไว้ 2 วันจึงเก็บตัวอย่างพืชมาวิเคราะห์ปริมาณ MDA



ภาพผนวกที่ 3 ปริมาณ MDA ในใบของหญาจรจบเมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ที่เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม หลังจากได้รับ (ก) สารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. (ข) สารกำจัดวัชพืช paraquat ที่ความเข้มข้นต่างๆ

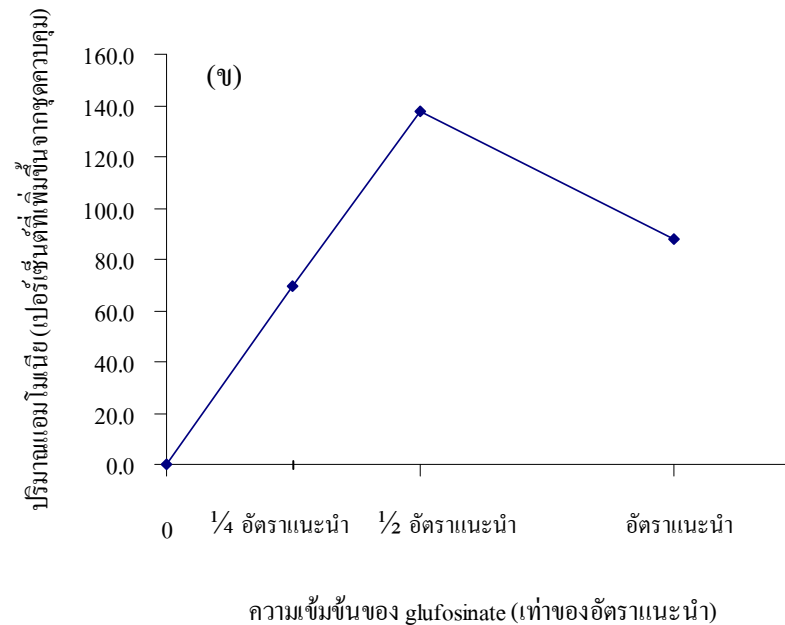
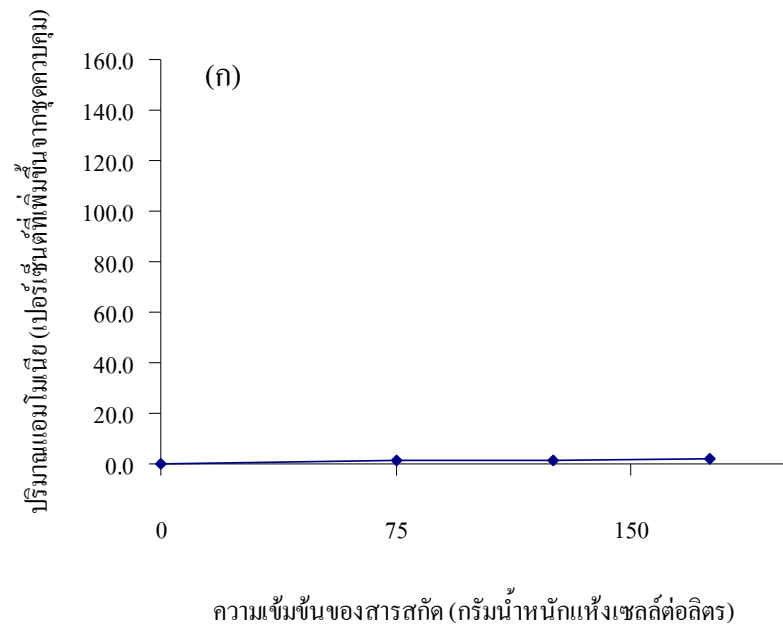
หมายเหตุ: สำหรับสารกำจัดวัชพืช paraquat ฉีดพ่น 1 ครั้ง เมื่อหญาจรจบอายุ 11 วันหลังเพาะเมล็ด และทิ้งไว้ 2 วันจึงเก็บตัวอย่างพืชมาวิเคราะห์ปริมาณ MDA



ภาพผนวกที่ 4 ปริมาณแอมโมเนียในใบของหอยาจรจบเมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ที่เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม หลังจากได้รับ (ก) สารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp.

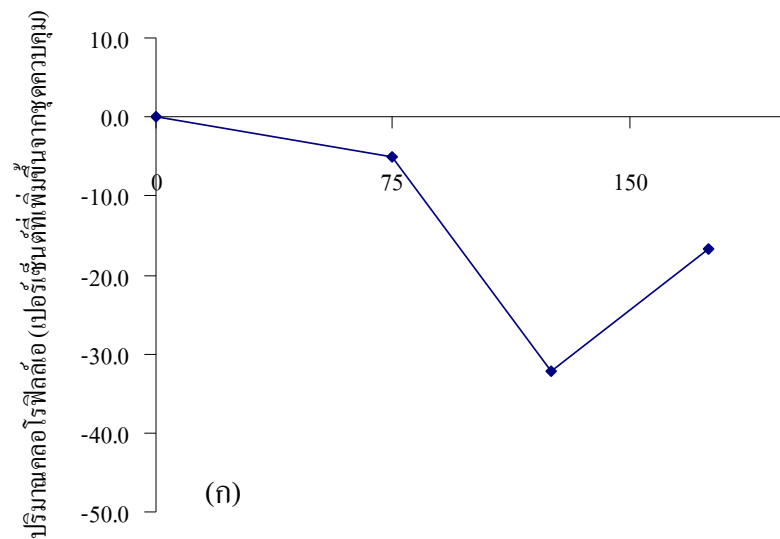
(ข) สารกำจัดวัชพืช glufosinate ที่ความเข้มข้นต่างๆ

หมายเหตุ: สำหรับสารกำจัดวัชพืช glufosinate ฉีดพ่น 1 ครั้ง เมื่อหอยาจรจบอายุ 11 วันหลังเพาะเมล็ด และทิ้งไว้ 2 วันจึงเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย

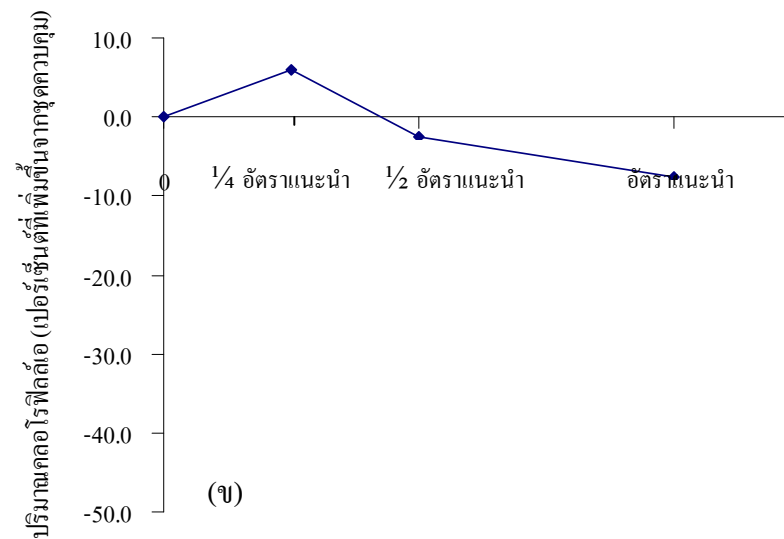


ภาพผนวกที่ 5 ปริมาณแอมโมเนียในใบของถั่วเหลืองเมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ที่เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม หลังจากได้รับ (ก) สารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. (ข) สารกำจัดวัชพืช glufosinate ที่ความเข้มข้นต่างๆ

หมายเหตุ: สำหรับสารกำจัดวัชพืช glufosinate ฉีดพ่น 1 ครั้ง เมื่อถั่วเหลืองอายุ 13 วันหลังเพาะเมล็ด และทิ้งไว้ 2 วันจึงเก็บตัวอย่างพืชมาวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย



(ก) ความเข้มข้นของสารสกัด (กรัม/น้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร)



(ข) ความเข้มข้นของ oxyfluorfen (เท่าของอัตราแนะนำ)

ภาพผนวกที่ 6 ปริมาณคลอโรฟิลล์เอในใบของไมยราบยักษ์เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ที่เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม หลังจากได้รับ (ก) สารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. (ข) สารกำจัดวัชพืช oxyfluorfen ที่ความเข้มข้นต่างๆ

หมายเหตุ: สำหรับสารกำจัดวัชพืช oxyfluorfen ฉีดพ่น 1 ครั้ง เมื่อไมยราบยักษ์อายุ 11 วันหลังเพาะเมล็ด และทิ้งไว้ 2 วันจึงเก็บตัวอย่างพืชมาวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ

ตารางผนวกที่ 1 ปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร BG-11 ปริมาตร 1 ลิตร (Rippka *et al.*, 1979)

สารเคมีที่ใช้	น้ำหนัก (กรัม)
NaNO_3	1.500
K_2HPO_4	0.040
$\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.075
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.036
Citric acid	0.006
Ferric ammonium citrate	0.006
Ethylene diaminetetra acetic acid (EDTA)	0.001
Na_2CO_3	0.020
Trace metal mix A5	
H_3BO_3	0.002860
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.001810
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.000222
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.000390
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.000079
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.000049

ปรับ pH 9.0 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอลูกหมู 121.5 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

ตารางผนวกที่ 2 ผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อปริมาณ MDA ในใบและรากของพืชชนิดต่างๆ

ความเข้มข้น ของสารสกัดหยาบ	ปริมาณ MDA (นาโนโมลต่อกรัมน้ำหนักสด)							
	หญ้าขจรจบ		ไมยราบยักษ์		ถั่วเหลือง		ข้าว	
	ใบ	ราก	ใบ	ราก	ใบ	ราก	ใบ	ราก
0 กรัม/น้ำหนักแห้ง เซลล์ต่อลิตร	6.488	3.613	12.903	3.032	77.078	26.472	21.718	9.598
75 กรัม/น้ำหนักแห้ง เซลล์ต่อลิตร	6.636	3.097	14.645	2.258	80.668	26.367	22.795	6.387
125 กรัม/น้ำหนักแห้ง เซลล์ต่อลิตร	9.069	3.355	15.742	1.548	78.682	20.400	23.318	4.198
175 กรัม/น้ำหนักแห้ง เซลล์ต่อลิตร	8.995	3.871	21.742	1.871	80.355	25.735	24.074	5.022
F-test	**	ns	**	*	ns	**	ns	*
LSD _{0.05}	1.466	-	4.063	0.784	-	1.811	-	3.439

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

*, ** มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางผนวกที่ 3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อปริมาณ MDA ในใบและรากของพืชชนิดต่างๆ

Source of Variation	DF	Mean Square							
		ปริมาณ MDA (นาโนโมลต่อกรัมน้ำหนักสด)							
		หญ้าขจรจบ		ไมยราบยักษ์		ถั่วเหลือง		ข้าว	
		ใบ	ราก	ใบ	ราก	ใบ	ราก	ใบ	ราก
Concentration	3	0.00602**	0.00036 ^{ns}	0.04406**	0.00125*	0.00814 ^{ns}	0.02543**	0.00289 ^{ns}	0.01690*
Error	8	0.00061	0.00019	0.00466	0.00017	0.01211	0.00088	0.02773	0.00317
CV (%)		10.0	12.3	13.3	19.2	4.4	3.7	22.9	29.7

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

*, ** มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางผนวกที่ 4 ผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อปริมาณแอมโมเนียในใบและรากของพืชชนิดต่างๆ

ความเข้มข้น ของสารสกัดหยาบ	ปริมาณแอมโมเนีย (พีพีเอ็ม)							
	หญ้าขจรจบ		ไมยราบยักษ์		ถั่วเหลือง		ข้าว	
	ใบ	ราก	ใบ	ราก	ใบ	ราก	ใบ	ราก
0 กรัม/น้ำหนักแห้ง เซลล์ต่อลิตร	15.385	176.923	0.000	0.000	7.178	43.182	80.403	14.363
75 กรัม/น้ำหนักแห้ง เซลล์ต่อลิตร	206.154	169.231	0.000	0.000	17.426	44.751	33.332	20.763
125 กรัม/น้ำหนักแห้ง เซลล์ต่อลิตร	256.923	0.000	0.000	0.000	15.176	39.247	27.007	75.568
175 กรัม/น้ำหนักแห้ง เซลล์ต่อลิตร	200.000	3.971	0.000	0.000	23.584	32.431	47.050	119.527
F-test	**	**	ns	ns	**	*	ns	*
LSD _{0.05}	26.188	14.310	-	-	5.938	7.481	-	64.059

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

*, ** มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางผนวกที่ 5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อปริมาณแอมโมเนียในใบและรากของพืชชนิดต่างๆ

Source of Variation	DF	Mean Square							
		ปริมาณแอมโมเนีย (พีพีเอ็ม)							
		หญ้าขจรจบ		ไมยราบยักษ์		ถั่วเหลือง		ข้าว	
		ใบ	ราก	ใบ	ราก	ใบ	ราก	ใบ	ราก
Concentration	3	33668.0**	29309.8**	0.000 ^{ns}	0.000 ^{ns}	137.956**	90.5152*	1702.29 ^{ns}	7384.25*
Error	8	193.486	54.9582	0.000	0.000	9.94616	15.7901	1488.23	1157.71
CV (%)		8.2	7.8	0.0	0.0	19.9	10.0	84.6	59.1

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

*, ** มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางผนวกที่ 6 ผลของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อปริมาณรงควัตถุในใบของพืชชนิดต่างๆ

ความเข้มข้น ของสารสกัดหยาบ	ปริมาณรงควัตถุ (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด)											
	หญ้าขจรจบ			ไมยราบยักษ์			ถั่วเหลือง			ข้าว		
	คลอโร ฟิลล์เอ	คลอโร ฟิลล์บี	แคโร ทีนอยด์	คลอโร ฟิลล์เอ	คลอโร ฟิลล์บี	แคโร ทีนอยด์	คลอโร ฟิลล์เอ	คลอโร ฟิลล์บี	แคโร ทีนอยด์	คลอโร ฟิลล์เอ	คลอโร ฟิลล์บี	แคโร ทีนอยด์
0 กรัม/น้ำหนักแห้ง เซลล์ต่อลิตร	0.572	0.231	0.109	1.208	0.548	0.282	1.966	0.490	0.343	1.753	0.495	0.344
75 กรัม/น้ำหนักแห้ง เซลล์ต่อลิตร	0.739	0.286	0.122	1.147	0.429	0.289	2.097	0.495	0.375	1.873	0.482	0.379
125 กรัม/น้ำหนัก แห้งเซลล์ต่อลิตร	0.776	0.303	0.132	0.820	0.303	0.231	2.015	0.509	0.360	2.259	0.597	0.472
175 กรัม/น้ำหนัก แห้งเซลล์ต่อลิตร	0.803	0.332	0.126	1.005	0.370	0.253	2.242	0.613	0.473	2.301	0.646	0.472
F-test	*	ns	ns	*	ns	ns	**	**	**	ns	ns	ns
LSD _{0.05}	0.137	-	-	0.257	-	-	0.127	0.042	0.042	-	-	-

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

*, ** มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางผนวกที่ 7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสารสกัดหยาบจาก *Hapalosiphon* sp. ต่อปริมาณรังควัตถุในใบของพืชชนิดต่างๆ

Source of Variation	DF	Mean Square											
		ปริมาณรังควัตถุ (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด)											
		หญ้าขจรจบ			ไมยราบยักษ์			ถั่วเหลือง			ข้าว		
		คลอโรฟิลล์เอ	คลอโรฟิลล์บี	แคโรทีนอยด์	คลอโรฟิลล์เอ	คลอโรฟิลล์บี	แคโรทีนอยด์	คลอโรฟิลล์เอ	คลอโรฟิลล์บี	แคโรทีนอยด์	คลอโรฟิลล์เอ	คลอโรฟิลล์บี	แคโรทีนอยด์
Conc.	3	0.0324*	0.0055 ^{ns}	0.0003 ^{ns}	0.0892*	0.0324 ^{ns}	0.0022 ^{ns}	0.0438**	0.0101**	0.0103**	0.2260 ^{ns}	0.0190 ^{ns}	0.0129 ^{ns}
Error	8	0.0052	0.0015	0.0002	0.0186	0.0085	0.0011	0.0045	0.0005	0.0005	0.1105	0.0076	0.0061
CV (%)		9.9	13.6	11.3	13.0	22.4	12.4	3.2	4.2	5.7	16.2	15.7	18.7

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

*, ** มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางผนวกที่ 8 ผลของอุณหภูมิที่เก็บรักษาและระยะเวลาในการเก็บรักษาสารสกัดหยาบต่อปริมาณ MDA ในใบและรากของไมยราบยักษ์

	ปริมาณ MDA (นาโนโมลต่อกรัมน้ำหนักสด)	
	ใบ	ราก
อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	29.889	6.189
30 องศาเซลเซียส	29.533	5.989
F-test	ns	ns
ระยะเวลา 0 วัน	28.367	7.267
30 วัน	31.767	6.117
60 วัน	29.000	4.883
F-test	ns	**
LSD _{0.05}	-	0.375
4 องศาเซลเซียส, 0 วัน	27.767	7.533
4 องศาเซลเซียส, 30 วัน	32.600	6.300
4 องศาเซลเซียส, 60 วัน	29.300	4.733
30 องศาเซลเซียส, 0 วัน	28.967	7.000
30 องศาเซลเซียส, 30 วัน	30.933	5.933
30 องศาเซลเซียส, 60 วัน	28.700	5.033
F-test	ns	ns

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

** มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ

ตารางผนวกที่ 9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของอุณหภูมิที่เก็บรักษาและระยะเวลาการเก็บรักษา สารสกัดหยาดต่อปริมาณ MDA ในใบและรากของไมยราบยักษ์

Source of Variation	DF	Mean Square	
		ปริมาณ MDA (นาโนโมลต่อกรัมน้ำหนักสด)	
		ใบ	ราก
Temperature (T)	1	0.569×10^{-3} ns	0.180×10^{-3} ns
Day (D)	2	19.616×10^{-3} ns	8.524×10^{-3} **
T x D	2	3.149×10^{-3} ns	0.292×10^{-3} ns
Error	12	6.535×10^{-3}	0.089×10^{-3}
CV (%)		8.6	4.9

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

** มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	ศิริพรรณ สุขขัง
วัน เดือน ปี ที่เกิด	17 เมษายน 2528
สถานที่เกิด	จังหวัดนครปฐม
ประวัติการศึกษา	มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนนาครประสิทธิ์ จ. นครปฐม วท.บ. (ชีววิทยา) เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	รางวัลการนำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ ระดับดีเด่น ในการประชุมวิชาการพฤกษศาสตร์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 3 พ. ศ. 2552
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนอุดหนุนการศึกษามูลนิธิศาสตราจารย์ ดร.แถบ นีละนิธิ ปี 2550-2551 ทุนผู้ช่วยสอนจากบัณฑิตวิทยาลัย ภาคต้น ปีการศึกษา 2551