วิทยานิพนธ์

ผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากไซยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon fontinalis* (Ag.) Bornet ต่อการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส การเกิด lipid peroxidation รงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสง และกระบวนการ ammonia assimilation ในพืชบางชนิด

EFFECTS OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM CYANOBACTERIA (*Hapalosiphon fontinalis* (AG.) BORNET) ON MITOSIS, LIPID PEROXIDATION, PHOTOSYNTHETIC PIGMENT AND AMMONIA ASSIMILATION IN SOME PLANTS

นางสาวอินทิรา ขูดแก้ว

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. ๒๕๕๐

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พฤกษศาสตร์)

ปริญญา

พฤกษศาสตร์	พฤกษศาสตร์
สาขา	**ภาควิชา**

เรื่อง ผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากไซยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon fontinalis* (Ag.) Bornet ต่อการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส การเกิด lipid peroxidation รงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสง และกระบวนการ ammonia assimilation ในพืชบางชนิด

Effects of Bioactive Compounds from Cyanobacteria (*Hapalosiphon fontinalis* (Ag.) Bornet) on Mitosis, Lipid Peroxidation, Photosynthetic Pigment and Ammonia Assimilation in Some Plants

นามผู้วิจัย นางสาวอินทิรา ขุดแก้ว

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ .....

(รองศาสตราจารย์ศรีสม สุวรรณวงศ์, Ph.D.)

กรรมการ .....

(รองศาสตราจารย์ลิลลี่ กาวีต๊ะ, Ph.D.)

กรรมการ .....

(รองศาสตราจารย์ปุณฑริกา หะริณสุต, Dr.Agr.Sci.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(รองศาสตราจารย์สุรียา ตันติวิวัฒน์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์วินัย อาจคงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากไซยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon fontinalis* (Ag.) Bornet ต่อการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส การเกิด lipid peroxidation รงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสง และกระบวนการ ammonia assimilation ในพืชบางชนิด

Effects of Bioactive Compounds from Cyanobacteria (*Hapalosiphon fontinalis* (Ag.) Bornet) on Mitosis, Lipid Peroxidation, Photosynthetic Pigment and Ammonia Assimilation in Some Plants

โดย

นางสาวอินทิรา ขูดแก้ว

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พฤกษศาสตร์)
พ.ศ. 2550

อินทิรา ขุดแก้ว 2550: ผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากไซยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon fontinalis* (Ag.) Bornet ต่อการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส การเกิด lipid peroxidation รงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสง และกระบวนการ ammonia assimilation ในพืชบางชนิด
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พฤกษศาสตร์) สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
ประธานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์ศรีสม สุวรรณวงศ์, Ph.D. 141 หน้า

ผลของการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากไซยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon fontinalis* (Ag.) Bornet ที่สกัดด้วยน้ำกลั่นและเมทานอล ต่อการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส โดยเพาะรากหอมลงในสารสกัด แล้วนำมานับระยะการแบ่งเซลล์ และคำนวณค่า mitotic index พบว่า สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *H. fontinalis* ที่สกัดด้วยน้ำกลั่นและเมทานอล มีผลยับยั้งการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสที่ปลายรากหอม (*Allium cepa* L.) โดยส่งผลให้ค่า mitotic index (MI) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่สารสกัดด้วยน้ำกลั่นและเมทานอลให้ผลไม่แตกต่างกัน การเกิด oxidative stress โดยพิจารณาจากการเกิดกระบวนการ lipid peroxidation ซึ่งวัดจากปริมาณ malondialdehyde (MDA) รงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสง ได้แก่ คลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี คลอโรฟิลล์ทั้งหมด และแคโรทีนอยด์ และการสะสมแอมโมเนียจากกระบวนการ ammonia assimilation ในพืชบางชนิด โดยการฉีดพ่นสารสกัดความเข้มข้น 0, 25, 50, 75 และ 100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ให้กับไมยราบยักษ์ หญ้ายาง ผักกาดเขียวปลี ถั่วเหลือง หญ้ารังนก และข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 3 ครั้ง เมื่อต้นกล้าอายุ 5, 10 และ 15 วัน และเก็บตัวอย่างพืชมาวิเคราะห์ พบว่าสารสกัดด้วยน้ำกลั่นที่ความเข้มข้นสูงส่งผลให้เกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ในลำต้นและรากของไมยราบยักษ์ หญ้ายาง ผักกาดเขียวปลี และหญ้ารังนก ส่วนสารสกัดด้วยเมทานอลส่งผลให้เกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation เฉพาะในลำต้นของหญ้ายางเท่านั้น สำหรับปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสง พบว่า สารสกัดด้วยน้ำความเข้มข้นสูง ส่งผลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ของไมยราบยักษ์ลดลง และปริมาณคลอโรฟิลล์ของหญ้ายาง ผักกาดเขียวปลี และข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ลดลง แต่ปริมาณแคโรทีนอยด์ของหญ้ายางและหญ้ารังนกเพิ่มขึ้น ส่วนสารสกัดด้วยเมทานอล มีแนวโน้มทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ของผักกาดเขียวปลีลดลง แต่ปริมาณแคโรทีนอยด์ของหญ้ารังนกเพิ่มขึ้น และการสะสมปริมาณแอมโมเนียจากกระบวนการ ammonia assimilation พบว่า สารสกัดด้วยน้ำและเมทานอลส่งผลต่อการสะสมแอมโมเนียในส่วนและชนิดของพืชแตกต่างกัน โดยสารสกัดด้วยน้ำที่ความเข้มข้นสูง ส่งผลให้มีการสะสมแอมโมเนียของลำต้นและรากของไมยราบยักษ์ หญ้ายาง หญ้ารังนก และข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เพิ่มขึ้นขณะที่สารสกัดด้วยเมทานอลส่งผลให้ปริมาณแอมโมเนียเพิ่มขึ้นเฉพาะที่รากไมยราบยักษ์ และลำต้นของผักกาดเขียวปลี ซึ่งจากการทดลองพืชแต่ละชนิดมีการตอบสนองต่อสารสกัดจาก *H. fontinalis* แตกต่างกัน โดยที่ถั่วเหลืองจัดเป็นพืชที่มีความทนทานต่อสารสกัดมากที่สุด และสารสกัดด้วยน้ำมีผลกระทบต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาภายในพืชได้มากกว่าสารสกัดด้วยเมทานอล

_____ / / _____

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่อประธานกรรมการ

Intira Koodkaew 2007: Effects of Bioactive Compounds from Cyanobacteria (*Hapalosiphon fontinalis* (Ag.) Bornet) on Mitosis, Lipid Peroxidation, Photosynthetic Pigment and Ammonia Assimilation in Some Plants.
Master of Science (Botany), Major Field: Botany, Department of Botany.
Thesis Advisor: Associate Professor Srisom Suwanwong, Ph.D. 141 pages.

Bioactive compounds from *Hapalosiphon fontinalis* (Ag.) Bornet extracted by distilled water and methanol on mitosis were investigated for cell. The bulb of onion (*Allium cepa* L.) was submerged into these extract solutions for 3 days. The result showed that both aqueous and methanolic extract inhibited mitosis of onion root tip and significantly decreased mitotic index (MI) along with the increasing of concentration. For lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) content, photosynthetic pigment i.e. chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll and carotenoid and ammonia (NH_3) content from ammonia assimilation by sprayed extracted concentrations 0, 25, 50, 75 and 100 g(DW)/l to giant mimosa (*Mimosa pigra* L.), painted spurge (*Euphorbia heterophylla* L.), leaf mustard (*Brassica juncea* (L.) Czern.), soybean (*Glycine max* L.) finger grass (*Chloris barbata* Sw.) and rice (*Oryza sativa* L. cv. Khao Dawk Mali 105) at 3 times after planting 5, 10 and 15 days. The results were indicated that aqueous extract at high concentration increased lipid peroxidation in shoot and root of giant mimosa, painted spurge, leaf mustard and finger grass whilst methanolic extract only increased lipid peroxidation in shoot of painted spurge. For photosynthetic pigment, aqueous extract at high concentration decreased chlorophyll and carotenoid content of giant mimosa, chlorophyll of painted spurge, leaf mustard and rice but increased carotenoid content of painted spurge and finger grass and methanolic extract tend to decreased chlorophyll and carotenoid content of leaf mustard but increased carotenoid of finger grass. Ammonia content, high concentration of aqueous extract increased ammonia accumulation in shoot and root of giant mimosa, painted spurge, finger grass and rice whilst methanolic extract increased ammonia content in root of giant mimosa and shoot of leaf mustard. The result also indicate that each of the plants has differential response on *H. fontinalis* extracted, soybean is the most tolerant species and aqueous extract had more effective on physiological progress than methanolic extract.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รศ. ดร. ศรีสม สุวรรณวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษา ซึ่งช่วยให้คำปรึกษา แนะนำการทดลอง สนับสนุนเงินทุนในการจัดหาอุปกรณ์และสารเคมีสำหรับงานวิจัย และช่วยเหลือในด้านต่างๆ ในการทดลอง รวมทั้งตรวจทานและแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้เป็นอย่างดี รศ. ดร. ลิลลี่ กาวีต๊ะ และ รศ. ดร. ปุณฑริกา หะริณสุต ที่ช่วยตรวจแก้ข้อบกพร่องต่างๆ สำหรับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ รศ. กมลพรรณ นามวงศ์พรหม ประธานการสอบ และ รศ. ดร. วีระชัย ณ นคร ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่สละเวลาในการอ่านวิทยานิพนธ์และการสอบสัมภาษณ์ครั้งสุดท้าย รวมทั้งคณาจารย์ภาควิชาพฤกษศาสตร์ทุกท่านที่ให้คำชี้แนะในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสิ้นสมบูรณ์

ขอขอบคุณเพื่อน พี่ น้อง ภาควิชาพฤกษศาสตร์ ที่ให้คำปรึกษา ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ รวมถึงให้กำลังใจเสมอมา

ขอขอบคุณโครงการพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความรู้ความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.) ที่ให้การสนับสนุนเรื่องทุนการศึกษา

สุดท้ายขอขอบพระคุณ บิดามารดา และทุกคนในครอบครัว ที่ให้ความรัก ความเอาใจใส่ ให้การสนับสนุนและให้การศึกษาตลอดมา

อินทิรา ขูดแก้ว

กุมภาพันธ์ 2550

สารบัญ

หน้า

สารบัญ (1)
สารบัญตาราง (2)
สารบัญภาพ (6)
คำนำ 1
วัตถุประสงค์ 3
การตรวจเอกสาร 4
อุปกรณ์และวิธีการ 26
    อุปกรณ์ 26
    วิธีการ 27
ผลและวิจารณ์ 36
    ผล 36
    วิจารณ์ 102
สรุปและข้อเสนอแนะ 115
    สรุป 115
    ข้อเสนอแนะ 116
เอกสารและสิ่งอ้างอิง 117
ภาคผนวก 129

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตัวอย่างค่า E_T^N ของตัวทำละลายบางชนิด	25
2	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกันต่อจำนวนเซลล์ (%) ในระยะต่างๆ ของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสที่ปลายรากหอม	38
3	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณ MDA ในลำต้นและรากของไมยราบยักษ์	43
4	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณ MDA ในลำต้นและรากของหญ้ายาง	45
5	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณ MDA ในลำต้นและรากของผักกาดเขียวปลี	47
6	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณ MDA ในลำต้นและรากของถั่วเหลือง	49
7	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณ MDA ในลำต้นและรากของหญ้ารังนก	51
8	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณ MDA ในลำต้นและรากของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105	53
9	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสงของไมยราบยักษ์	56
10	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสงของหญ้ายาง	60

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
11	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสงของผักกาดเขียวปลี	64
12	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสงของถั่วเหลือง	67
13	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสงของหญ้ารังนก	70
14	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสงของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105	73
15	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ต่อการสะสมปริมาณแอมโมเนียที่ลำต้นและรากของไมยราบยักษ์	77
16	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ต่อการสะสมปริมาณแอมโมเนียที่ลำต้นและรากของหญ้ายาง	79
17	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ต่อการสะสมปริมาณแอมโมเนียที่ลำต้นและรากของผักกาดเขียวปลี	81
18	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ต่อการสะสมปริมาณแอมโมเนียที่ลำต้นและรากของถั่วเหลือง	83
19	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นที่แตกต่างกันต่อการสะสมปริมาณแอมโมเนียที่ลำต้นและรากของหญ้ารังนก	85

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
20	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นที่แตกต่างกันต่อการสะสมปริมาณแอมโมเนียที่ลำต้นและรากของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105	87

ตารางผนวกที่

1	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสระยะต่างๆ และ mitotic index ในปลายรากหอม *(Allium cepa* L.)	132
2	วิเคราะห์ความแปรปรวนผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสระยะต่างๆ และ mitotic index ในปลายรากหอม *(A. cepa* L.)	133
3	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ต่อปริมาณ MDA ของพืชชนิดต่างๆ	134
4	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ต่อปริมาณ MDA ของพืชชนิดต่างๆ	135
5	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นที่แตกต่างกันต่อปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืชชนิดต่างๆ	136
6	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นที่แตกต่างกันต่อปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืชชนิดต่างๆ (ต่อ)	137
7	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ต่อปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืชชนิดต่างๆ	138

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
8	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ต่อปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืชชนิดต่างๆ (ต่อ)	139
9	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ต่อปริมาณแอมโมเนียของพืชชนิดต่างๆ	140
10	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ต่อปริมาณแอมโมเนียของพืชชนิดต่างๆ	141

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	*Hapalosiphon fontinalis* (Ag.) Bornet กำลังขยาย 400 เท่า	5
2	ความสัมพันธ์ระหว่างออกซิเจนและ ROS	10
3	กลไกการเกิด lipid peroxidation ในพืช	13
4	โครงสร้างของรงควัตถุที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง	15
5	กระบวนการ ammonia assimilation โดยเอนไซม์ GS/GOGAT	18
6	กระบวนการ ammonia assimilation โดยเอนไซม์ glutamate dehydrogenase	18
7	วัฏจักรของการแบ่งเซลล์ในระยะต่างๆ	20
8	การแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะต่างๆ ในปลายรากหอม (*Allium ascalonicum* L.)	23
9	การนับเซลล์ในระยะต่างๆ ของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส	30
10	ความยาวรากของหอม (*Allium cepa* L.) เมื่อได้รับสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่สกัดด้วยน้ำกลั่นและเมทานอลความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 3 วัน	36
11	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อ (ก)จำนวนเซลล์ (%) ในระยะไมโทซิส และ (ข) ค่า mitotic index (%) ของการแบ่งเซลล์ที่ปลายรากหอม	39
12	ตัวอย่างการแบ่งเซลล์ของปลายรากหอม เมื่อได้รับสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำกลั่นความเข้มข้นต่างๆ	40
13	ตัวอย่างการแบ่งเซลล์ของปลายรากหอม เมื่อได้รับสารสกัดที่สกัดด้วยเมทานอลความเข้มข้นต่างๆ	41
14	ความผิดปกติของโครโมโซม	42
15	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณ MDA ใน (ก) ลำต้นและ (ข) รากของไมยราบยักษ์	44
16	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณ MDA ใน (ก) ลำต้นและ (ข) รากของหญ้ายาง	46

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
17	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณ MDA ใน (ก) ลำต้นและ (ข) รากของผักกาดเขียวปลี	48
18	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณ MDA ใน (ก) ลำต้นและ (ข) รากของถั่วเหลือง	50
19	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณ MDA ใน (ก) ลำต้นและ (ข) รากของหญ้ารังนก	52
20	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณ MDA ใน (ก) ลำต้นและ (ข) รากของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105	54
21	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณ (ก) คลอโรฟิลล์ เอ (ข) คลอโรฟิลล์ บี และ(ค) คลอโรฟิลล์ทั้งหมดของไมยราบยักษ์	57
22	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณแคโรทีนอยด์ของไมยราบยักษ์	58
23	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณ (ก) คลอโรฟิลล์ เอ (ข) คลอโรฟิลล์ บี และ(ค) คลอโรฟิลล์ทั้งหมดของหญ้ายาง	61
24	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณแคโรทีนอยด์ของหญ้ายาง	62
25	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณ (ก) คลอโรฟิลล์ เอ (ข) คลอโรฟิลล์ บี และ(ค) คลอโรฟิลล์ทั้งหมดของผักกาดเขียวปลี	65
26	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณแคโรทีนอยด์ของผักกาดเขียวปลี	66

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
27	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณ (ก) คลอโรฟิลล์ เอ (ข) คลอโรฟิลล์ บี และ(ค) คลอโรฟิลล์ทั้งหมดของถั่วเหลือง	68
28	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณแคโรทีนอยด์ของถั่วเหลือง	69
29	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณ (ก) คลอโรฟิลล์ เอ (ข) คลอโรฟิลล์ บี และ(ค) คลอโรฟิลล์ทั้งหมดของหญ้ารังนก	71
30	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณแคโรทีนอยด์ของหญ้ารังนก	72
31	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณ (ก) คลอโรฟิลล์ เอ (ข) คลอโรฟิลล์ บี และ(ค) คลอโรฟิลล์ทั้งหมดของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105	74
32	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณแคโรทีนอยด์ของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105	75
33	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นที่แตกต่างกันต่อการสะสมปริมาณแอมโมเนียที่ (ก) ลำต้นและ (ข) รากของไมยราบยักษ์	78
34	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นที่แตกต่างกันต่อการสะสมปริมาณแอมโมเนียที่ (ก) ลำต้นและ (ข) รากของหญ้ายาง	80
35	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นที่แตกต่างกันต่อการสะสมปริมาณแอมโมเนียที่ (ก) ลำต้นและ (ข) รากของผักกาดเขียวปลี	82

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
36	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นที่แตกต่างกันต่อการสะสมปริมาณแอมโมเนียที่ (ก) ลำต้นและ (ข) รากของถั่วเหลือง	84
37	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นที่แตกต่างกันต่อการสะสมปริมาณแอมโมเนียที่ (ก) ลำต้นและ (ข) รากของหญ้ารังนก	86
38	ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นที่แตกต่างกันต่อการสะสมปริมาณแอมโมเนียที่ (ก) ลำต้นและ (ข) รากของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105	88
39	ลักษณะของไมยราบยักษ์เมื่อได้รับสารสกัดจาก *H. fontinalis* ด้วยน้ำกลั่น ความเข้มข้นต่างๆ	90
40	ลักษณะของไมยราบยักษ์เมื่อได้รับสารสกัดจาก *H. fontinalis* ด้วยเมทานอล ความเข้มข้นต่างๆ	91
41	ลักษณะของหญ้ายางเมื่อได้รับสารสกัดจาก *H. fontinalis* ด้วยน้ำกลั่น ความเข้มข้นต่างๆ	92
42	ลักษณะของหญ้ายางเมื่อได้รับสารสกัดจาก *H. fontinalis* ด้วยเมทานอล ความเข้มข้นต่างๆ	93
43	ลักษณะของผักกาดเขียวปลีเมื่อได้รับสารสกัดจาก *H. fontinalis* ด้วยน้ำกลั่น ความเข้มข้นต่างๆ	94
44	ลักษณะของผักกาดเขียวปลีเมื่อได้รับสารสกัดจาก *H. fontinalis* ด้วยเมทานอลความเข้มข้นต่างๆ	95
45	ลักษณะของถั่วเหลืองเมื่อได้รับสารสกัดจาก *H. fontinalis* ด้วยน้ำกลั่น ความเข้มข้นต่างๆ	96
46	ลักษณะของถั่วเหลืองเมื่อได้รับสารสกัดจาก *H. fontinalis* ด้วยเมทานอล ความเข้มข้นต่างๆ	97

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
47	ลักษณะของหญ้ารังนกเมื่อได้รับสารสกัดจาก *H. fontinalis* ด้วยน้ำกลั่นความเข้มข้นต่างๆ	98
48	ลักษณะของหญ้ารังนกเมื่อได้รับสารสกัดจาก *H. fontinalis* ด้วยเมทานอลความเข้มข้นต่างๆ	99
49	ลักษณะของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เมื่อได้รับสารสกัดจาก *H. fontinalis* ด้วยน้ำกลั่นความเข้มข้นต่างๆ	100
50	ลักษณะของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เมื่อได้รับสารสกัดจาก *H. fontinalis* ด้วยเมทานอลความเข้มข้นต่างๆ	101

ภาพผนวกที่

1	กราฟมาตรฐานของสารละลายแอมโมเนียมาตรฐาน	131

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

AOS	active oxygen species
ROS	reactive oxygen species
$O_2^{-}\bullet$	superoxide anion radical
H_2O_2	hydrogen peroxide
$^1O_2$	singlet oxygen
RH	polyunsaturated fatty acid
R•	lipid radical
ROO•	lipid peroxyl radical
ROOH	lipid hydroperoxide
RO•	alkoxyl radical
MDA	malondialdehyde
E_T^N	normalized E_T (30) solvent polarity parameter
HBD	hydrogen bond donor

ผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากไซยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon fontinalis* (Ag.) Bornet ต่อการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส การเกิด lipid peroxidation รงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสง และกระบวนการ ammonia assimilation ในพืชบางชนิด

Effects of Bioactive Compounds from Cyanobacteria (*Hapalosiphon fontinalis* (Ag.) Bornet) on Mitosis, Lipid Peroxidation, Photosynthetic Pigment and Ammonia Assimilation in Some Plants

คำนำ

ปัจจุบันมีการใช้สารเคมีในการกำจัดวัชพืชหรือควบคุมวัชพืชอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นวิธีการที่สะดวก ใช้แรงงานคนน้อย และให้ผลรวดเร็ว จึงเป็นวิธีการที่นิยมในหมู่เกษตรกร ทำให้เกิดผลเสียตามมาอีกมากมายทั้งในระยะสั้นและระยะยาว อาทิ การตกค้างของสารเคมีในสิ่งแวดล้อม และการปนเปื้อนของสารเคมีในอาหาร เป็นต้น ซึ่งก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตต่างๆ นานัปการ ทั้งในมนุษย์ สัตว์ และพืช ดังนั้นจึงมีความพยายามที่จะลดการใช้สารเคมีในการกำจัดหรือควบคุมวัชพืช เพื่อลดปัญหามลพิษ และอนุรักษ์สิ่งแวดล้อม โดยแนวทางหนึ่ง คือความพยายามนำสารสกัดจากธรรมชาติมาประยุกต์ใช้ในการกำจัดวัชพืช ซึ่งมีการทดลองกันอย่างแพร่หลาย เช่น Russo *et al*. (1997) พบว่า สารสกัดจากปอแก้ว (*Hibiscus cannabinus* L.) มีผลยับยั้งการงอกของเมล็ด pigweed และ ryegrass นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาว่า ไซยาโนแบคทีเรียหลายชนิดมีการสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งมีการใช้เป็นสารปฏิชีวนะ (antibiotic) หรือสารประกอบอัลลิโลเคมี (allelochemical compounds) ที่มีผลต่อกระบวนการทางชีวเคมีภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตที่อยู่ใกล้เคียง (Smith and Doan, 1999) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า สารสกัดจาก *H. fontinalis* มีผลยับยั้งการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง และมีผลยับยั้งการงอก ความยาวยอด และความยาวรากของพืชบางชนิด (ณรงค์, 2548) และส่งผลในการเกิด lipid peroxidation ในต้นกล้าผักกาดหัว ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และถั่วผี (อินทิรา, 2548) การศึกษาในครั้งนี้จึงมีแนวความคิดที่จะนำสารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon fontinalis* (Ag.) Bornet มาศึกษาถึงผลต่อกระบวนแมเทบอลิซึมและการเจริญเติบโตของพืช โดยสนใจศึกษาผลในการเกิด lipid peroxidation รงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสง การสะสม

แอมโมเนีย (NH_3) จากกระบวนการ ammonia assimilation และการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (mitosis) ในพืช

ผลที่ได้จากการทดลองอาจจะนำไปใช้ในการพัฒนาสารสกัดจาก *H. fontinalis* เพื่อใช้เป็นสารกำจัดหรือควบคุมวัชพืชทดแทนการใช้สารเคมี เพื่อความปลอดภัยต่อสภาพแวดล้อมและสิ่งมีชีวิตต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทดสอบผลของสารสกัดจาก *Hapalosiphon fontinalis* (Ag.) Bornet ต่อการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (mitosis) ที่ปลายรากหอม (*Allium cepa* L.)

2. เพื่อทดสอบผลของสารสกัดจาก *Hapalosiphon fontinalis* (Ag.) Bornet ต่อการเกิด oxidative stress ในวัชพืชและพืชปลูกบางชนิด

3. เพื่อทดสอบผลของสารสกัดจาก *Hapalosiphon fontinalis* (Ag.) Bornet ต่อรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสง (photosynthetic pigment) ในวัชพืชและพืชปลูกบางชนิด

4. เพื่อทดสอบผลของสารสกัดจาก *Hapalosiphon fontinalis* (Ag.) Bornet ต่อการเกิดกระบวนการ ammonia assimilation ในวัชพืชและพืชปลูกบางชนิด

5. เพื่อทดสอบผลของตัวทำละลายในการสกัดสารจาก *Hapalosiphon fontinalis* (Ag.) Bornetต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาดังกล่าวข้างต้น

การตรวจเอกสาร

ไซยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon fontinalis* (Ag.) Bornet

จัดอยู่ใน

Division Cyanophyta

Class Cyanophyceae

Order Stigonematales

Family Stigonemataceae

Genus *Hapalosiphon*

Species *Hapalosiphon fontinalis*

กลุ่มเซลล์มีสีเขียวแกมน้ำเงิน พบได้ตามพื้นที่ชื้นแฉะและบนพื้นน้ำที่อยู่ในบริเวณน้ำนิ่ง เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ภาพที่ 1) เห็นเป็นเส้นสายกว้างประมาณ 12-24 ไมโครเมตร ทรัยโคม (trichome) ลักษณะรูปร่างเรียงเป็นแถวเดียวบางครั้งอาจพบเรียงกัน 2-3 แถว รูปร่างเซลล์ที่เป็นเส้นสายหลักเป็นรูปสี่เหลี่ยมจนถึงกลม แตกแขนงแท้ด้านข้าง (lateral branching) แขนงที่แตกออกมามีความกว้างประมาณ 9-12 ไมโครเมตร เซลล์ที่แขนงรูปร่างเหลี่ยมจนถึงรี ทั้งเส้นสายหลักและแขนงที่แตกออกมามีชีท (sheath) หุ้ม ชีทที่หุ้มไม่มีสีแต่อาจมีสีน้ำตาลแกมเหลืองเมื่อแก่ ฮอร์โมโกน (hormogone) กว้างประมาณ 6 ไมโครเมตร ยาว 100-300 ไมโครเมตร ประกอบด้วยเซลล์ประมาณ 14-50 เซลล์ (Desikachary, 1959) การสืบพันธุ์มีทั้งแบบอาศัยเพศโดยการสร้างสปอร์ และไม่อาศัยเพศโดยการแบ่งเซลล์ให้ทรัยโคมยืดยาวออกไป และเมื่อถูกกระทบกระเทือน จะหลุดออกเป็นท่อนๆ โดยท่อนที่หักหรือหลุดออกมาจากสายเดิม เรียกว่า โฮโมโกเนีย (homogonia) และเมื่ออยู่ในสภาพไม่เหมาะสม เช่น ขาดแคลนอาหาร จะมีการสร้างอะคีนีต (akinete) ออกมาจากรอยแยกของผนังเซลล์ (Trainor, 1978)

ภาพที่ 1 *Hapalosiphon fontinalis* (Ag.) Bornet กำลังขยาย 400 เท่า

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากไซยาโนแบคทีเรีย

ไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดเป็นแหล่งของสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) และสารที่ไซยาโนแบคทีเรียหลายชนิดสร้างขึ้นเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) หรือเป็นสารประกอบอัลลิโลเคมี (allelochemical compounds) ที่มีผลต่อกระบวนการทางชีวเคมีของสิ่งมีชีวิตที่อยู่ใกล้เคียง (Smith and Doan, 1999) โดยมีผลแตกต่างกันออกไป เช่น เป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxin) ระบบประสาท (neurotoxin) และตับ (hepatotoxin) นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ต่อต้านไวรัส (antiviral activity) เชื้อรา (antifungal activity) แบคทีเรีย (antibacterial activity) สาหร่าย (antialgal activity) และพืชบางชนิดได้ ซึ่งตัวอย่างการศึกษาที่ผ่านมา อาทิ Patterson *et al.* (1994) รายงานว่าสาร tolytoxin ส่งผลกระทบต่อการจัดเรียงตัวของไมโครฟิลาเมนท์ (microfilament) ทำให้ไม่มีการสร้าง contractile ring ซึ่งมีความจำเป็นต่อการแบ่งเซลล์ในพวกยูคาริโอต และ *Lyngbya wollei* Farlow ex. Gomont มีการสร้างสารพิษที่มีผลในการขัดขวางการทำงานของ sodium channel ในหนู ส่งผลให้หนูมีการเคลื่อนไหวช้าลง และตายในที่สุด (Yin *et al*., 1997) จากการศึกษาของ Armstrong *et al*. (1991) พบว่าสารสกัดที่ได้จากเซลล์ *Lyngbya* sp. Pearl strain ในระยะ early exponential growth มีผลยับยั้งไวรัส influenza virus PR8 ได้ Suikkanen *et al*. (2004) พบว่า *Nodularia spumigena* มีการปล่อยสารประกอบอัลลิโลเคมี (allelochemical) ในระยะ exponential และ stationary ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Rhodomonas* sp. และ Jaki *et al*. (2001) พบว่าสาร tolybyssidins A และ B ที่สกัดได้จาก *Tolypothrix byssoidea* (EAWAG 195) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Candida albicans* ได้ เมื่อใช้สารที่มีความเข้มข้น 32 และ 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจาก *Nostoc commune* มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Aspergillus candidus* ได้เช่นกัน (Kajiyama *et al*., 1998) และ Gleason and Paulson (1984) รายงาน

ว่า *Scytonema hofmanni* ผลิตสาร cyanobacterin ซึ่งยับยั้งการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแหน (*Lemna spp.*) นอกจากนี้ สารสกัดด้วยเมทานอลจาก *Fischerella* sp. พบว่ามีสารที่มีชื่อว่า Hapalindole T ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย (Asthana *et al*., 2006) และ *Fischerella* sp. สามารถผลิตสาร alkaloid ชื่อว่า 12-epi-hapalindole E isonitrile ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ RNA และโปรตีนของ *Bacillus subtilis* (Doan *et al*., 2000)

<u>สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากไซยาโนแบคทีเรียสกุล *Hapalosiphon*</u>

ไซยาโนแบคทีเรียสกุล *Hapalosiphon* แต่ละชนิดผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพแตกต่างกันออกไป โดยมีรายงานว่า *Hapalosiphon* หลายชนิดสามารถผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่ส่งผลต่อสิ่งมีชีวิตอื่นๆ แตกต่างกันออกไปด้วย เช่น ณัฏฐา (2543) พบว่า สารสกัดจาก *Hapalosiphon* sp. ที่สกัดด้วยทริสไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์มีผลยับยั้งการเจริญของยอดและรากของถั่วผี และสารสกัดจาก *Hapalosiphon* sp. ที่สกัดด้วยน้ำ มีผลยับยั้งการงอกของหญ้ารังนกและผักกาดขาวปลี นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการงอกของถั่วเหลืองและผักยาง และส่งผลยับยั้งความยาวยอด ความยาวรากของถั่วเขียว ถั่วเหลือง และผักยาง (เพ็ญนภา, 2547) และจากการทดลองของสุภาพร (2544) พบว่า สารสกัดจาก *Hapalosiphon* sp. สามารถยับยั้งการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสงของปวยเล้งเมื่อทดสอบด้วยปฏิกิริยา Hill reaction ได้ รายงานของ Bonjouklian *et al*. (1995) พบว่า *Hapalosiphon hibernicus* ATCC 55225 สร้างสาร hapalindole A และ hapalindole alkaloid A 89271 ชนิด B และ F ซึ่งส่งผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา ส่วนใน *H. laingii* พบว่า มีสารประเภท indole alkaloid (Klein *et al*., 1995) และยังพบสาร N-methywelwitindolinone C isothiocyanate (welwistatin) ใน *H. welwitschii* ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้ง multidrug resistance (MDR) ของการเกิดเนื้องอก และมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อรา (Stratmann *et al*., 1994; Avendano and Monendez, 2004)

นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงสารที่ไซยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon* ปลดปล่อยออกมาในอาหารเลี้ยงว่าสามารถส่งผลต่อสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นได้ เช่น ณัฏฐา (2543) พบว่า อาหารเหลวสูตร BG-11 ที่ได้จากการเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon* sp. นาน 2 สัปดาห์ มีผลทำให้การงอกของผักกาดขาวปลีลดลง ชะลอการงอกของถั่วผี และยับยั้งการเจริญเติบโตของยอดและรากของไมยราบยักษ์ ถั่วผี ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ผักกาดขาวปลี และถั่วเหลือง และอาหารที่เลี้ยง *Hapalosiphon*

sp. นาน 24 วัน กระตุ้นการงอกของเมล็ดผักยาง กระตุ้นการเติบโตของรากถั่วเหลือง และยอดถั่วเขียว (เปรมทิพย์, 2547) นอกจากนี้ กวิยา (2548) พบว่า อาหารเลี้ยง *Hapalosiphon* sp. นาน 24 วัน สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของถั่วเขียวพันธุ์กำแพงแสน 1 โดยทำให้น้ำหนักแห้งของต้น น้ำหนักฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อฝัก และผลผลิตรวมต่อไร่ เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่ไม่มีผลต่อการให้ผลผลิตของถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 แต่มีผลต่อความสูงของต้นและการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของจำนวนปากใบ (อภิวัฒน์, 2548)

<u>สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *H. fontinalis*</u>

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบใน *H. fontinalis* จัดเป็นสารในกลุ่มอินโดลอัลคาลอยด์ (indole alkaloids) โดยจัดเป็นสารปฏิชีวนะ (Moore *et al*.,1987) ซึ่งสารที่พบมาก คือ แฮพพาลินโดลเอ (hapalindole A) โดยจะมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย แบคทีเรีย (antibacterial) และเชื้อรา (antifungal) บางชนิด (Moore *et al*., 1984) นอกจากนี้ยังพบสารอื่นๆ อีก เช่น fontonamide, hapalonamide G, H, V, anhydrohapaloxindole A, B, M, dechlorofontonamide (Moore *et al*.,1989) hapalindoles C-Q และ T-V (Moore *et al*.,1987) โดยสารตั้งต้นของ hapalindole นี้เป็นอนุพันธ์ของทริปโตเฟน (tryptophan) และ เจอรานิออลไพโรฟอสเฟต (geraniol pyrophosphate) (Bonjouklian *et al*., 1995) และมีรายงานของณรงค์ (2548) พบว่า สารสกัดจาก *H. fontinalis* มีผลยับยั้งการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสง และมีผลยับยั้งการงอก ความยาวยอด และความยาวรากของเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ผักกาดขาวปลี และถั่วผี และส่งผลในการเกิด lipid peroxidation ในต้นกล้าถั่วผี ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และผักกาดหัว (อินทิรา, 2548) นอกจากนี้สารชีวภาพจากอาหารเลี้ยง *H. fontinalis* นาน 16 วัน และ 6 เดือน มีแนวโน้มทำให้การแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะต่างๆ ลดลง (อินทิรา, 2549)

<u>สารกำจัดวัชพืช</u>

สารกำจัดวัชพืช (herbicide) หมายถึง สารเคมีชนิดใดๆ ก็ตาม ที่นำมาใช้เพื่อฆ่าทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของวัชพืช ไม่ว่าจะเป็นในขณะที่วัชพืชงอกขึ้นมาแล้วหรือยังเป็นเมล็ดอยู่ตลอดจนชิ้นส่วนต่างๆ ของวัชพืชที่ขยายพันธุ์ได้ที่อยู่ในดินหรืออยู่บนดิน

กลไกการทำลายของสารกำจัดวัชพืช (herbicide mode of action) เป็นลำดับหรือขั้นตอนภายหลังจากที่พืชได้รับสารกำจัดวัชพืชไปแล้ว สารจะเข้าไปทำปฏิกิริยาโดยการยับยั้งหรือทำลายภายในต้นพืช รวมไปถึงบริเวณตำแหน่งหรือจุดทุกจุดที่สารกำจัดวัชพืชจะแสดงปฏิกิริยาภายในต้นพืช ส่งผลทำให้พืชแสดงอาการได้รับพิษและแสดงอาการผิดปกติ ในที่สุดพืชก็จะตายไปในเวลาต่อมา ซึ่งสารกำจัดวัชพืชแต่ละชนิดมีกลไกในการยับยั้งกระบวนการที่สำคัญในการเจริญเติบโตของพืชแตกต่างกันออกไป เช่น

1. สารทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (contacts-membrane disrupters) เป็นสารที่ใช้หลังงอกหรือใช้หลังจากปลูกพืช โดยทั่วไปสารในกลุ่มนี้มีการเคลื่อนย้ายในเนื้อเยื่อพืชได้ค่อนข้างจะจำกัด และจะแสดงพฤติกรรมของสารทางดินออกมาน้อยมากหรือไม่มีผลทางดิน หลังจากที่พืชได้รับสารสัมผัสทางใบ ต่อมาจะเกิดการเปลี่ยนแปลงอนุมูลของสารประกอบ ทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อพืช เมื่อเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายจะทำให้องค์ประกอบภายในของพืช (น้ำ และ cytoplasm) เกิดการเปลี่ยนแปลง และทำให้มีการเคลื่อนย้ายของสารประกอบภายในเซลล์ไหลออกสู่ช่องว่างภายนอกเซลล์และบริเวณรอบๆ เนื้อเยื่อพืช มีผลทำให้พืชแสดงอาการในลักษณะของการเปียกโชกด้วยน้ำ (water-soaked) และใบจะเหี่ยวแห้ง ในเวลาต่อมา น้ำที่ไหลออกนอกเซลล์จะระเหยออกจากเนื้อเยื่อพืชทำให้เกิดอาการแห้งและซีด สารในกลุ่มนี้ ได้แก่ สารในกลุ่ม bipyridiliums หรือ bipyradiniums กลุ่ม diphenylrthers และ oxadiazoles

2. สารที่ยับยั้งการสร้างรงควัตถุ (pigment synthesis inhibitors) สารในกลุ่มนี้จะไปมีผลต่อการยับยั้งในกระบวนการสร้างรงควัตถุ เช่น สาร amitrol จะยับยั้งการสร้างรงควัตถุคาโรทีนอยด์ โดยจะไปมีผลต่อการลดประสิทธิภาพของการสังเคราะห์ด้วยแสง และเกิด photooxidation และสาร เช่น norflurazon, pyridazinones และ clomazone จะยับยั้งการสร้างรงควัตถุคลอโรฟิลล์ ภายหลังที่พืชได้รับสารกลุ่มนี้ เมื่อพืชได้รับแสงจากดวงอาทิตย์ ทำให้มีการสร้างออกซิเจนในรูปที่เป็นพิษต่อพืชที่เรียกว่า singlet oxygen ($^1O_2$) จะมีผลทำให้พืชแสดงลักษณะอาการฟอกขาวซีด (bleaching) ของคลอโรฟิลล์เกิดขึ้นได้ ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อพืชได้ ในที่สุดการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์และคลอโรฟิลล์จะไม่เกิดขึ้น ต่อมาจะทำให้กระบวนการต่างๆ ภายในต้นพืชถูกทำลายไป ในเวลาต่อมาพืชก็จะแสดงอาการเหี่ยวแห้งและตายไปในที่สุด

3. สารที่ยับยั้งการสร้างกรดอะมิโน (amino acid synthesis inhibitors) สารในกลุ่มนี้ จะมีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เฉพาะเจาะจงที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกรดอะมิโน หลังจาก

ที่พืชได้รับสารในกลุ่มนี้สารจะมีการเคลื่อนย้ายไปยังบริเวณที่มีการเกิดกิจกรรมของสาร ได้แก่ บริเวณเนื้อเยื่อเจริญ (meristematic tissue) ซึ่งในบริเวณนี้เองสารจะจับกับเอนไซม์ ทำให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์กรดอะมิโน ซึ่งจะไปมีผลต่อการสร้างโปรตีนที่จำเป็นสำหรับนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและพัฒนาการของพืช โดยทั่วไปการสังเคราะห์กรดอะมิโนในพืชชั้นสูงนั้นจะมี 3 กลไก และจะถูกยับยั้งโดยสารกำจัดวัชพืชที่สำคัญ ดังนี้

3.1 การยับยั้งการสังเคราะห์กรดอะมิโนที่เป็นอะโรมาทิก (aromatic amino acid) โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ EPSPs (5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ใน shikimate pathway ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดอะมิโนพวกอะโรมาติกที่จำเป็น ได้แก่ phenylalanine, tryptophane และ tyrosine สารกำจัดวัชพืชที่มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ คือ สาร glyphosate และ glyphosate analogues เป็นต้น

3.2 การยับยั้งการสังเคราะห์กรดอะมิโนที่เป็นลูกโซ่ (branched chain amino acids) โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ALS (acetolactate synthase) กรดอะมิโนที่เป็นลูกโซ่ ได้แก่ valine, leucine และ isoleucine สารกำจัดวัชพืชที่ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ดังกล่าวนี้ ได้แก่ สารในกลุ่ม sulfonylureas, imidazolinones และ triazolopyrimidine sulfonamides เป็นต้น

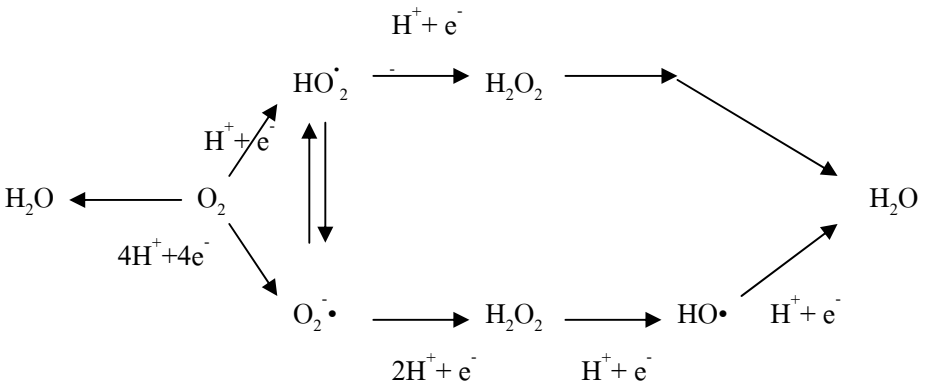
3.3 การยับยั้งการสังเคราะห์กลูทามีนโดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ GS (glutamine synthetase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ glutamine กระบวนการสังเคราะห์ glutamine นี้ ถือว่าเป็นกระบวนการแมเทบอลิซึมของไนโตรเจนที่สำคัญ เนื่องจากเป็นการเปลี่ยนรูปของแอมโมเนีย (NH_3) ไปเป็น glutamine ซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจน กระบวนการนี้เรียกว่า ammonia assimilation สารกำจัดวัชพืชที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ คือ สารกลุ่ม phosphinic acid ได้แก่ สาร glufosinate และ bialaphos เป็นต้น การยับยั้งการทำงานของ GS จะทำให้เกิดการสะสมแอมโมเนียในพืช ซึ่งจะเป็นสาเหตุที่ทำให้พืชตาย

4. สารที่ยับยั้งการแบ่งเซลล์บริเวณเนื้อเยื่อเจริญของพืช (meristem mitotic inhibitors) สารในกลุ่มนี้จะเกี่ยวข้องในกระบวนการ การแบ่งเซลล์ (cell division) และการขยายขนาดของเซลล์ (cell enlargement) เนื่องจากสารในกลุ่มนี้จะเข้าไปเกาะจับ tubulin เกิดเป็น HB-tubulin complex ทำให้ไม่สามารถสร้าง microtubule ได้ มีผลทำให้ระยะเมทาเฟสของการแบ่งเซลล์ไม่มีการสร้าง spindle fiber ขึ้นมา ทำให้การพัฒนาส่วนต่างๆ ของเซลล์ผิดปกติไป นอกจากนี้ยังทำให้การแบ่ง

เซลล์ของพืชเกิดขึ้นได้ไม่สมบูรณ์ กล่าวคือ จะเป็นลักษณะเซลล์หนึ่งเซลล์มีหลาย nuclear chromosome ที่เรียกว่า multi-nucleated cells สารในกลุ่มนี้ ได้แก่ สารที่อยู่ในกลุ่ม dinitroanilines ซึ่งจะยับยั้งจุดเจริญบริเวณราก และสารในกลุ่ม N-phenylcarbamates, carbamothioates และ chloroacetamides ซึ่งจะยับยั้งจุดเจริญบริเวณยอด (ทศพล, 2545)

Oxidative stress

คือ สภาวะเครียด (stress) ที่เกิดจาก active oxygen species (AOS) หรือ reactive oxygen species (ROS) ซึ่งเป็นโมเลกุลของออกซิเจนที่มีความสามารถในการออกซิไดซ์สูง ประกอบด้วย superoxide anion radical (O_2^-•), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical (•OH) และ singlet oxygen ($^1O_2$) โดย ROS แต่ละชนิดมีความสัมพันธ์กัน ดังภาพที่ 2 (Baskin and Salem, 1997)



ภาพที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างออกซิเจนและ ROS

การเกิด reactive oxygen species ในพืช

ROS (reactive oxygen species) ในพืชเกิดจากกระบวนการทางสรีรวิทยาหลายกระบวนการ เช่น กระบวนการ photorespiration การสังเคราะห์แสง (photosynthesis) และการหายใจ (respiration) ROS สามารถเกิดขึ้นได้ในออร์แกเนล (organelles) หลายชนิด อาทิ คลอโรพลาสต์ (chloroplast) ซึ่งเป็นตำแหน่งหลักในการเกิด ROS ในพืช ROS ที่เกิดในคลอโรพลาสต์ ได้แก่ superoxide anion radical, hydrogen peroxide, hydroxyl radical และ singlet oxygen ซึ่งเกิดขึ้นในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ROS ที่เกิดขึ้นในไมโทคอนเดรีย (mitochondria) ได้แก่

superoxide anion radical ซึ่งเกิดขึ้นในขณะที่มีการถ่ายทอดอิเล็กตรอน และในเพอรอกซิโซม (peroxisome) จะเกิด hydrogen peroxide ในระหว่างการเกิดกระบวนการ photorespiration (Mittler, 2002)

ภายใต้ภาวะการเจริญเติบโตปกติ ROS ในเซลล์จะอยู่ในระดับต่ำ (ในคลอโรพลาสต์ superoxide anion radical มีความเข้มข้น 240 ไมโครโมลาร์ต่อวินาที และ hydrogen peroxide มีความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์) ปริมาณของ ROS จะเพิ่มขึ้นจนเป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อได้รับการกระตุ้นจากสภาวะเครียด (stress) จากสิ่งแวดล้อม ได้แก่ สภาวะแห้งแล้ง (drought stress) ความเค็ม (salt stress) ความหนาวเย็น (chilling) ความร้อน (heat shock) โลหะหนัก (heavy metals) แสงอุลตร้าไวโอเลต (ultraviolet radiation) มลพิษในอากาศ (air pollutants) (เช่น โอโซน (ozone) และซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) เป็นต้น) ความเข้มแสง (high light stress) การขาดธาตุอาหาร (nutrient deprivation) เชื้อโรค (pathogen infection) และการเกิดบาดแผล (wounding) (Mittler, 2002)

<u>ผลของ reactive oxygen species (ROS) ที่มีต่อพืช</u>

ROS ชักนำให้เกิดการเสื่อมสภาพของเซลล์ ซึ่งเป็นผลมาจากกระบวนการออกซิเดชัน (oxidative process) ได้แก่

Lipid peroxidation ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์พืชเสียสภาพ เกิดการเสื่อมสภาพ (aging) ของเซลล์ ซึ่งจะส่งผลให้สมบัติเยื่อเลือกผ่าน (permeability) ของเยื่อหุ้มเซลล์เสียสภาพ และในที่สุดจะทำให้เซลล์ตาย

Protein oxidation โดยส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ site – specific amino acid เกิดการแตกหักของสาย polypeptide การตกตะกอนของโปรตีน เกิดการสลายและการเสื่อมสภาพของโปรตีน และทำให้เอนไซม์เสียสภาพ

RNA และ DNA oxidation โดย hydroxyl radical จะไปทำลายคู่เบส ทำให้เกิดเป็น DNA สายเดี่ยว ทำให้เกิดความผิดปกติในพันธุกรรมของพืช

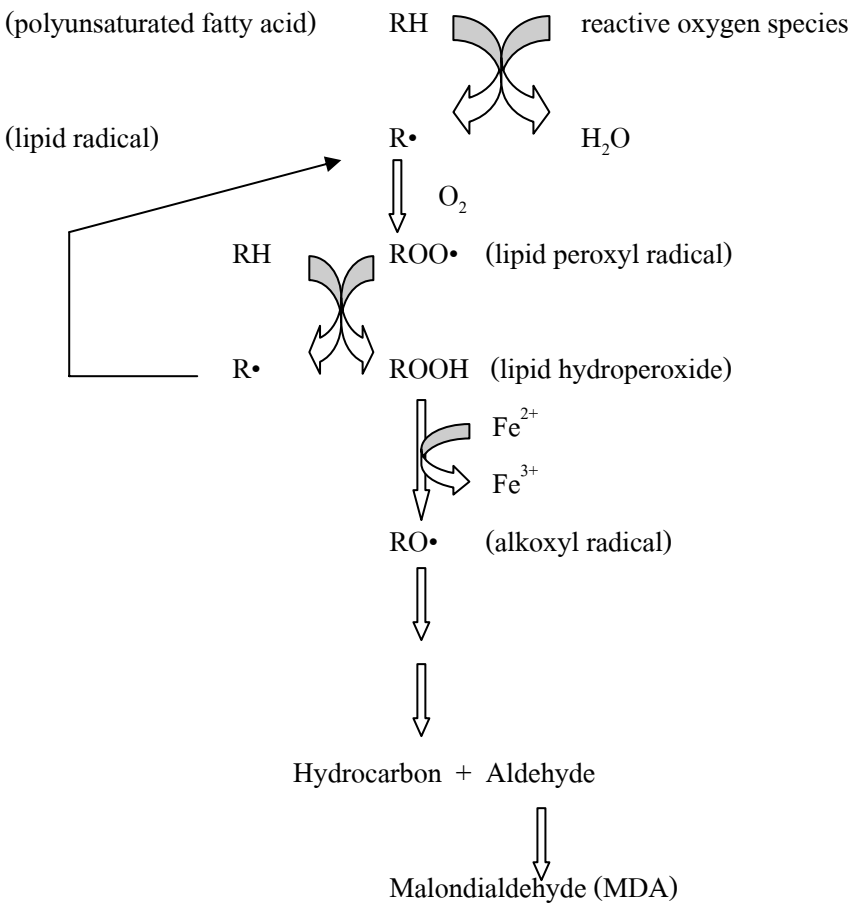
นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการเสื่อมสลายของคลอโรฟิลล์ (Inze´ and Montagu, 2002)

กลไกการเกิด lipid peroxidation ในพืช

Lipid peroxidation เกิดขึ้นเมื่อ reactive oxygen species ไปออกซิไดซ์ polyunsaturated fatty acids (PUFAs) โดย reactive oxygen species จะเข้าไปดึง $H^{\cdot}$ (hydrogen radical) จาก $-CH_2-$ เกิดเป็น $-\dot{C}H-$ เรียกว่า lipid radical (R•) ซึ่ง lipid radical จะรวมกับออกซิเจน เกิดเป็น lipid peroxyl radical (ROO•) และ lipid peroxyl radical มีความสามารถในการดึง $H^{\cdot}$ จากโมเลกุลของไขมันตัวต่อไป ได้เป็น lipid radical และ lipid hydroperoxide (ROOH) ซึ่ง lipid radical จะสามารถไปรวมกับออกซิเจนตัวต่อไป เกิดเป็น lipid peroxyl radical ทำให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ต่อเนื่องไปเรื่อยๆ โดยปกติ lipid hydroperoxide จะเสถียรที่อุณหภูมิปกติ แต่จะไม่เสถียรเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น และเมื่อมีไอออนของโลหะแทรนซิชัน เช่น เหล็ก (Fe^{2+}) ซึ่งจะเกิดเป็น alkoxyl radical (RO•) และจาก alkoxyl radical ปฏิกิริยาจะเกิดหลายขั้นตอน ได้เป็น hydrocarbon และ aldehydes ซึ่ง aldehydes ที่สำคัญที่เกิดขึ้น คือ malondialdehyde (MDA) ดังนั้นจึงมีการใช้ MDA เป็นดัชนีชี้วัดการเกิด lipid peroxidation ได้ (Halliwell and Gutterridge, 1989: Hodges *et al*.,1999) (ภาพที่ 3)

ผลของสารชนิดต่างๆ ต่อกระบวนการ lipid peroxidation

Lipid peroxidation เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเมื่อเกิด oxidative stress ในพืช โดยทั่วไปจะใช้ MDA หรือ malondialdehyde เป็นตัววัดการเกิด lipid peroxidation (Hodges *et al*., 1999) ซึ่งมีผู้ทำการศึกษาหลายท่านด้วยกัน เช่น Ranieri *et al*. (1996) พบว่าโอโซนส่งผลให้เกิด lipid peroxidation ของใบฟักทอง (*Cucurbita pepo* L. cv. Ambassador) Shim *et al*. (1999) พบว่าโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ชักนำให้เกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ในใบข้าวระยะต้นกล้า และอะลูมิเนียม (Al) ส่งผลให้เกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ในข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) (Peixoto *et al*., 1999) และ Cho and Kim (2003) พบว่าแคดเมียมส่งผลให้ปริมาณ MDA ของใบและรากของมะเขือเทศเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ Senevas *et al*. (2006b) พบว่าสารสกัดจาก *Hapalosiphon* sp. ส่งผลให้เกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ในรากของข้าวสาลี (*Triticum aestivum*) และเพิ่มการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ทั้งในลำต้นและรากของหอม (*A. cepa*) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด



ภาพที่ 3 กลไกการเกิด lipid peroxidation ในพืช
ที่มา: ดัดแปลงจาก Halliwell and Gutterridge (1989)

กระบวนการสังเคราะห์แสง

กระบวนการสังเคราะห์แสง (photosynthesis) เป็นกระบวนการทางชีวเคมีของสิ่งมีชีวิตที่สังเคราะห์แสงได้ เช่น พืชสีเขียว สาหร่ายสีเขียว ไซยาโนแบคทีเรีย หรือแบคทีเรียบางชนิด ใช้พลังงานจากแสงอาทิตย์เพื่อเปลี่ยนคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำให้เป็นสารประกอบอินทรีย์ ได้แก่ สารประกอบพวกคาร์โบไฮเดรต และปลดปล่อยออกซิเจนออกมา (Taiz and Zeiger, 1998)

การสังเคราะห์แสงในพืชเกิดขึ้นที่คลอโรพลาสต์ (chloroplast) ซึ่งเป็น plastid ชนิดหนึ่งที่มีรงควัตถุ (pigment) ที่สำคัญคือ คลอโรฟิลล์ (chlorophyll) รูปร่างคลอโรพลาสต์มีลักษณะกลมรี มีเยื่อหุ้ม (membrane) 2 ชั้น เยื่อชั้นในเรียกว่า lamella ซึ่งจะเรียงทบไปทบมาหลายครั้งจนมีลักษณะ

คล้ายถุง เรียกว่า thylakoid thylakoid เรียงซ้อนกันเป็นตั้ง เรียกว่า granum บนเยื่อของ thylakoid และ lamella ที่อยู่ระหว่าง grana จะมีรงควัตถุที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง และเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์แสงในช่วงของ light reaction ($NADP^+$ reductase และ ATP synthase) ภายในคลอโรพลาสต์มีของเหลว (gelatinous matrix) ที่เรียกว่า stroma ที่จะมีไรโบโซม ดีเอ็นเอ และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงในช่วงการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 fixation) (ศรีสม, 2549ก)

<u>รงควัตถุที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แสง (photosynthetic pigment)</u>

รงควัตถุชนิดต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงมีความสามารถในการดูดซับพลังงานแสง และทำให้รงควัตถุเหล่านี้ซึ่งปกติเมื่อไม่ได้รับแสงจะอยู่ในระดับพลังงานต่ำ (ground state) เปลี่ยนไปอยู่ในระดับพลังงานที่สูงกว่า (excited state) และทำให้เกิดการถ่ายทอดอิเล็กตรอนไปให้สารต่างๆ ที่มีระดับพลังงานต่ำกว่า ซึ่งเซลล์ของสิ่งมีชีวิตที่สามารถสังเคราะห์แสงได้นั้น จะต้องเป็นเซลล์ที่มีรงควัตถุสำหรับการสังเคราะห์แสง ซึ่งประกอบด้วย

1. รงควัตถุหลัก (primary pigment) รงควัตถุที่สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์แสง คือ chlorophyll a ($C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$) เป็นรงควัตถุที่มีสีเขียวอมน้ำเงิน (bluish-green) และดูดซับ (absorb) พลังงานที่ดีที่สุดที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร (แสงสีน้ำเงิน) และ 662 นาโนเมตร (แสงสีแดง)

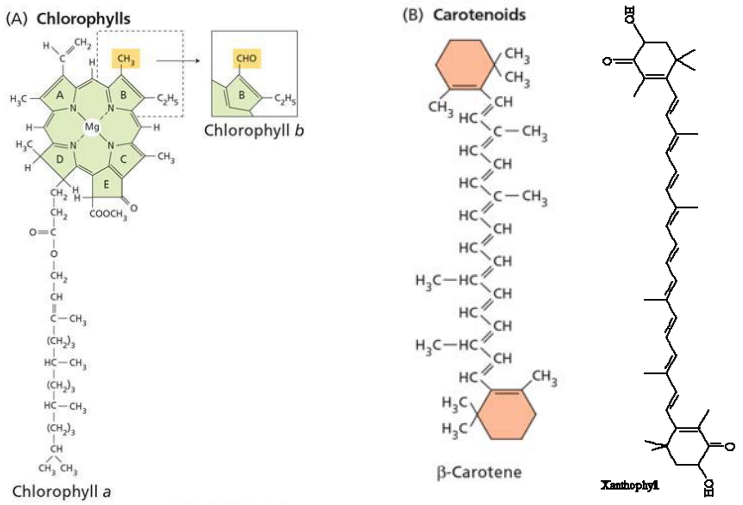
2. รงควัตถุประกอบ (accessory pigment) หมายถึง รงควัตถุชนิดอื่นๆ ที่ช่วยดูดซับพลังงานแสงในช่วงความยาวคลื่นที่ chlorophyll a ไม่สามารถดูดซับได้ แล้วส่งพลังงานดังกล่าวให้ chlorophyll a เพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสงต่อไป รงควัตถุประกอบ ได้แก่

2.1 chlorophyll b ($C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$) เป็นรงควัตถุที่มีสีเขียวอมเหลือง (yellowish-green) และดูดซับพลังงานแสงได้ดีที่สุดที่ความยาวคลื่น 454 และ 643 นาโนเมตร

2.2 carotenoid เป็นรงควัตถุที่มีสีแดง ส้ม เหลือง จะช่วยดูดซับพลังงานแสงในช่วงความยาวคลื่นที่ chlorophyll a ไม่สามารถดูดซับได้ แต่พลังงานดังกล่าวส่งไปให้ chlorophyll a เพียง 10% เท่านั้น หน้าที่สำคัญของ carotenoid คือ ช่วยป้องกันไม่ให้แสงทำลายคลอโรฟิลล์ (photooxidation) carotenoid ที่พบในพืชแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ

2.2.1 carotene เป็น carotenoid ที่พบมากในพืช มีสีแดงอมเหลือง (reddish-yellow) ส้ม ส้มอมแดง (reddish-orange) โดยทั่วไปมีสีส้ม β-carotene ดูดซับพลังงานแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 449 และ 475 นาโนเมตร

2.2.2 xanthophyll โดยทั่วไปมีสีเหลือง xanthophyll เกิดจากการออกซิไดซ์ carotene ดังนั้น โมเลกุลของ xanthophyll จึงมีออกซิเจนอยู่ทางตอนปลาย (ศรีสม, 2549ก)



ภาพที่ 4 โครงสร้างของรงควัตถุที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง
ที่มา: Taiz and Zeiger (2002)

ผลของสารชนิดต่างๆ ต่อรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสง

กระบวนการสังเคราะห์แสงเป็นกระบวนการที่สำคัญของพืช ซึ่งมีรงควัตถุที่สำคัญที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสง ได้แก่ คลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ (Hopkins and Hüner, 2004) โดยที่มีสารหลายชนิดที่มีผลต่อรงควัตถุเหล่านี้ ซึ่งจะทำให้ประสิทธิภาพของการสังเคราะห์แสงลดลง เช่น gabaculin (3-amino 2,3-dihydrobenzoic acid) มีศักยภาพในการยับยั้งการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ใน *Hordeum vulgare* (Hill *et al*., 1985) สารกำจัดวัชพืช diuron, fluridone และ sulcotrione ส่งผลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ของแตง (*Cucumis sativa*) และข้าวโพด (*Zea mays*) ลดลง (Kim *et al*., 2002) และสารกำจัดวัชพืช SAN 9789 มีผลยับยั้งการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ของกระหล่ำปลี (*Sinapis alba* L.) (Frosch *et al*., 1979) และ Panda *et al*. (2003) พบว่าสังกะสีและแคดเมียมชักนำให้เกิดอนุมูลอิสระของใบข้าวสาลี ซึ่งจะมีผลทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ลดลง นอกจากนี้ Pechová *et al*. (2003) พบว่าสารกำจัดวัชพืช amitrol (AM) ความเข้มข้น 60 และ 120 ไมโครโมลาร์ส่งผลให้ปริมาณแคโรทีนอยด์ของข้าวโพดลดลง

Ammonia assimilation

แอมโมเนียมไอออน (NH_4^+) หรือแอมโมเนีย (NH_3) สามารถพบในพืชทุกชนิด ซึ่งมาจากกระบวนการ nitrogen fixation หรือจากดิน โดยที่พืชจะไม่สะสมแอมโมเนียหรือแอมโมนียมไอออนในเซลล์ เนื่องจากแอมโมเนียมไอออนจะไปยับยั้งการผลิตพลังงานของเซลล์ คือการผลิต ATP ถึงแม้ว่าจะมีในปริมาณน้อยก็สามารถยับยั้งการผลิต ATP จากกระบวนการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนทั้งในไมโทคอนเดรีย และคลอโรพลาสต์ได้ และการสะสมแอมโมเนียที่มากเกินไปส่งผลให้พืชแสดงอาการผิดปกติหรือตายได้ พืชจึงไม่สะสมแอมโมเนียหรือแอมโมเนียมไอออน โดยพืชส่วนใหญ่หลีกเลี่ยงปัญหานี้โดยเปลี่ยนแอมโมเนียหรือแอมโมเนียมไอออนให้เป็นสารประกอบอินทรีย์ในโตรเจนหรือกรดอะมิโน (Hopkins, 1999)โดยกระบวนการ ammonia assimilation ซึ่งมี 2 กลไก คือ

1. แอมโมเนียทำปฏิกิริยากับกลูตาเมท (glutamate) โดยเอนไซม์ glutamine synthetase (GS) ได้กลูตามีน (glutamine) ซึ่งปฏิกิริยานี้ต้องการ ATP และกลูตามีนที่ได้จะทำปฏิกิริยากับ α-ketoglutarate โดยเอนไซม์ glutamate synthase (GOGAT) ได้กลูตาเมท ดังสมการ

$$\text{glutamate} + NH_4^+ + \text{ATP} \longrightarrow \text{glutamine} + \text{ADP} + \text{Pi}$$

$$\text{glutamine} + \alpha\text{-ketoglutarate} + \text{NADH} \longrightarrow 2\text{glutamate} + NAD^+$$

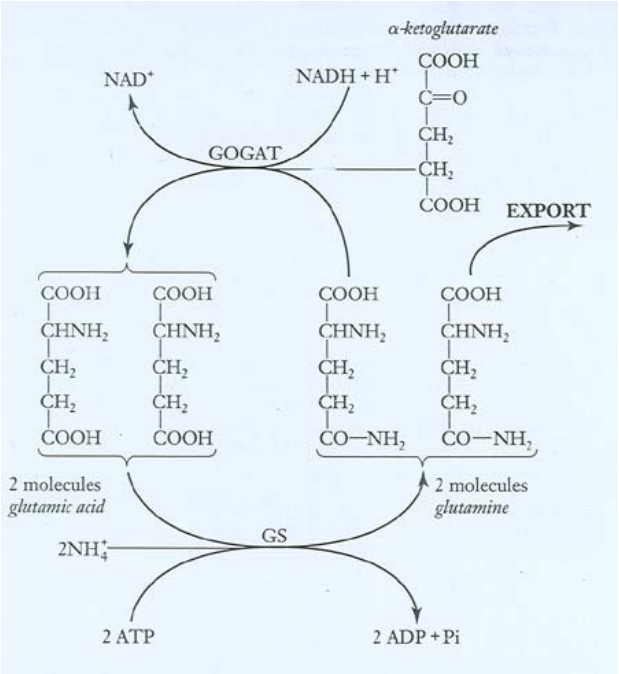
เอนไซม์ GS พบในคลอโรพลาสต์และในไซโทซอลของเซลล์ใบและในไซโทซอลของเซลล์ราก สารที่ให้อิเล็กตรอนในเซลล์ที่มีการสังเคราะห์แสงคือ ferredoxin ส่วนในเซลล์ที่ไม่มีการสังเคราะห์แสงสารที่ให้อิเล็กตรอนคือ NADH หรือ NADPH

2. แอมโมเนียทำปฏิกิริยากับ α-ketoglutarate โดยเอนไซม์ glutamate dehydrogenase (GDH) ซึ่งพบในคลอโรพลาสต์ และไมโทคอนเดรีย เอนไซม์ในไมโทคอนเดรียจะได้รับ NADH และ α-ketoglutarate จาก tricarboxylic acid cycle (TCA cycle)

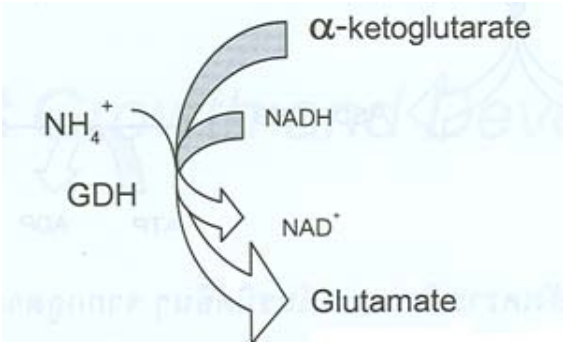
จากการศึกษาพบว่า pathway ที่สำคัญในกระบวนการ ammonia assimilation คือ pathway ที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ GS/GOGAT เนื่องจาก GS มีความสามารถในการทำปฏิกิริยา (affinity) กับแอมโมเนียสูงมาก (ศรีสม, 2549ข; Hopkins, 1999)

ผลของสารชนิดต่างๆ ต่อกระบวนการ ammonia assimilation

กระบวนการ ammonia assimilation เป็นกระบวนการสำคัญในการเปลี่ยนแอมโมเนีย ซึ่งเป็นพิษกับพืช (Hopkins and Hüner, 2004) ไปเป็นกรดอะมิโน โดย Pornprom *et al*. (2000) ได้ใช้การสะสมแอมโมเนียของกระบวนการ ammonia assimilation ในการคัดเลือกสายพันธุ์ถั่วเหลืองที่ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช glufosinate โดยสายพันธุ์ที่มีการสะสมแอมโมเนียน้อยเมื่อได้รับ glufosinate ถือว่ามีความต้านทานมาก และมีสารหลายชนิดที่มีผลยับยั้งกระบวนการนี้ ซึ่งมีรายงานดังนี้ Fentem *et al*. (1983) ศึกษาผลของ methionine sulfoximine (MSO) ในการยับยั้งกระบวนการ ammonia assimilation ของข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare* L.) พบว่ามีผลทำให้เอนไซม์ GS ลดลง และมีการสะสมแอมโมเนียเพิ่มขึ้นในราก และสารกำจัดวัชพืชในกลุ่ม phosphinis acid สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ GS ทำให้เกิดการสะสมแอมโมเนียในพืช ส่งผลให้พืชตายได้ (Devine *et al*., 1993)



<u>ภาพที่ 5</u> กระบวนการ ammonia assimilation โดยเอนไซม์ GS/GOGAT
ที่มา: Hopkins (1999)



<u>ภาพที่ 6</u> กระบวนการ ammonia assimilation โดยเอนไซม์ glutamate dehydrogenase
ที่มา: ศรีสม (2549ข)

การแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (Mitosis)

กระบวนการทั้งหมดของการแบ่งเซลล์ร่างกาย (somatic cell) จะแบ่งได้เป็น 2 ระยะ คือ การแบ่งนิวเคลียส เรียกว่า karyokinesis หรือไมโทซิส (mitosis) และการแบ่งไซโทพลาสซึม เรียกว่า cytokinesis การแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสจะมีความผันแปรในอัตราที่ต่ำมาก เนื่องจากมีการจำลองดีเอ็นเอ (DNA) ในระดับโมเลกุล และไม่มีการลดจำนวนโครโมโซม จึงทำให้ยังคงรักษาจีโนไทป์ (genotype) ไว้ได้เหมือนเดิม

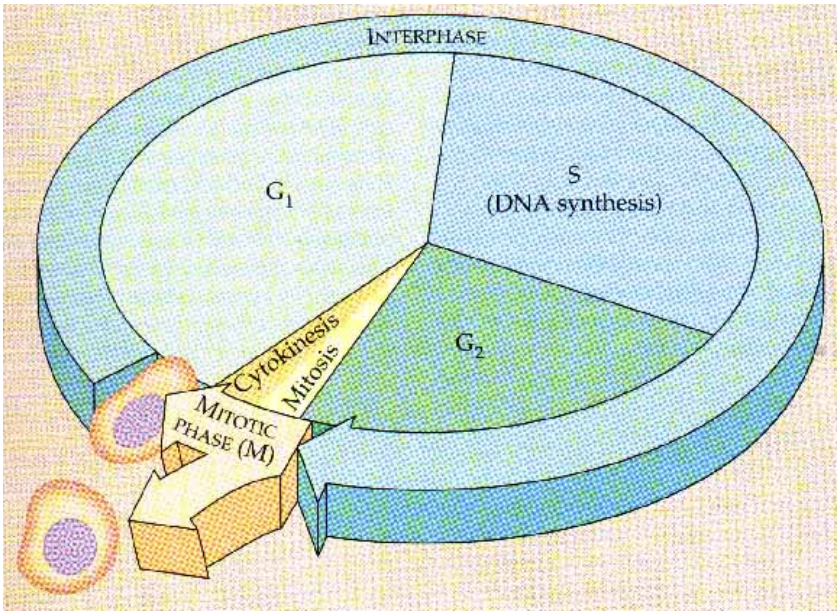
เมื่อสิ่งมีชีวิตโตเต็มที่แล้วเซลล์ร่างกายส่วนใหญ่จะหยุดการแบ่งตัว อย่างไรก็ตาม พบว่าไมโทซิสจะเกิดตลอดเวลาเฉพาะกับเซลล์ในบริเวณบางแห่งของร่างกาย เช่น เซลล์บริเวณเนื้อเยื่อเจริญ (meristematic tissue) ของปลายราก ยอด และตาของต้นพืช

วัฏจักรของเซลล์ (cell cycle)

วัฏจักรของเซลล์ (cell cycle หรือ mitotic cycle หรือ nuclear cycle) หมายถึง วงชีวิตของเซลล์อันประกอบด้วยระยะอินเตอร์เฟส (interphase) และไมโทซิส ระยะเวลาที่เซลล์ 1 เซลล์เข้าสู่ระยะอินเตอร์เฟสและไมโทซิสจนสิ้นสุดการแบ่งเซลล์ได้เซลล์ลูก 2 เซลล์นั้น เรียกว่า 1 วัฏจักรของเซลล์

เวลาใน 1 วัฏจักรของเซลล์ เรียกว่า 1 generation time โดยทั่วไปแล้วในสิ่งมีชีวิตต่างชนิด (species) กัน หรือสิ่งมีชีวิตอย่างเดียวกันแต่ต่างเนื้อเยื่อกันจะมี generation time ที่ต่างกันได้ โดยขึ้นกับปริมาณดีเอ็นเอในนิวเคลียส เซลล์ที่มีดีเอ็นเอในนิวเคลียสมากจะมีวัฏจักรของเซลล์ที่ยาวนานมากขึ้นด้วย เวลาส่วนใหญ่ของ generation time จะอยู่ที่ระยะอินเตอร์เฟส โดยทั่วไปแล้ววัฏจักรของเซลล์ใช้เวลานาน 20 ชั่วโมง เป็นเวลาของไมโทซิสประมาณ 1-1 ½ ชั่วโมง ที่เหลือเป็นเวลาของอินเตอร์เฟสทั้งหมด

วัฏจักรของเซลล์แบ่งเป็นระยะต่างๆ คือ ระยะอินเตอร์เฟส ซึ่งแบ่งเป็น ระยะ G_1 S และ G_2 ระยะการแบ่งเซลล์หรือระยะไมโทซิส ประกอบด้วย โปรเฟส เมทาเฟส แอนาเฟส และเทโลเฟส ดังนี้



ภาพที่ 7 วัฏจักรของการแบ่งเซลล์ในระยะต่างๆ
ที่มา: Campbell *et al*. (1999)

ระยะอินเตอร์เฟส (Interphase)

ระยะนี้เป็นช่วงที่ยาวที่สุดของการแบ่งเซลล์ เซลล์ในระยะนี้จะจัดจำแนกได้โดยดูนิวเคลียส เนื่องจากสายใยโครมาตินกระจายอยู่ทั่วนิวเคลียส สังเกตเห็นโครโมโซมได้ไม่ชัด ระยะนี้จะมีการสร้างสารที่สำคัญของโครโมโซม คือ ดีเอ็นเอ และฮีสโตน (histone) และการสะสมพลังงานต่างๆ ที่จำเป็นต่อไมโทซิส

ระยะอินเตอร์เฟสแบ่งออกเป็น 3 ระยะย่อย คือ

1. ระยะ G_1 เป็นระยะ 1st growth stage โครโมโซมคลายตัวยาว และกระจายอยู่ภายในเยื่อหุ้มนิวเคลียสจนไม่สามารถมองเห็นรูปร่างและพฤติกรรมได้ มีการสร้างโปรตีน RNA เอนไซม์เพื่อเตรียมสร้าง DNA เพื่อเข้าสู่การแบ่งเซลล์ในระยะถัดไป เซลล์ที่จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (differentiating cell) โดยทั่วไปจะหยุดในระยะนี้ แต่ถ้าเซลล์ที่มีการแบ่งตัวต่อไปจะเข้าสู่ระยะ S

2. ระยะ S เป็นระยะการสังเคราะห์ DNA และโปรตีนฮีสโตน เป็นระยะที่ใช้เวลานานและมีกระบวนการซับซ้อนมาก โครโมโซมเริ่มจำลองตัวเอง เมื่อจำลองเรียบร้อยแล้วโครโมโซมแต่ละแท่งจะประกอบด้วย 2 สายของ sister chromatid

3. ระยะ G_2 เป็นระยะ 2nd growth stage เริ่มมีการหดตัวของโครโมโซมเพื่อพร้อมที่จะมีการแบ่งไมโทซิสต่อไป ระยะนี้เซลล์สร้างสารที่จำเป็นต่อการหดตัวของโครโมโซม

Division Phase หรือ ระยะ M (M-Phase)

เป็นระยะที่มีการแบ่งนิวเคลียส และการแบ่งไซโทพลาสซึม ซึ่งโครโมโซมจะมีการเปลี่ยนแปลงหลายขั้นตอน ก่อนที่จะถูกแบ่งแยกออกจากกัน ประกอบด้วย 4 ระยะย่อย คือ

1.1 โปรเฟส (Prophase)

เป็นระยะแรกของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส ระยะต้นของโปรเฟสนั้นโครโมโซมปรากฏเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ มีขนาดขยายยาวโดยแต่ละเส้นประกอบด้วยสายใยเป็นคู่ สายใยคู่ของแต่ละโครโมโซมเรียกว่า ซิสเตอร์โครมาติด (sister chromatid) ดังนั้น องค์ประกอบของสารพันธุกรรมหรือยีนบนซิสเตอร์โครมาติดคู่เดียวกันจะเหมือนกัน ในระยะต่อมาของโปรเฟสโครโมโซมจะสั้นและหนาขึ้นมองเห็นได้ชัด โครโมโซมยังคงสภาพที่อยู่แยกกัน สำหรับในเซลล์พืชโครโมโซมยังคงกระจายอยู่ทั่วๆ ไปในนิวเคลียส จะมีบางโครโมโซมมาเกาะกับเยื่อหุ้มนิวเคลียส เช่น เซลล์รากหอม ปลายระยะโปรเฟส นิวคลีโอลัสลดขนาดลงและหายไป และช่วงท้ายๆ เยื่อหุ้มนิวเคลียสจะสลายไปด้วยก่อนเข้าสู่เมทาเฟส และจะเห็นโครโมโซมเป็นเส้นชัด และหดตัวสั้นมาก โครมาติดทั้งสองพันกันเป็นเกลียวทำให้มีความหนา แต่ละโครโมโซมจะมีรอยคอดติดสีจาง เรียกว่า centromere หรือ centochore ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการเกาะติดของสายใยสปินเดิล เพื่อช่วยแยกโครโมโซมออกจากกันในการแบ่งเซลล์

1.2 เมทาเฟส (Metaphase)

ระยะนี้มีการเปลี่ยนแปลงทั้งในไซโทพลาสซึมและโครโมโซม โครโมโซมจะหดตัวสั้นที่สุด มองเห็นได้ชัดเจนและจะเคลื่อนเข้าสู่ศูนย์กลางของเซลล์ จัดตัวอยู่ในแนวเดียวกัน เรียกว่า metaphase plate และจะเกิด spindle fiber ซึ่งเป็นโมเลกุลของโปรตีน มาเรียงต่อกันเป็นท่อเล็กๆ (microtubule) ขึ้นระหว่างขั้วทั้งสองของเซลล์ spindle fiber นี้จะช่วยดึงโครโมโซมให้เคลื่อนไปยังขั้วเซลล์ในระยะแอนาเฟส ระยะนี้มีความสำคัญมาก คือ โครโมโซมมีการหดสั้นมากที่สุด แต่ละโครโมโซมจะประกอบด้วยโครมาติด 2 อัน ซึ่งเป็นระยะที่เหมาะสมอย่างยิ่งในการนำโครโมโซมมาศึกษาทาง cytogenetic เช่น นับจำนวน ตรวจดูรูปร่าง และนำมาย้อมสีแบบต่างๆ ลักษณะที่บ่งชี้ว่าถึงช่วงท้ายของเมทาเฟส คือ สายโครมาติดสองสายของแต่ละโครโมโซมจะขาดหลุดออกจากกันตามแนวยาวของ centromere ทำให้โครมาติดแต่ละสายแยกออกจากกันเป็นอิสระ

1.3 แอนาเฟส (Anaphase)

ระยะนี้ centromere ของ sister chromatid ทั้งสองของแต่ละโครโมโซมแยกออกจากกัน และเคลื่อนย้ายไปคนละขั้วของเซลล์อย่างรวดเร็ว ทั้งนี้ เกิดจากการหดตัวของ spindle fiber ที่เกี่ยวโยงกับ centromere การเคลื่อนที่ของโครโมโซมเข้าสู่ขั้วเซลล์ดังกล่าว ทำให้โครโมโซมแสดงรูปร่างต่างๆ กันแล้วแต่ตำแหน่งของ centromere เช่น รูปตัว V, J หรือรูปแท่ง ระยะนี้เห็นโครโมโซมแยกเป็น 2 กลุ่ม แต่ละกลุ่มมีจำนวนโครโมโซมเท่ากัน โดยเท่ากับจำนวนดิพลอยด์ (diploid) ของสปีชีส์นั้นๆ แต่ละโครโมโซมจะประกอบด้วยโครมาติด 1 เส้น

กรณีเซลล์มีความผิดปกติโดยที่โครโมโซมประกอบด้วย 2 centromere จะสังเกตเห็นได้ว่าโครโมโซมยืดยาวเป็นสะพานต่อระหว่างสองขั้วของเซลล์ (anaphase bridge) ในปลายแอนาเฟสจะเกิดการขาดของโครโมโซม ณ จุดใดจุดหนึ่ง บางครั้งจะสังเกตเห็นโครโมโซมผิดปกติไม่เข้าขั้วหรือเข้าขั้วช้ากว่าโครโมโซมอื่นๆ เรียกว่า plaggard ซึ่งมักสูญหายไม่เข้าไปอยู่ในนิวเคลียสใหม่

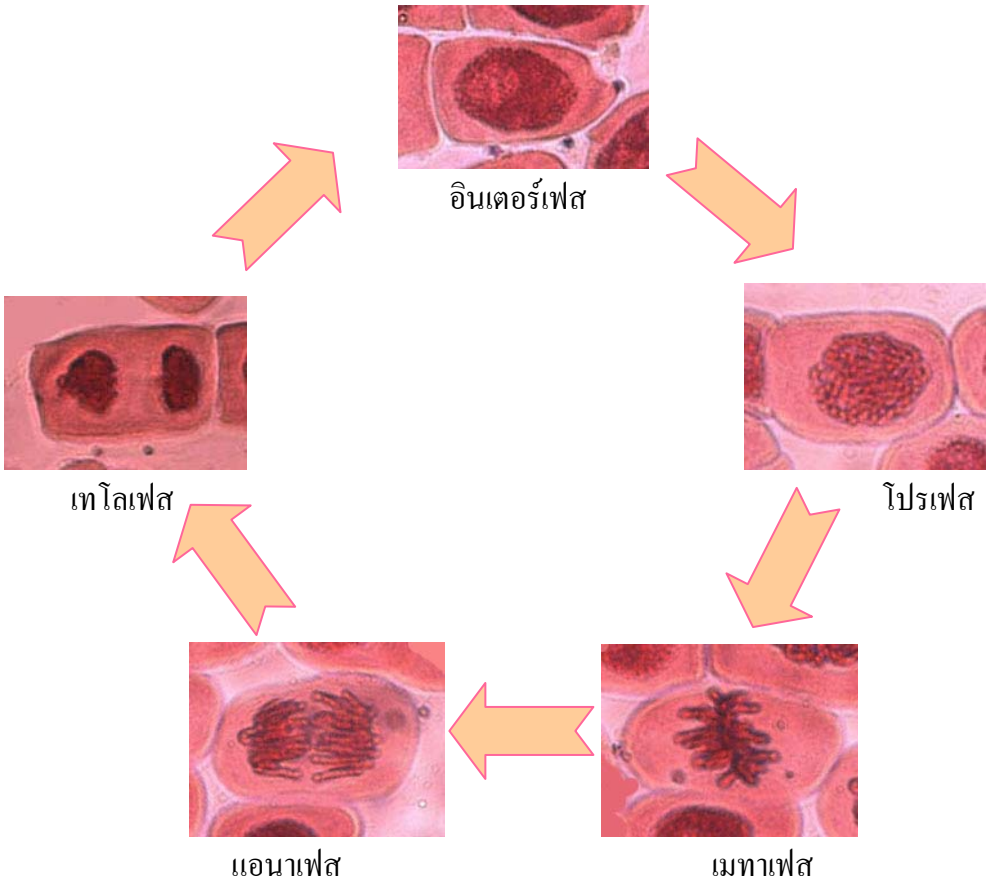
1.4 เทโลเฟส (Telophase)

โครโมโซมที่แยกไปอยู่คนละขั้วของเซลล์ จะเริ่มคลายการหดตัวและขยายยาวขึ้นเป็นเส้นใยโครมาตินเข้าสู่สภาพนิวเคลียสของอินเตอร์เฟส มีการปรากฏตัวของนิวคลีโอลัสด้วยจำนวนคงที่และตำแหน่งเดิมเหมือนกับเซลล์พ่อแม่ เริ่มเห็นผนังนิวเคลียสสร้างขึ้นล้อมแต่ละกลุ่มของโครโมโซม ภายหลังเมื่อมีการแบ่งของนิวเคลียสแล้ว จะเริ่มมีการแบ่งของไซโทพลาสซึม (cytokinesis)

<u>การแบ่งไซโทพลาสซึม (Cytokinesis)</u>

การแบ่งไซโทพลาสซึมเกิดขึ้นหลังการแบ่งนิวเคลียสระยะเทโลเฟส การแบ่งของไซโทพลาสซึม มักจะตามด้วยการแบ่งโปรโตพลาสออกเป็น 2 หน่วย ในเซลล์พืช จะมีการสร้างผนังเซลล์ (cell plate) มีลักษณะเป็นผนังบางกั้นตรงกลางเซลล์ ซึ่งในเวลาต่อมาจะมีสารชนิด cellulose มาสะสมจนเปลี่ยนสภาพเป็นผนังเซลล์ที่แข็งแรง เรียกว่า cell wall เมื่อมีการสร้าง cell plate จะยังคงมีช่องเล็กๆ เป็นระยะตามแนวของ cell plate กลายเป็น plasmodesmata เป็นเส้นทางสำหรับการเคลื่อนที่ของสารบางชนิดจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่ง สุดท้ายจากเซลล์แม่ (mother cell)

เริ่มต้น 1 เซลล์ จะสร้างได้เป็นเซลล์ลูก (doughter cell) จำนวน 2 เซลล์ (วิสุทธิ์, 2527; นิตย์ศรี, 2528; อมรา, 2535; พรรณี, 2545)



ภาพที่ 8 การแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะต่างๆ ในปลายรากหอม (*Allium ascalonicum* L.)
ที่มา: อินทิรา (2549)

ผลของสารกำจัดวัชพืชและสารสกัดจากธรรมชาติต่อกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส

ดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่า กลไกการทำลายของสารกำจัดวัชพืชที่สำคัญอันหนึ่งคือ การยับยั้งการแบ่งเซลล์บริเวณเนื้อเยื่อเจริญของพืช ซึ่งจะมีผลในกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (ทศพล, 2545) นอกจากนี้สารสกัดจากธรรมชาติก็ยังมีผลต่อการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสเช่นกัน ซึ่งมีรายงาน ดังนี้

Ateeq *et al*. (2002) พบว่า สาร pentachlorophenol (PCP), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) และ 2-chloro-2,6-diethyl-*N*-(butoxymethy) acetanilide (butachlor) ส่งผลให้ค่า mitotic index ลดลง ทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมของหอม (*Allium cepa*) ซึ่งเมื่อความเข้มข้นสูงจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาอีกด้วย และสารกำจัดแมลง ที่มีชื่อทางการค้าว่า cypermethrin และ fenvalerate ส่งผลให้ค่า mitotic index ลดลง และทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมของหอม (*A. cepa*) เช่นกัน (Chauhan *et al*, 1999) นอกจากนี้ Sanevas *et al*. (2006a) พบว่าสารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon* sp. ส่งผลยับยั้งการแบ่งเซลล์ที่ปลายรากของพืชหลายชนิด และทำให้ค่า mitotic index ของหอม (*Allium cepa*) ลดลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด และ Kuras *et al*. (2006) รายงานว่า สารสกัดจากเปลือกของ *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC ส่งผลยับยั้งกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสที่ปลายรากหอม (*Allium cepa*)

<u>ตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent)</u>

ตัวทำละลาย (solvent) เป็นของเหลวที่สามารถละลายตัวถูกละลาย (solute) ที่เป็นของแข็ง ของเหลว หรือก๊าซได้เป็นสารละลาย (solution) ตัวทำละลายที่คุ้นเคยมากที่สุดและใช้ในชีวิตประจำวัน คือน้ำ สำหรับคำจำกัดความที่อ้างถึงตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) จะหมายถึงตัวทำละลายอีกชนิดที่เป็นสารประกอบอินทรีย์ (organic compound) และมีคาร์บอนอะตอมอยู่ด้วย โดยปกติตัวทำละลายจะมีจุดเดือดต่ำ และระเหยง่าย หรือสามารถกำจัดโดยการกลั่นได้ ทั่วไปแล้วตัวทำละลายไม่ควรทำปฏิกิริยากับตัวถูกละลาย คือ ต้องมีคุณสมบัติเฉื่อยทางเคมี สำหรับสมบัติการละลายได้ของสารขึ้นอยู่กับหลักที่ว่า ‘like dissolves like’ คือตัวถูกละลายที่มีขั้วจะละลายในตัวทำละลายที่มีขั้ว และตัวถูกละลายที่ไม่มีขั้วจะละลายในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว สภาพความมีขั้วของสาร (polarity) สามารถบอกได้ด้วยพารามิเตอร์หลายชนิด ในที่นี้จะใช้ค่า E_T^N (normalized $E_T(30)$ solvent polarity parameter) (ตารางที่ 1) จะมีค่าตั้งแต่ 0.000 ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีสภาพมีขั้วน้อยที่สุดถึง 1.000 ซึ่งหมายถึงตัวทำละลายที่มีสภาพมีขั้วมากที่สุด คือน้ำ จากค่า E_T^N สามารถแบ่งตัวทำละลายออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ 1) ตัวทำละลายมีขั้ว (protic (HBD: hydrogen-bond donor) solvents) คือมีค่า E_T^N 0.5-1.0 2) ตัวทำละลายกึ่งมีขั้ว (dipolar non-HBD solvents) มีค่า E_T^N 0.3-0.5 3) ตัวทำละลายไม่มีขั้ว (apolar non-HBD solvents) มีค่า E_T^N 0.0 – 0.3 (Reichardt, 2003)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างค่า E_T^N ของตัวทำละลายบางชนิด

ตัวทำละลาย (solvents)	E_T^N
Tetramethylsilane (TMS)	0.000
Cyclohexane	0.006
Dichloromethane	0.309
Benzene	0.111
Methanol	0.762
Acetone	0.355
Water	1.000

ที่มา: Reichardt (2003)

ดังที่กล่าวมาแล้วว่า ตัวทำละลายต่างชนิดกันมีความสามารถในการละลายสารต่างกัน จึงมีผู้ทำการทดลองเลือกใช้ตัวทำละลายต่างชนิดกันในการสกัดสารจากไซยาโนแบคทีเรีย เช่น Fastner *et al*. (1998) สกัดสารจากไซยาโนแบคทีเรีย *Mycrocystis* spp. โดยใช้เมทานอลบริสุทธิ์ น้ำ กรดอะซิติก (acetic acid) 5 เปอร์เซ็นต์ เมทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ และสกัดด้วยเมทานอลก่อนแล้วตามด้วยน้ำ พบว่า เมทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ เป็นวิธีการที่สกัดสาร microcystin ได้ดีที่สุด และการสกัดสาร microcystin จาก *Planktothrix agardhii* โดยใช้ตัวทำละลายที่มีสภาพความมีขั้วต่างกัน ได้แก่ เฮกเซน (hexane) ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) เมทานอล และน้ำ พบว่า สารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายมีขั้ว คือ น้ำและเมทานอล จะส่งผลกระทบต่อระยะเอมบริโอและตัวหนอนของ *Danio rerio* (Keli *et al*., 2002) และ Herfindal *et al*. (2005) ทำการทดลองสกัดสารจากไซยาโนแบคทีเรียที่รวบรวมมาจาก Baltic Sea โดยใช้ น้ำ เมทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ และเมทานอลต่อไดคลอโรมีเทนอัตราส่วน 1:1 พบว่า สารที่สกัดด้วยน้ำ ทำให้เกิดพิษต่อตับ (hepatotoxic) ในหนูมากที่สุด รองลงมา คือ เมทานอล ซึ่งตรงข้ามกับ Asthana *et al*. (2006) ที่ทดลองใช้เมทานอล DMSO และน้ำสกัดสารจาก *Fischerella* sp. พบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลเท่านั้นที่มีผลยับยั้ง *Escherichia aerogenes*

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ไซยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon fontinalis* (Ag.) Bornet
2. เมล็ดพืชที่ใช้ทดลอง ได้แก่

   เมล็ดถั่วเหลือง พันธุ์เชียงใหม่ 60 (soybean: *Glycine max* L.)

   เมล็ดหญ้ายาง (Painted spurge: *Euphorbia heterophylla* L.)

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

   เมล็ดหญ้ารังนก (finger grass: *Chloris barbata* Sw.)

   เมล็ดไมยราบยักษ์ (giant sensitive plant: *Mimosa pigra* L.)

   เมล็ดผักกาดเขียวปลี (leaf mustard, indian mustard: *Brassica juncea* (L.) Czern.)

   หอมใหญ่ (onion: *Allium cepa* L.)
3. สารเคมี ได้แก่

   สารเคมีใช้เตรียมอาหารเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย สูตร BG-11 (Rippka *et al*.,1979)

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

   สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสง (Arnon, 1949)

   สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียในกระบวนการ ammonia assimilation (Weatherburn, 1967)

   สารเคมีสำหรับย้อมสีโครโมโซม (คณาจารย์ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2544)

4. เครื่องมือต่างๆ ได้แก่ เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์(spectrophotometer) เครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียด ตู้อบ เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) water bath หม้อนึ่งความดัน (autoclave) เครื่องปั๊มอากาศ เครื่องโฮโมจีไนเซอร์ (ULTRA-TURREX T25)

วิธีการ

การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *H. fontinalis*

นำ *H. fontinalis* มาเลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำไปตั้งไว้บนเครื่องเขย่า ความเข้มแสง 40 ไมโครไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อทำเป็นสต็อก จากนั้นนำไปปั่นให้กลุ่มเซลล์แยกออกจากกันเป็นเส้นสายเล็กๆ แล้วจึงนำไปเลี้ยงแบบเพิ่มปริมาณในโหลแก้วปากกว้างความจุ 4 ลิตร ที่บรรจุอาหารเหลวสูตร BG-11 ระดับ pH 7.5 ประมาณ 3 ลิตร ที่นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที และใส่เซลล์ของ *H. fontinalis* ที่ปั่นแล้วลงไป โดยให้มีความหนาแน่นของเส้นสายเริ่มต้น มีค่า optical density ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ประมาณ 0.1 ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ปิดปากโหลแก้วด้วยถุงพลาสติกที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปเลี้ยงบนชั้นในห้องปฏิบัติการ ที่อุณหภูมิห้อง ความเข้มแสงเฉลี่ย 40 ไมโครไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที ให้อากาศแก่ *H. fontinalis* ด้วยเครื่องปั๊มอากาศที่ผ่านการกรองด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

การเตรียมสารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรีย

เตรียมสารสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ น้ำกลั่น และเมทานอล โดยมีขั้นตอนการเตรียม ดังนี้

นำ *H. fontinalis* ที่ได้จากการเลี้ยงแบบเพิ่มปริมาณแล้ว 16 วัน ซึ่งจะได้เซลล์ของ *H. fontinalis* อยู่ในระยะ stationary (ณรงค์, 2548) กรองด้วยผ้าขาวบางหนา 2 ชั้น นำเซลล์ที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักแห้งคงที่ เซลล์แห้งที่ได้นำมาบดให้ละเอียดด้วยโกร่ง จากนั้นสกัดสารด้วยตัวทำละลาย (น้ำ และเมทานอล) โดยแช่เซลล์แห้งในตัวทำละลายตามความเข้มข้นที่ต้องการ และนำไปไว้บนเครื่องเขย่า ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์หนึ่ง นำสารสกัดที่ได้ไปใช้ในการทดลองต่อไป สำหรับสารสกัดที่สกัดด้วยเมทานอลนำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องกลั่นระเหย แล้วละลายสารที่ได้ด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการแล้วจึงนำสารละลายที่ได้ไปทำการทดสอบต่อไป

<u>การทดลองที่ 1</u> **<u>ศึกษาผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ต่อกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (mitosis)</u>**

ศึกษาผลของสารสกัดจาก *H .fontinalis* ต่อกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสที่ปลายรากหอม (*A. cepa*) โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด completely randomized design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ โดยจัดสิ่งทดลอง (treatment) แบบ factorial ประกอบด้วย 2 ปัจจัย คือ

ปัจจัย A : ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารจากไซยาโนแบคทีเรียมี 2 ชนิด คือ น้ำกลั่นและเมทานอล

ปัจจัย B : ความเข้มข้นของสารสกัดที่ได้จากไซยาโนแบคทีเรีย มี 3 ระดับ คือ 0, 10 และ 20 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม

วิธีการทดลอง

การเพาะหอมและเตรียมปลายรากหอม

เพาะรากหอมโดยนำไปวางบนภาชนะที่บรรจุสารสกัดความเข้มข้นต่างๆ ให้ส่วนโคนของหอมจุ่มอยู่ในสารละลาย นำไปวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยง 3 วัน จะได้รากหอมงอกออกมาอยู่ในสารละลาย จากนั้นสุ่มตัดปลายรากทั้ง 3 ซ้ำของแต่ละชุดทดลอง ในช่วงเวลา 9.00-11.00 น. แล้วนำรากไปแช่ในน้ำยาคงสภาพ (fixative solution) (เอธิลแอลกอฮอล์สัมบูรณ์ (absolute ethylalcohol): กรดน้ำส้มเข้มข้น (glacial acetic acid) = 3:1 ส่วน) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเปลี่ยนน้ำยาเป็นแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์

วิธีการย้อมโครโมโซม

สุ่มปลายรากที่แช่อยู่ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ มาชุดทดลองละ 3 ราก ตัดเอาเฉพาะส่วนปลายรากสีขาวขุ่นยาวประมาณ 2-3 มิลลิเมตร วางบนสไลด์ที่สะอาด หยดกรดเกลือลงไปบนส่วนราก 1-2 หยด ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที เพื่อละลายส่วนของผนังเซลล์ที่ติดกัน ซึ่งประกอบด้วยเพคตินและเซลลูโลส ทำให้เซลล์แยกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ และทำให้เซลล์อ่อนนุ่มง่ายต่อการขยี้ให้

เซลล์หลุดออกจากกัน จากนั้นซับกรดออกให้หมด และหยดน้ำลงไปเพื่อล้างกรดแล้วซับน้ำออก หยดสีย้อมโครโมโซม aceto-orcein ลงไป 1-2 หยด ใช้เข็มเขี่ยปลายแบนขยี้ปลายรากให้ละเอียด เพื่อทำให้เซลล์แยกออกจากกันได้มากที่สุด แยกเอาส่วนของรากที่มีขนาดใหญ่และขยะต่างๆ ทิ้งไป ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ใช้เวลา 3-5 นาที สำหรับการย้อมสี จากนั้นนำสไลด์ผ่านบนเปลวไฟ (พออุ่นๆ ขนาดที่เอามาแตะกับหลังมือจะทนได้) เพื่อให้เซลล์ของรากหอมติดกับสไลด์และโครโมโซมแผ่กระจายดีขึ้น และใช้เทคนิค squash คือ ใช้กระดาษทิชชูพับครึ่งวางบนโต๊ะ สอดสไลด์ให้ด้านที่มีกระจกปิดสไลด์หงายขึ้นและให้อยู่ระหว่างกระดาษซับ ใช้นิ้วหัวแม่มือกดบนกระจกปิดสไลด์ที่อยู่ใต้กระดาษ แรงกดที่มากพอจะทำให้เนื้อเยื่อแบนราบ และสีที่ล้นออกมาจะถูกกระดาษทิชชูซับไว้ (คณาจารย์ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2544)

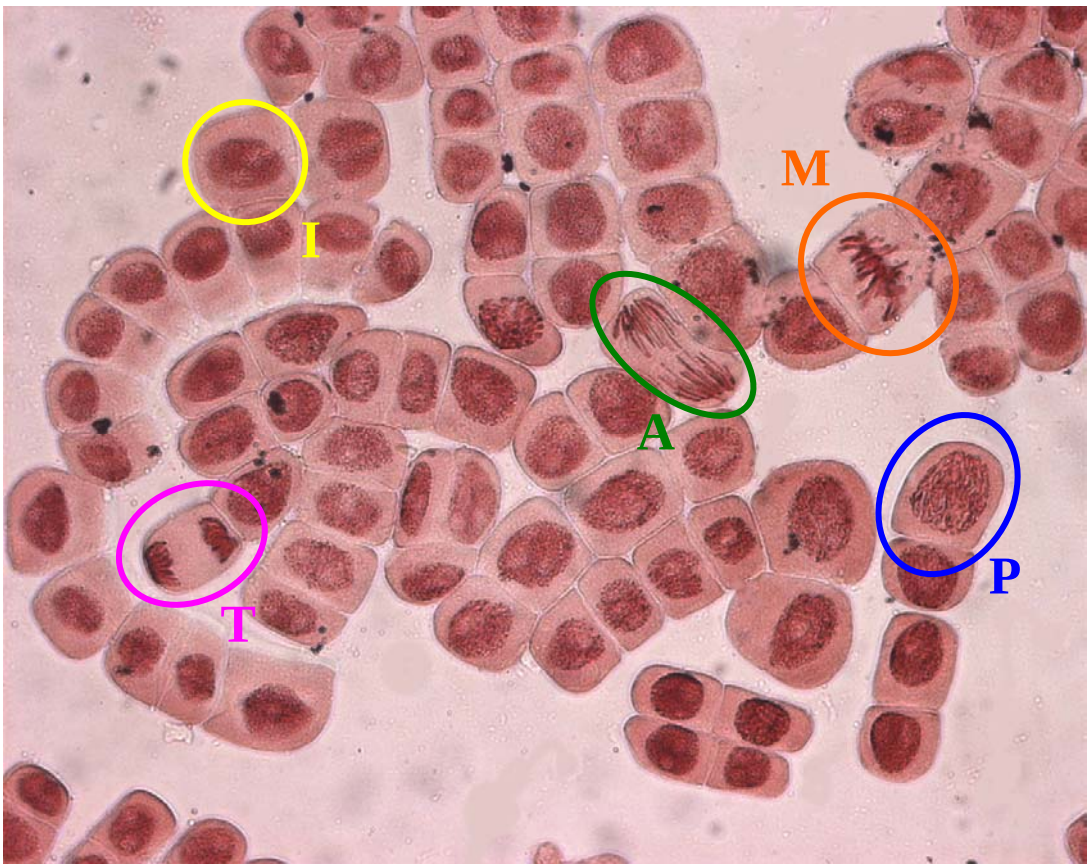
วิธีการนับระยะการแบ่งเซลล์

นำปลายรากที่ย้อมโครโมโซมมาตรวจสอบระยะการแบ่งเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องผ่าน และถ่ายภาพ โดยให้จำนวนเซลล์รวมในแต่ละรากมี 2000 $\pm$ 100 เซลล์ จากนั้นตรวจสอบความผิดปกติของโครโมโซมและนับระยะของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะต่างๆ คือ interphase prophase metaphase anaphase และ telophase (ภาพที่ 9) และนำมาคำนวณค่า mitotic index จากสูตร

$$\text{Mitotic Index (\%)} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ในระยะไมโทซิส* x 100}}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด}}$$

*หมายเหตุ: ระยะไมโทซิส ได้แก่ ระยะ prophase metaphase anaphase และ telophase

(Armbruster *et al*.,1991)



ภาพที่ 9 การนับเซลล์ในระยะต่างๆ ของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส กำลังขยาย 400x

I = Interphase, P = Prophase, M = Metaphase, A = Anaphase, T = Telophase

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ต่อการเกิด lipid peroxidation

ศึกษาผลของสารสกัดจาก *H .fontinalis* ต่อการเกิด lipid peroxidation โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด completely randomized design (CRD) โดยจัดสิ่งทดลอง (treatment) แบบ factorial จำนวน 3 ซ้ำ ประกอบด้วย 2 ปัจจัย คือ

ปัจจัย A : ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารจากไซยาโนแบคทีเรียมี 2 ชนิด คือ น้ำกลั่นและเมทานอล

ปัจจัย B : ความเข้มข้นของสารสกัดที่ได้จากไซยาโนแบคทีเรีย มี 5 ระดับ คือ 0, 25, 50, 75 และ 100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม

วิธีการทดลอง

การปลูกพืชและการฉีดพ่นสาร

ปลูกพืช ได้แก่ ไมยราบยักษ์ หญ้ายาง ผักกาดเขียวปลี ถั่วเหลือง หญ้ารังนก และข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ในกระถาง ซึ่งภายในบรรจุด้วยดินผสมสำเร็จ ทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยการฉีดพ่นสารสกัดจาก *H. fontinalis* ไปที่บริเวณใบและส่วนของพืชที่อยู่เหนือพื้นดิน โดยฉีดพ่นครั้งแรกเมื่อพืชมีอายุได้ 5 วัน ฉีดพ่นจำนวน 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกันเป็นระยะเวลา 5 วัน โดยครั้งสุดท้ายที่ฉีดพ่นสารสกัด ทิ้งระยะเวลา 1 วัน แล้วจึงเก็บต้นพืชไปวิเคราะห์การเกิด lipid peroxidation โดยแยกวิเคราะห์ในส่วนของพืช 2 ส่วน คือ ลำต้น และราก

การทดสอบการเกิด lipid peroxidation

โดยการวัดปริมาณของ malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นดัชนีชี้วัดการเกิด lipid peroxidation โดยดัดแปลงจากวิธีของ Velikova *et al.* (2000) โดยใช้น้ำหนักพืช 0.5 กรัม บดให้ละเอียดด้วยโกร่งโดยใช้ไนโตรเจนเหลว ใส่สารละลาย trichloroacetic acid (TCA) ความเข้มข้น 0.1% (w/v) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที และไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำเฉพาะสารละลายส่วนบนปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเติม triobarbituric acid (TBA) ความเข้มข้น 0.5% (w/v) ใน trichloroacetic acid ความเข้มข้น 20% (w/v) ปริมาตร 2 มิลลิลิตรจากนั้นนำไปแช่ในน้ำอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และนำออกมาแช่น้ำแข็งทันที 5 นาที ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ 5000xg นาน 5 นาที นำเฉพาะสารละลายส่วนบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 532 และ 600 นาโนเมตร และนำมาคำนวณหาปริมาณ MDA จากสูตร

$$\text{ปริมาณ MDA (µmol/g FW.)} = \left[\frac{(A_{532} - A_{600}) \times 3.0 \times 10^{-6} \times 5.0}{155 \times 1 \times 1.0} \right] \div 0.5$$

<u>การทดลองที่ 3</u> **<u>ศึกษาผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ต่อปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์แสง (photosynthetic pigment)</u>**

ศึกษาผลของสารสกัดจาก *H .fontinalis* ต่อปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสงโดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด completely randomized design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ โดยจัดสิ่งทดลอง (treatment) แบบ factorial ประกอบด้วย 2 ปัจจัย คือ

ปัจจัย A : ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารจากไซยาโนแบคทีเรียมี 2 ชนิด คือ น้ำกลั่นและเมทานอล

ปัจจัย B : ความเข้มข้นของสารสกัดที่ได้จากไซยาโนแบคทีเรีย มี 5 ระดับ คือ 0, 25, 50, 75 และ 100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม

วิธีการทดลอง

การปลูกพืชและการฉีดพ่นสาร

ปลูกพืชและฉีดพ่นสารเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2

การวิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสง

ชั่งใบพืชหนัก 0.5 กรัม หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ สกัดคลอโรฟิลล์ด้วย acetone ความเข้มข้น 80% (v/v) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที กรองด้วย buchner funnel สกัดคลอโรฟิลล์ซ้ำด้วย acetone ความเข้มข้น 80% (v/v) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที กรองด้วย buchner funnel ถ้ายังสกัดไม่หมด ให้สกัดครั้งที่ 3 ด้วย acetone ความเข้มข้น 80% (v/v) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้น rinse โกร่งและ buchner funnel ด้วย acetone ความเข้มข้น 80% (v/v) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย acetone ความเข้มข้น 80% (v/v) ให้มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 440 663 และ 645 นาโนเมตร คำนวณปริมาณของคลอโรฟิลล์ ตามสูตรของ Arnon (1949)

Chlorophyll a = $12.7A_{663} - 2.69A_{645}$ มิลลิกรัมต่อลิตร

Chlorophyll b = $22.9A_{645} - 4.68A_{663}$ มิลลิกรัมต่อลิตร

Total chlorophyll = $20.2A_{645} + 8.02A_{663}$ มิลลิกรัมต่อลิตร

Carotenoid = $4.69A_{440} - 0.268\ (20.2A_{645} + 8.02A_{663})$ มิลลิกรัมต่อลิตร

<u>การทดลองที่ 4 ศึกษาผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ต่อกระบวนการ ammonia assimilation</u>

ศึกษาผลของสารสกัดจาก *H .fontinalis* ต่อกระบวนการ ammonia assimilation โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด completely randomized design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ โดยจัดสิ่งทดลอง (treatment) แบบ factorial ประกอบด้วย 2 ปัจจัย คือ

ปัจจัย A : ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารจากไซยาโนแบคทีเรียมี 2 ชนิด คือ น้ำกลั่นและเมทานอล

ปัจจัย B : ความเข้มข้นของสารสกัดที่ได้จากไซยาโนแบคทีเรีย มี 5 ระดับ คือ 0, 25, 50, 75 และ 100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม

วิธีการทดลอง

การปลูกพืชและการฉีดพ่นสาร

ปลูกพืชและฉีดพ่นสารเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2

การวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียในกระบวนการ ammonia assimilation

ชั่งตัวอย่างพืชหนัก 2 กรัม บดตัวอย่างพืชด้วยไนโตรเจนเหลว เติมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 6 มิลลิลิตร กรดซัลโฟซาลิไซลิก 0.18 กรัม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที (rpm) นาน 15 นาที นำสารละลายใสส่วนบน (supernatant) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เติมสารละลาย A (ฟีนอล

(phenol) 1 กรัม และโซเดียมไนโตรพรัสไซด์ (sodium nitroprusside) 5 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมสารละลาย B (โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) 0.5 กรัม และโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (sodium hypochlorite) 0.84 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร และนำไปหาความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐาน ซึ่งใช้สารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) เป็นสารละลายมาตรฐาน โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานแอมโมเนียมความเข้มข้น 25, 50 และ 100 พีพีเอ็ม ใส่สารละลาย A ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่ 1, 2, 3 และ 4 ปิเปตสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0 (น้ำกลั่น), 25, 50 และ 100 พีพีเอ็ม ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองที่ 1, 2, 3 และ 4 เขย่าให้เข้ากัน เติมสารละลาย B ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร และทำกราฟมาตรฐาน จากนั้นคำนวณหาปริมาณแอมโมเนียในตัวอย่างพืช จากสูตร

$$\text{ปริมาณแอมโมเนียในตัวอย่างพืช (พีพีเอ็ม)} = \frac{C \times Vf \times Ve}{W \times Va}$$

C = ความเข้มข้นแอมโมเนียจากกราฟมาตรฐาน (พีพีเอ็ม)

Vf = ปริมาตรสุดท้าย (มิลลิลิตร)

Ve = ปริมาตรกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการสกัด (มิลลิลิตร)

W = น้ำหนักตัวอย่างพืช (กรัม)

Va = ปริมาตรสารละลายตัวอย่างพืชที่ใช้ในการวิเคราะห์ (มิลลิลิตร)

(Weatherburn, 1967)

<u>การวิเคราะห์ผลการทดลอง</u>

นำผลการทดลองที่ได้จากกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส การวิเคราะห์กระบวนการ lipid peroxidation รงควัตถุที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง และปริมาณแอมโมเนีย ไปวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป IRRISTAT เพื่อตรวจสอบว่าสารสกัดจาก *H. fontinalis* มีผลต่อการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส การเกิด lipid peroxidation รงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสง และปริมาณแอมโมเนียหรือไม่ ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารและความเข้มข้นของสารสกัดในระดับต่างๆ ส่งผลต่อการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส การเกิด lipid

peroxidation รงควัตถุที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง และปริมาณแอมโมเนียแตกต่างกันหรือไม่ โดยตรวจสอบค่าความแปรปรวนของสิ่งทดลองด้วย F-test และความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี LSD (Least significant difference)

ผลและวิจารณ์

ผล

การทดลองที่ 1 ผลของสารกัดจาก *H. fontinalis* ต่อการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของปลายรากหอม

จากการทดสอบผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ต่อการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสที่ปลายรากหอม พบว่า

เมื่อเพาะรากหอมในสารสกัดที่ความเข้มข้น 0, 10 และ 20 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ที่สกัดด้วยตัวทำละลายสองชนิด คือ น้ำกลั่น และเมทานอล พบว่า สารสกัดมีผลให้ความยาวของรากหอมลดลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า ดังภาพที่ 10

0 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร 10 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร 20 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร

0 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร 10 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร 20 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร

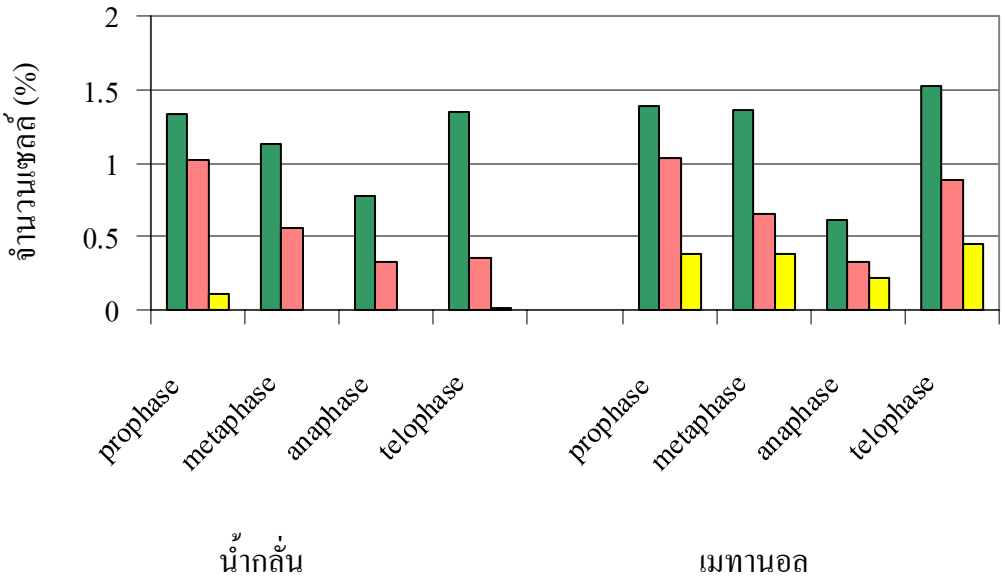
ภาพที่ 10 ความยาวรากของหอม (*Allium cepa* L.) เมื่อได้รับสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่สกัดด้วยน้ำกลั่น (ก) และเมทานอล (ข) ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 3 วัน

จากการศึกษาผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ต่อการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะต่างๆ ที่ปลายรากหอม พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดทั้งสารสกัดด้วยน้ำและเมทานอล ทำให้การแบ่งเซลล์ในระยะไมโทซิสลดลง (ภาพที่ 12 และ 13) โดยที่สารสกัดที่สกัดด้วยน้ำมีผลให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ในระยะต่างๆ น้อยกว่าสารสกัดด้วยเมทานอล แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 2) และสารสกัดด้วยน้ำและเมทานอลส่งผลต่อการแบ่งเซลล์ระยะต่างๆ ดังนี้ สารสกัดด้วยน้ำและเมทานอลความเข้มข้น 20 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร มีผลให้การแบ่งเซลล์ยังคงอยู่ในระยะอินเตอร์เฟส ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุม โดยมีเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ 99.87 และ 98.58 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในการแบ่งเซลล์ระยะไมโทซิส พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำและเมทานอล ทำให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ในระยะไมโทซิส ได้แก่ ระยะโปรเฟส เมทาเฟส แอนาเฟส และเทโลเฟสลดลง โดยที่สารสกัดด้วยน้ำความเข้มข้น 20 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ทำให้การแบ่งเซลล์ในระยะโปรเฟส แอนาเฟส และเทโลเฟสลดลงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากชุดควบคุม โดยมีเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ 0.11, 0.00 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่ระยะเมทาเฟสสารสกัดด้วยน้ำความเข้มข้น 10 และ 20 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ลดลงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุม โดยมีเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ 0.56 และ 0.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับสารสกัดด้วยเมทานอล พบว่า สารสกัดความเข้มข้น 10 และ 20 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ระยะเมทาเฟสลดลงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ 0.65 และ 0.38 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่ในระยะอื่นสารสกัดด้วยเมทานอลมีผลให้การแบ่งเซลล์ลดลงเช่นกัน แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม (ตารางที่ 2) และสำหรับค่า mitotic index พบว่า สารสกัดที่สกัดด้วยน้ำกลั่นส่งผลยับยั้งการแบ่งเซลล์มากกว่าเมทานอลแต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ คือมีค่า 2.37 และ 3.07 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และสารสกัดด้วยน้ำกลั่นความเข้มข้น 20 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ทำให้ค่า mitotic index ลดลงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากชุดควบคุม โดยมีค่า 0.13 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดด้วยเมทานอลความเข้มข้น 20 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ทำให้ค่า mitotic index ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน โดยมีค่า 1.42 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2 และภาพที่ 11)

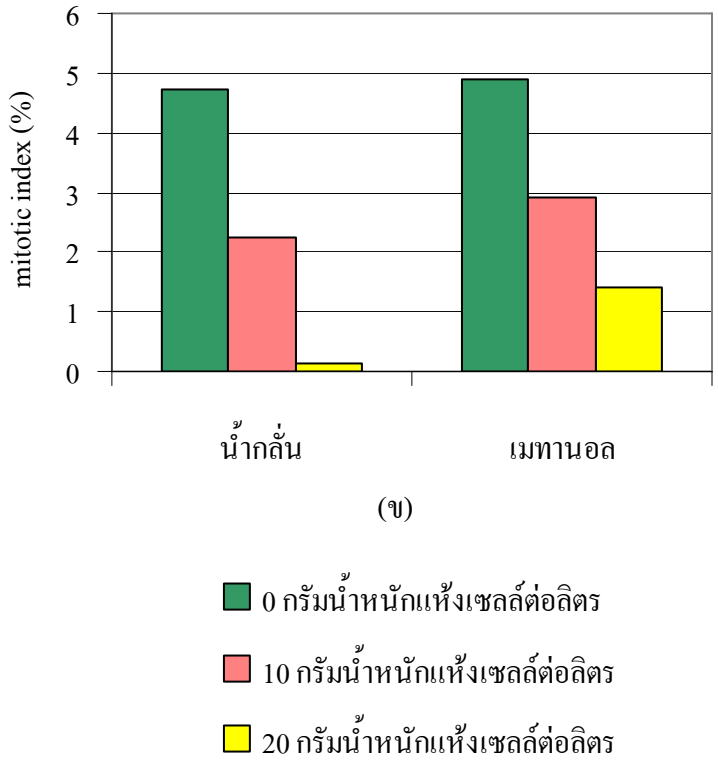
ตารางที่ 2 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกันต่อจำนวนเซลล์ (%) ในระยะต่างๆ ของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส ที่ปลายรากหอม

ความเข้มข้นของสารสกัด (กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร)	จำนวนเซลล์ (%)											
	ระยะ อินเตอร์เฟส		ระยะไมโทซิส								Mitotic Index (%)	
			โปรเฟส		เมทาเฟส		แอนาเฟส		เทโลเฟส			
	น้ำกลั่น	เมทานอล	น้ำกลั่น	เมทานอล	น้ำกลั่น	เมทานอล	น้ำกลั่น	เมทานอล	น้ำกลั่น	เมทานอล	น้ำกลั่น	เมทานอล
0	95.43 b[1/]	95.09 b	1.33 a	1.39	1.13 a	1.36 a	0.77 a	0.61	1.35 a	1.52	4.74 a	4.91 a
10	97.74 ab	97.10 ab	1.02 ab	1.03	0.56 b	0.65 b	0.32 ab	0.33	0.36 ab	0.88	2.25 ab	2.90 ab
20	99.87 a	98.58 a	0.11 b	0.38	0.00 b	0.38 b	0.00 b	0.22	0.20 b	0.45	0.13 b	1.42 b
เฉลี่ย	97.68	96.92	0.82	0.93	0.56	0.80	0.36	0.39	0.58	0.95	2.37	3.07

1/ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันตามสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

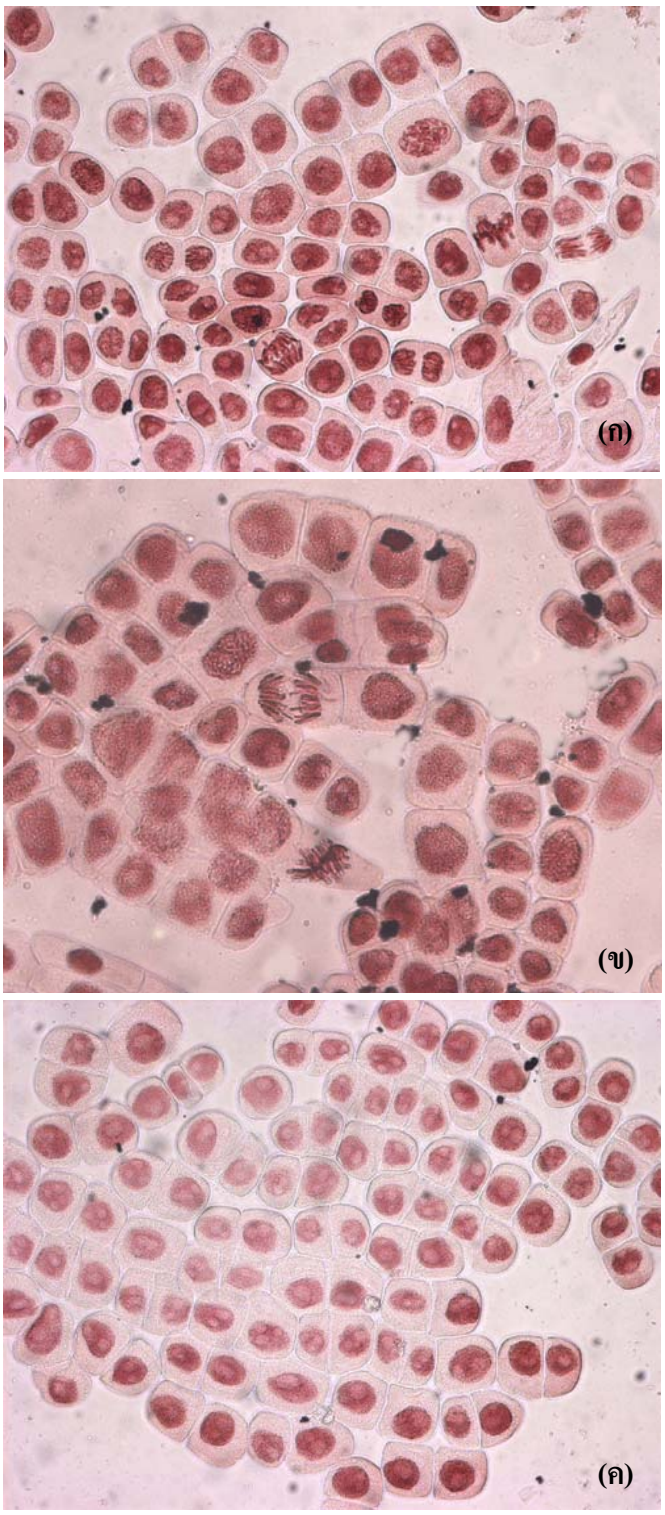


(ก)

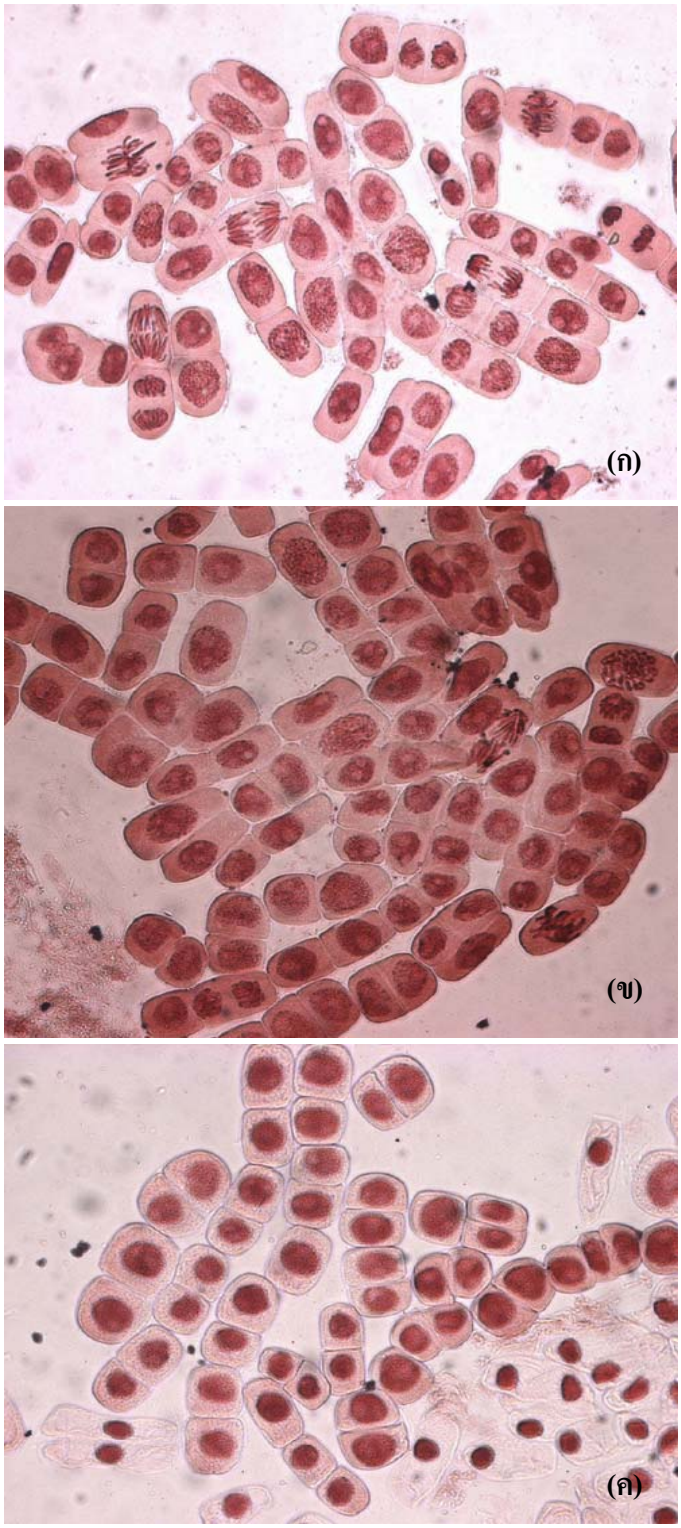


(ข)

ภาพที่ 11 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อ (ก) จำนวนเซลล์ (%) ในระยะไมโทซิส และ (ข) ค่า mitotic index (%) ของการแบ่งเซลล์ที่ปลายรากหอม

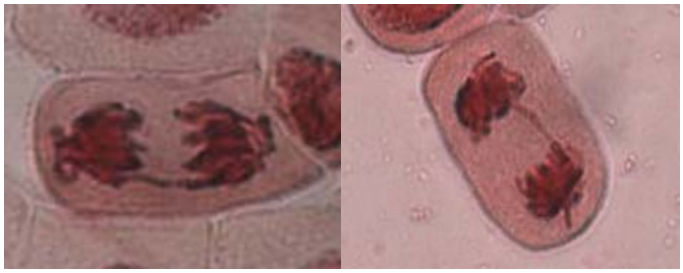


ภาพที่ 12 ตัวอย่างการแบ่งเซลล์ของปลายรากหอม เมื่อได้รับสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำกลั่นความเข้มข้นต่างๆ (ก) 0 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร (ข) 10 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร (ค) 20 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร

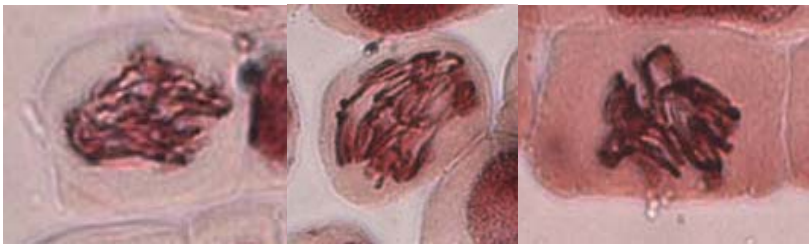


ภาพที่ 13 ตัวอย่างการแบ่งเซลล์ของปลายรากหอม เมื่อได้รับสารสกัดที่สกัดด้วยเมทานอลความเข้มข้นต่างๆ (ก) 0 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร (ข) 10 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร (ค) 20 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร

นอกจากนี้ จากผลการทดลอง สามารถพบความผิดปกติของโครโมโซม ซึ่งสังเกตเห็นได้ชัดเจนสองลักษณะ คือ การเกิด anaphase bridge จากปลายรากหอมที่แช่ในสารสกัดด้วยเมทานอล ความเข้มข้น 10 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร และการเกิด stickiness จากปลายรากหอมที่แช่ในสารสกัดด้วยน้ำความเข้มข้น 10 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ดังภาพที่ 14 โดยที่ในชุดควบคุมไม่พบลักษณะอาการผิดปกติดังกล่าว



(ก)



(ข)

ภาพที่ 14 ความผิดปกติของโครโมโซม (ก) anaphase bridge (ข) stickiness

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ต่อการเกิด lipid peroxidation

สารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน มีผลต่อการเกิดกระบวนการ lipid peroxidation ในวัชพืชและพืชปลูกชนิดต่างๆ ดังนี้

2.1 ไมยราบยักษ์ จากผลการทดลอง พบว่า สารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่สกัดด้วยน้ำกลั่น มีผลทำให้เกิดกระบวนการ lipid peroxidation แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากสารสกัดด้วยเมทานอล ทั้งในส่วนของลำต้นและรากของไมยราบยักษ์ โดยที่สารสกัดด้วยน้ำกลั่นทำให้มีปริมาณ MDA มากกว่าสารสกัดด้วยเมทานอล และสารสกัดจาก *H. fontinalis* ด้วยน้ำกลั่น ส่งผล

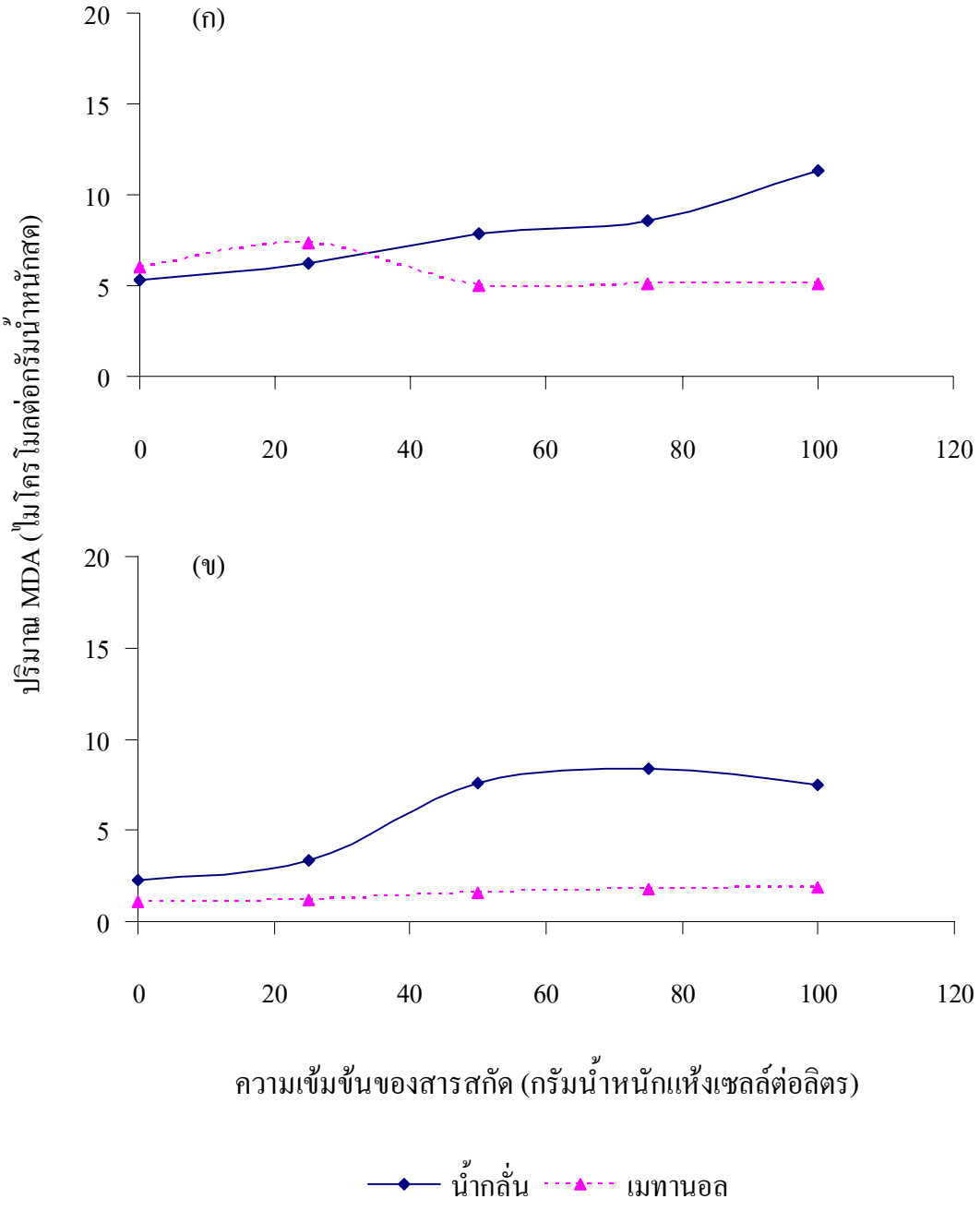
ให้ปริมาณ MDA ของลำต้นไมยราบยักษ์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุม คือเมื่อใช้สารสกัดความเข้มข้น 75 และ 100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร วัดปริมาณ MDA ได้ 8.581 และ 11.316 ไมโครโมลต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ (ตารางที่ 3) และเมื่อใช้สารสกัดด้วยเมทานอล พบว่า สารสกัดจาก *H. fontinalis* ทุกความเข้มข้น ไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากชุดควบคุม ในกรณีของรากไมยราบยักษ์ พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด จะส่งผลให้ปริมาณ MDA เพิ่มขึ้น โดยสารสกัดด้วยน้ำกลั่นความเข้มข้น 25, 50, 75 และ 100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ส่งผลแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยวัดปริมาณ MDA ได้ 3.387, 7.548, 8.413 และ 7.446 ไมโครโมลต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ และเมื่อใช้สารสกัดด้วยเมทานอล พบว่า สารสกัดทุกความเข้มข้นส่งผลไม่แตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม และปริมาณ MDA ที่สะสมที่รากมีปริมาณน้อยกว่าของลำต้น ทั้งสารสกัดด้วยน้ำและเมทานอล (ตารางที่ 3 และ ภาพที่ 15)

ตารางที่ 3 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณ MDA ในลำต้นและรากของไมยราบยักษ์

ความเข้มข้นของสารสกัด (กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร)	ปริมาณ MDA (ไมโครโมลต่อกรัม (µmol/g FW))			
	ลำต้น		ราก	
	น้ำกลั่น	เมทานอล	น้ำกลั่น	เมทานอล
0	5.324 c[1/]	6.000	2.228 c[1/]	1.068
25	6.194 bc	7.355	3.387 b	1.165
50	7.837 bc	5.032	7.548 a	1.551
75	8.581 b	5.097	8.413 a	1.806
100	11.316 a	5.097	7.446 a	1.871
เฉลี่ย	7.850 A[2/]	5.716 B	5.805 A[2/]	1.492 B

1/ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันตามสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2/ ค่าเฉลี่ยในแนวนอนที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันตามสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 15 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณ MDA ใน (ก) ลำต้นและ (ข) รากของไมยราบยักษ์

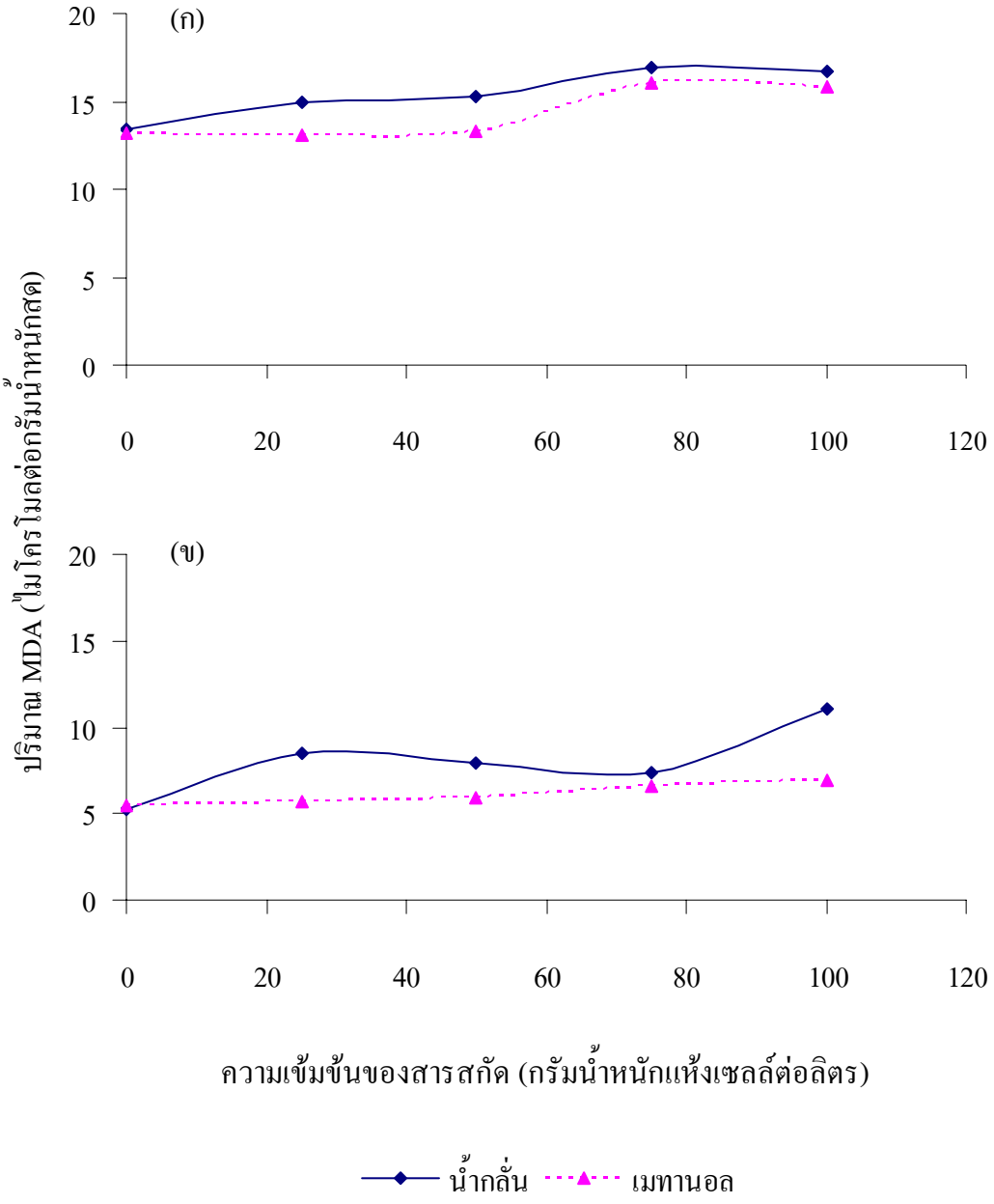
2.2 หญ้ายาง จากผลการทดลอง พบว่า สารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่สกัดด้วยน้ำกลั่นและเมทานอลมีผลต่อการเกิด lipid peroxidation แตกต่างกันทางสถิติทั้งในส่วนของลำต้นและรากของหญ้ายาง โดยที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำกลั่นจะทำให้ปริมาณ MDA เพิ่มขึ้นในส่วนลำต้น สารสกัดความเข้มข้น 75 และ 100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร มีผลให้ปริมาณ MDA เพิ่มขึ้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุม โดยวัดปริมาณ MDA ได้ 16.968 และ 16.710 ไมโครโมลต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ (ตารางที่ 4) ในกรณีของราก พบว่า สารสกัดที่สกัดด้วยน้ำความเข้มข้น 25 และ 100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ส่งผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุม โดยวัดปริมาณ MDA ได้ 8.516 และ 11.097 ไมโครโมลต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ และเมื่อใช้สารสกัดด้วยเมทานอล พบว่า ในส่วนของลำต้น สารสกัดความเข้มข้น 75 และ 100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ส่งผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุม โดยวัดปริมาณ MDA ได้ 16.065 และ 15.871 ไมโครโมลต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ สำหรับกรณีของรากพบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลทุกความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุม และปริมาณ MDA ที่สะสมในรากมีค่าน้อยกว่าของลำต้น ทั้งสารสกัดด้วยน้ำและเมทานอล (ตารางที่ 4 และ ภาพที่ 16)

ตารางที่ 4 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณ MDA ในลำต้นและรากของหญ้ายาง

ความเข้มข้นของสารสกัด (กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร)	ปริมาณ MDA (ไมโครโมลต่อกรัม (µmol/g FW))			
	ลำต้น		ราก	
	น้ำกลั่น	เมทานอล	น้ำกลั่น	เมทานอล
0	13.355 b[1/]	13.161 b	5.290 c	5.419
25	14.903 ab	13.097 b	8.516 b	5.677
50	15.226 ab	13.290 b	7.935 bc	5.871
75	16.968 a	16.065 a	7.354 bc	6.582
100	16.710 a	15.871 a	11.097 a	6.903
เฉลี่ย	15.432[2/] A	14.297 B	8.038 A	6.091 B

1/ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันตามสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2/ ค่าเฉลี่ยในแนวนอนที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันตามสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 16 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณ MDA ใน (ก) ลำต้นและ (ข) รากของหญ้ายาง

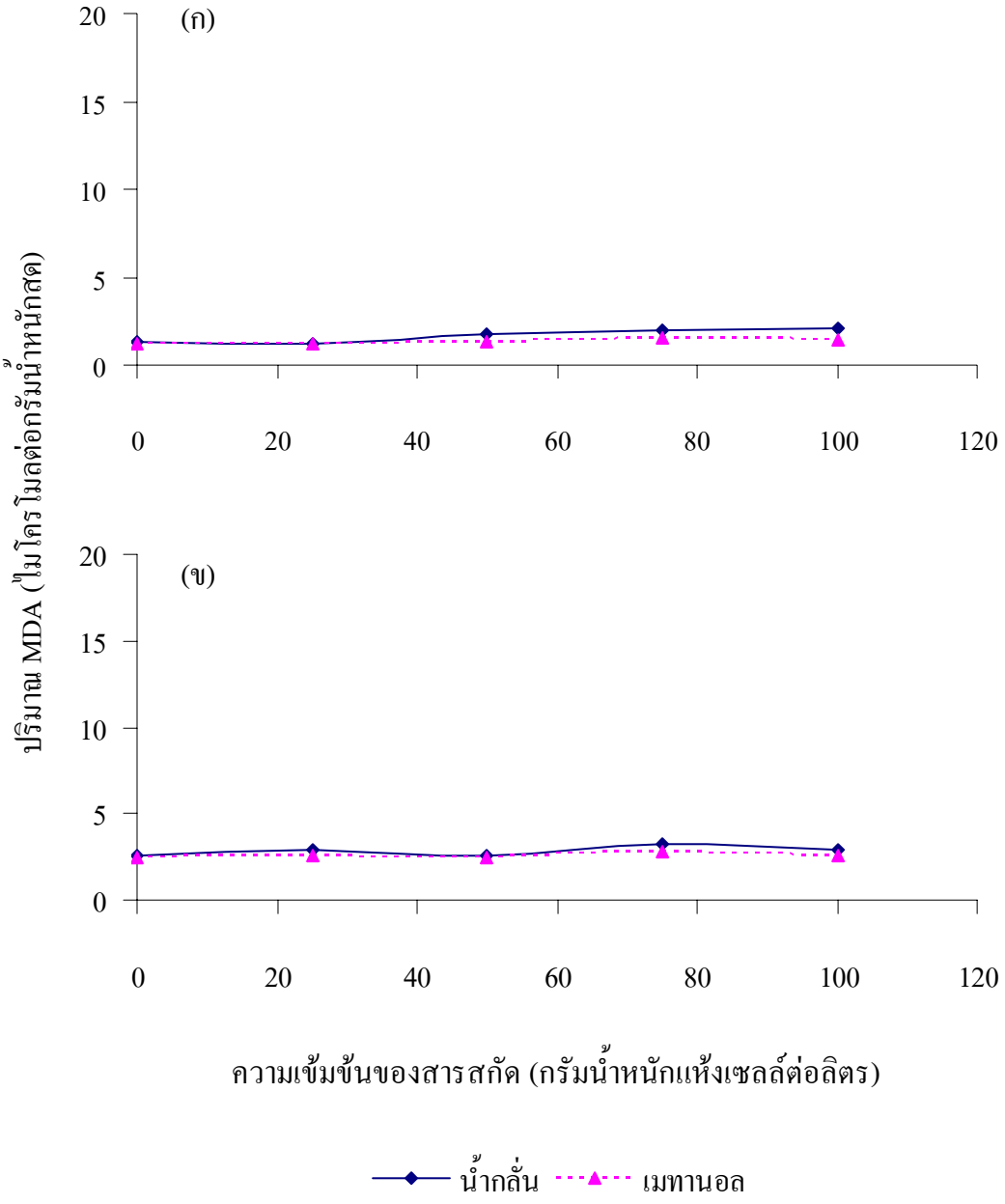
2.3 ผักกาดเขียวปลี จากผลการทดลอง พบว่า สารสกัดจาก *H. fontinalis* เมื่อใช้น้ำกลั่นและเมทานอลเป็นตัวทำละลายจะให้ผลแตกต่างกันทางสถิติทั้งส่วนลำต้นและรากของผักกาดเขียวปลี และเมื่อใช้สารสกัดที่สกัดด้วยน้ำกลั่นความเข้มข้น 75 และ 100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร จะทำให้ปริมาณ MDA ของลำต้นเพิ่มขึ้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสามารถวัดได้ 2.031 และ 2.129 ไมโครโมลต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ (ตารางที่ 5) และสารสกัดความเข้มข้น 75 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ทำให้ปริมาณ MDA ของรากมีความแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยวัดปริมาณ MDA ได้ 3.193 ไมโครโมลต่อกรัมน้ำหนักสด สำหรับสารสกัดที่สกัดด้วยเมทานอลทุกความเข้มข้น ไม่มีผลแตกต่างทางสถิติต่อการเพิ่มปริมาณ MDA ทั้งในส่วนลำต้นและรากของผักกาดเขียวปลี และปริมาณ MDA ที่สะสมในรากมีค่ามากกว่าที่สะสมในลำต้น ทั้งสารสกัดด้วยน้ำและเมทานอล (ตารางที่ 5 และภาพที่ 17)

ตารางที่ 5 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณ MDA ในลำต้นและรากของผักกาดเขียวปลี

ความเข้มข้นของสารสกัด (กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร)	ปริมาณ MDA (ไมโครโมลต่อกรัม (µmol/g FW))			
	ลำต้น		ราก	
	น้ำกลั่น	เมทานอล	น้ำกลั่น	เมทานอล
0	1.290 bc[1/]	1.161	2.516 b	2.420
25	1.226 c	1.226	2.903 ab	2.516
50	1.742 abc	1.290	2.613 b	2.420
75	2.031 ab	1.548	3.193 a	2.806
100	2.129 a	1.419	2.903 ab	2.613
เฉลี่ย	1.684 A[2/]	1.329 B	2.826 A	2.555 B

1/ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันตามสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2/ ค่าเฉลี่ยในแนวนอนที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันตามสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

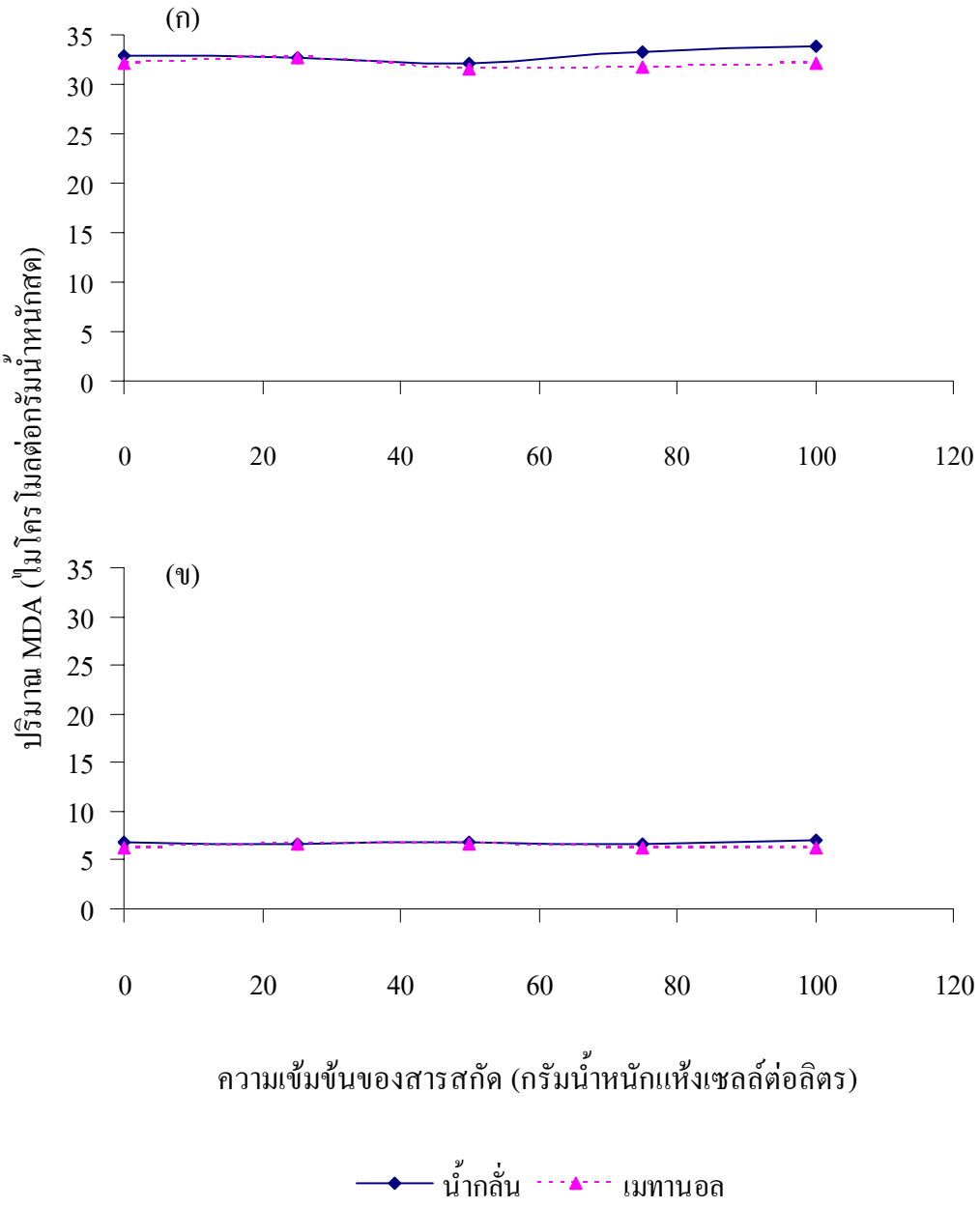


ภาพที่ 17 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณ MDA ใน (ก) ลำต้นและ (ข) รากของผักกาดเขียวปลี

2.4 ถั่วเหลือง จากผลการทดลอง พบว่า สารสกัดจาก *H. fontinalis* ทั้งสกัดด้วยน้ำกลั่นและเมทานอล ทุกความเข้มข้น ไม่มีผลต่อปริมาณ MDA ทั้งส่วนลำต้นและรากของถั่วเหลือง และตัวทำละลายทั้งสองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 6 และภาพที่ 18)

ตารางที่ 6 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณ MDA ในลำต้นและรากของถั่วเหลือง

ความเข้มข้นของสารสกัด (กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร)	ปริมาณ MDA (ไมโครโมลต่อกรัม(µmol/g FW))			
	ลำต้น		ราก	
	น้ำกลั่น	เมทานอล	น้ำกลั่น	เมทานอล
0	32.903	32.129	6.774	6.258
25	32.774	32.645	6.645	6.581
50	32.194	31.548	6.774	6.645
75	33.290	31.806	6.645	6.323
100	33.871	32.065	7.097	6.194
เฉลี่ย	33.007	32.039	6.787	6.400



ภาพที่ 18 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณ MDA ใน (ก) ลำต้นและ (ข) รากของถั่วเหลือง

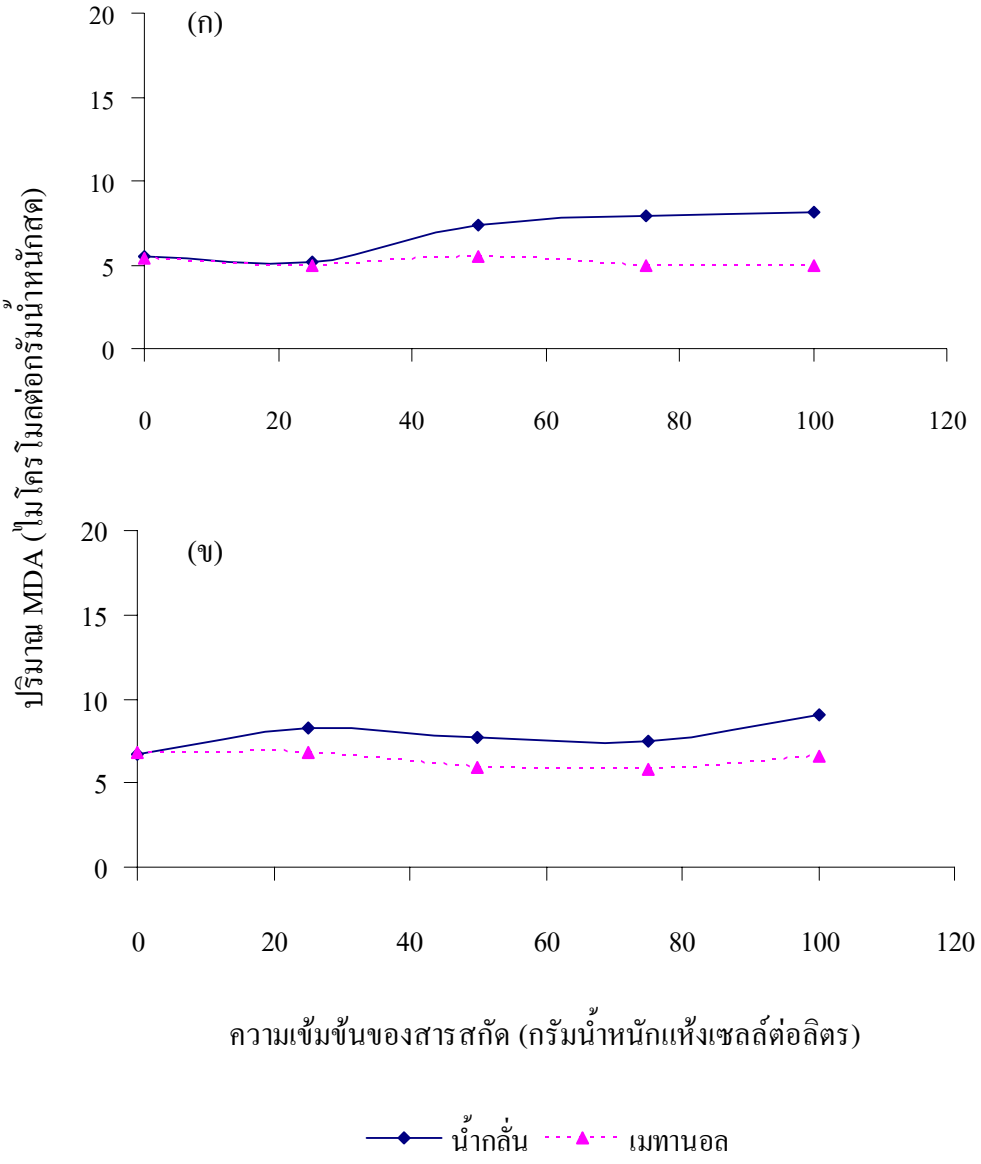
2.5 หญ้ารังนก จากผลการทดลอง พบว่า สารสกัดจาก *H. fontinalis* เมื่อใช้น้ำกลั่นและเมทานอลเป็นตัวทำละลายจะให้ผลแตกต่างกันทางสถิติทั้งส่วนลำต้นและรากของหญ้ารังนก โดยเมื่อใช้สารสกัดด้วยน้ำกลั่น ความเข้มข้น 75 และ 100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ส่งผลให้ปริมาณ MDA ของลำต้นหญ้ารังนกเพิ่มขึ้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุม โดยวัดปริมาณ MDA ได้ 7.936 และ 8.129 ไมโครโมลต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ (ตารางที่ 7) และสารสกัดความเข้มข้น 100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ส่งผลให้ปริมาณ MDA ของรากหญ้ารังนกเพิ่มขึ้นแตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม โดยวัดปริมาณ MDA ได้ 9.094 ไมโครโมลต่อกรัมน้ำหนักสด สำหรับสารสกัดด้วยเมทานอล พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุมทั้งลำต้นและรากของหญ้ารังนก และปริมาณ MDA ที่สะสมในรากมีค่าใกล้เคียงกับที่สะสมในลำต้น โดยที่มีค่ามากกว่าเล็กน้อย ทั้งสารสกัดด้วยน้ำและเมทานอล (ตารางที่ 7 และ ภาพที่ 19)

ตารางที่ 7 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณ MDA ในลำต้นและรากของหญ้ารังนก

ความเข้มข้นของสารสกัด (กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร)	ปริมาณ MDA (ไมโครโมลต่อกรัม (μmol/g FW))			
	ลำต้น		ราก	
	น้ำกลั่น	เมทานอล	น้ำกลั่น	เมทานอล
0	5.484 b[1/]	5.355	6.710 b	6.774
25	5.162 b	4.968	8.323 ab	6.774
50	7.355 ab	5.484	7.741 ab	5.871
75	7.936 a	4.903	7.451 ab	5.806
100	8.129 a	4.903	9.094 a	6.645
เฉลี่ย	6.813 A[2/]	5.123 B	7.864 A	6.374 B

1/ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันตามสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2/ ค่าเฉลี่ยในแนวนอนที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันตามสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

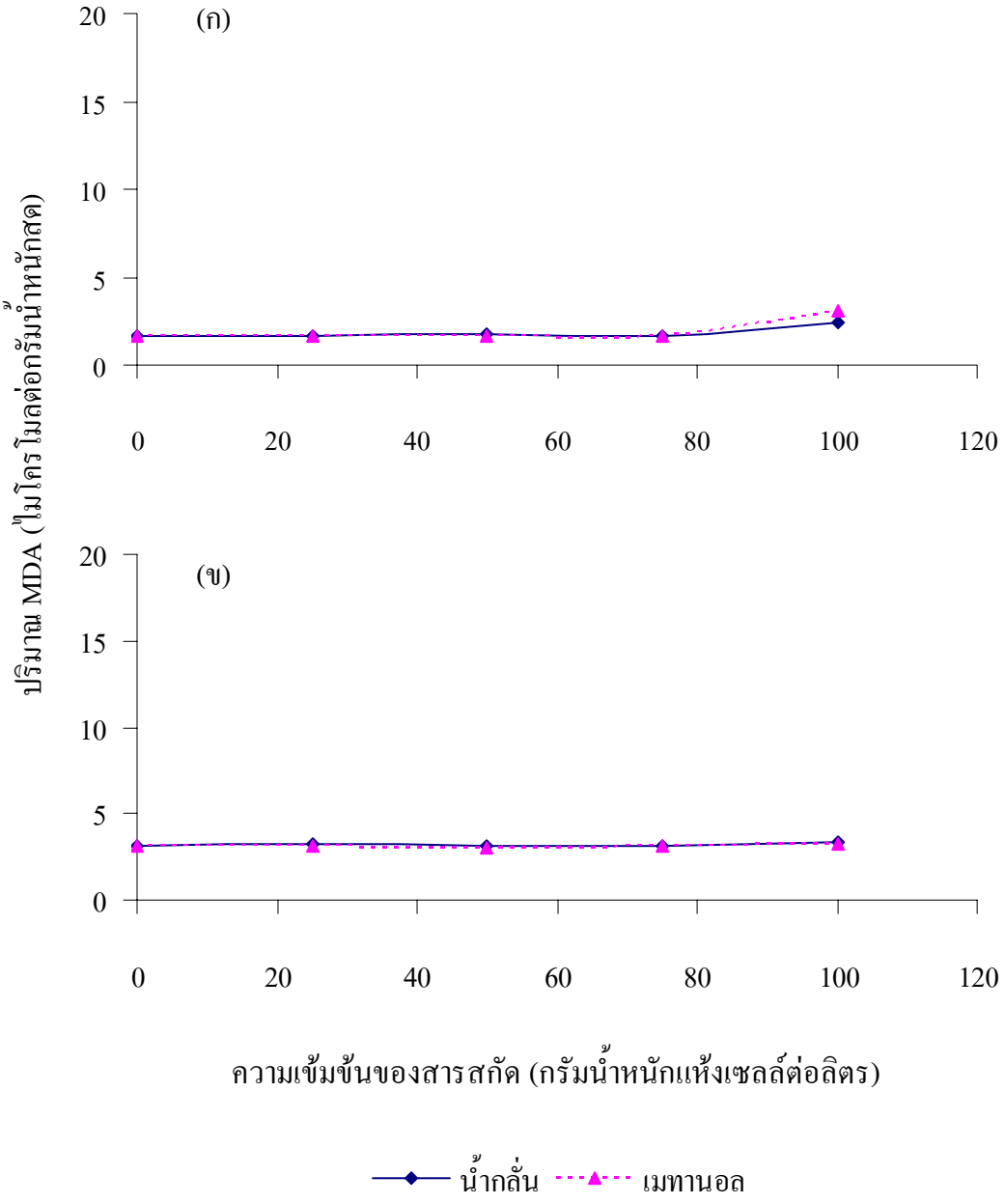


ภาพที่ 19 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณ MDA ใน (ก) ลำต้นและ (ข) รากของหญ้ารังนก

2.6 ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 จากผลการทดลอง พบว่า สารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่สกัดด้วยน้ำกลั่นและเมทานอล ไม่มีผลต่อปริมาณ MDA ทั้งส่วนลำต้นและรากของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (ตารางที่ 8 และภาพที่ 20)

ตารางที่ 8 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณ MDA ในลำต้นและรากของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

ความเข้มข้นของสารสกัด (กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร)	ปริมาณ MDA (ไมโครโมลต่อกรัม(µmol/g FW))			
	ลำต้น		ราก	
	น้ำกลั่น	เมทานอล	น้ำกลั่น	เมทานอล
0	1.613	1.677	3.098	3.097
25	1.677	1.613	3.290	3.161
50	1.742	1.677	3.097	3.032
75	1.677	1.613	3.161	3.163
100	2.387	3.032	3.355	3.290
เฉลี่ย	1.819	1.922	3.200	3.239



ภาพที่ 20 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณ MDA ใน (ก) ลำต้นและ (ข) รากของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

<u>การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ต่อปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสง (photosynthetic pigment)</u>

ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลาย และความเข้มข้นแตกต่างกันต่อปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสงโดยวัดจากปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี คลอโรฟิลล์ทั้งหมด และแคโรทีนอยด์ ในวัชพืชและพืชปลูกชนิดต่างๆ ดังนี้

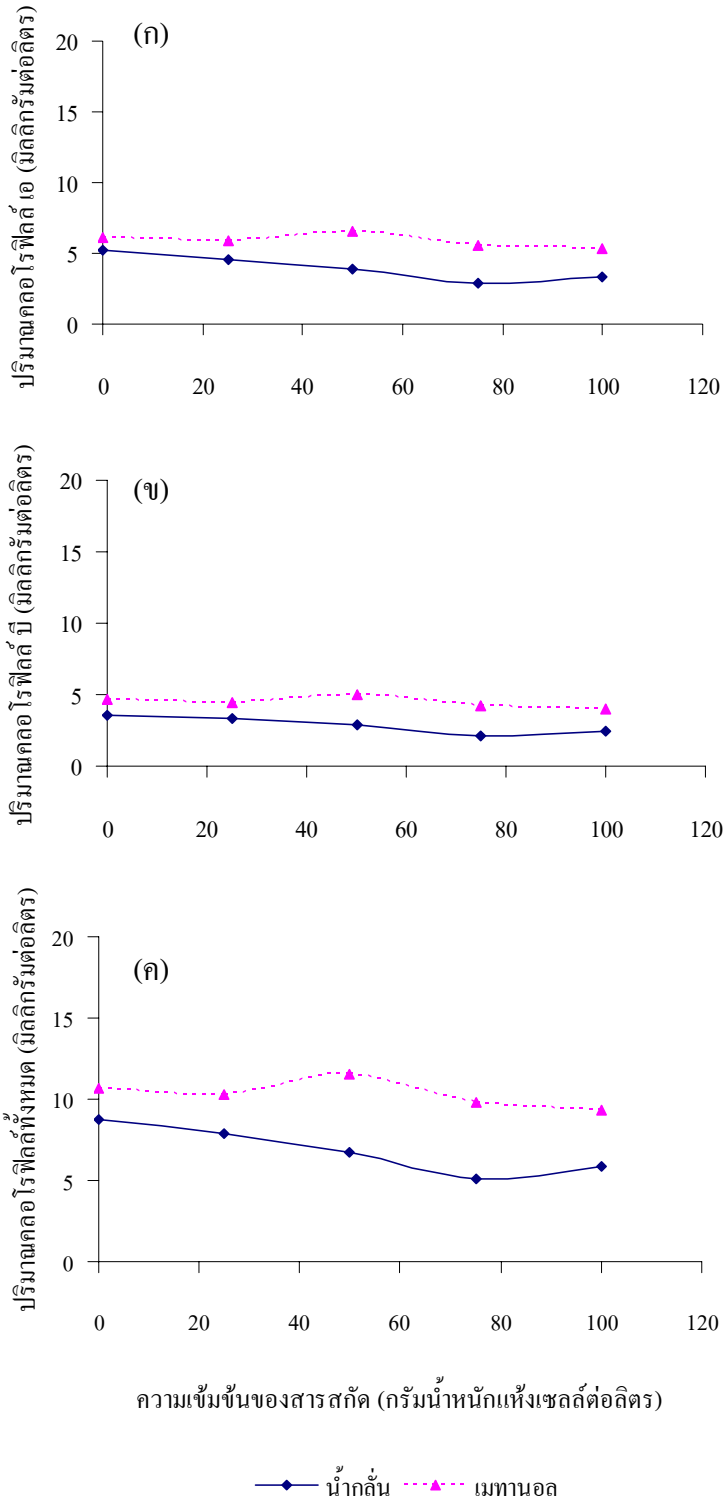
3.1 ไมยราบยักษ์ จากผลการทดลอง พบว่า สารสกัดจาก *H. fontinalis* ด้วยน้ำกลั่น มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากสารสกัดด้วยเมทานอลทั้งปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี คลอโรฟิลล์ทั้งหมด และแคโรทีนอยด์ โดยที่สารสกัดด้วยน้ำกลั่นทำให้ในไมยราบยักษ์มีปริมาณรงควัตถุทั้งสี่ชนิดน้อยกว่าสารสกัดด้วยเมทานอล นอกจากนี้สารสกัดด้วยน้ำกลั่นความเข้มข้น 75 และ 100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ส่งผลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ลดลงแตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม โดยวัดได้ 2.941 และ 3.366 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 9) และเมื่อใช้สารสกัดจากเมทานอล พบว่า สารสกัดทุกความเข้มข้นส่งผลไม่แตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม และสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำกลั่นความเข้มข้น 75 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ส่งผลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ บี ลดลงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดควบคุม ซึ่งวัดได้ 2.129 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่เมื่อใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย พบว่า สารสกัดทุกความเข้มข้นส่งผลไม่แตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม และปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด พบว่า สารสกัดที่ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลายความเข้มข้น 75 และ 100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดลดลงแตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม โดยสามารถวัดได้ 5.069 และ 5.855 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่เมื่อใช้สารสกัดด้วยเมทานอล พบว่า สารสกัดทุกความเข้มข้นส่งผลไม่แตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม และเมื่อพิจารณาภาพรวม จะพบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด จะทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์มีแนวโน้มลดลง ทั้งที่ใช้น้ำกลั่นและเมทานอลเป็นตัวทำละลาย สำหรับปริมาณแคโรทีนอยด์ พบว่า เมื่อใช้สารสกัดด้วยน้ำกลั่นความเข้มข้น 25, 50, 75 และ 100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ส่งผลให้ปริมาณแคโรทีนอยด์ ลดลงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุม โดยวัดปริมาณแคโรทีนอยด์ได้ 0.804, 0.720, 0.585 และ 0.676 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และสารสกัดด้วยเมทานอล พบว่า สารสกัดความเข้มข้น 100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ส่งผลให้ปริมาณแคโรทีนอยด์ลดลงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุม โดยวัดได้ 0.373 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 9 และภาพที่ 21 และ 22)

ตารางที่ 9 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสงของไมยราบยักษ์

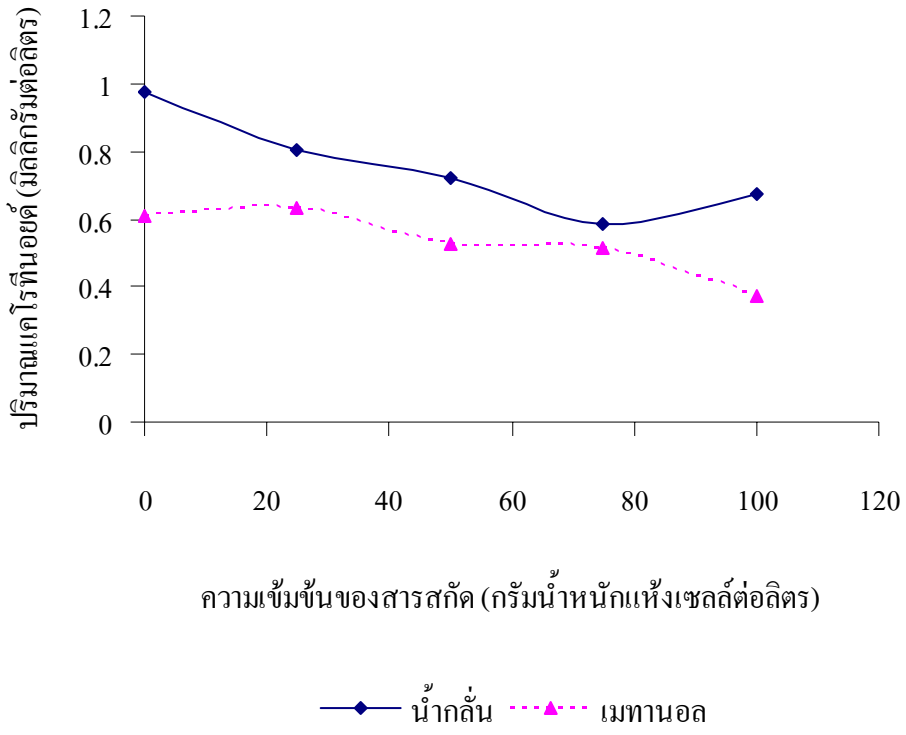
ความเข้มข้นของสารสกัด (กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร)	ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ (มิลลิกรัมต่อลิตร)		ปริมาณคลอโรฟิลล์ บี (มิลลิกรัมต่อลิตร)		ปริมาณคลอโรฟิลล์ ทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)		ปริมาณแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
	น้ำกลั่น	เมทานอล	น้ำกลั่น	เมทานอล	น้ำกลั่น	เมทานอล	น้ำกลั่น	เมทานอล
0	5.243 a[1/]	6.065	3.530 a	4.637	8.771 a	10.699	0.973 a	0.609 ab
25	4.545 ab	5.898	3.371 a	4.436	7.914 ab	10.331	0.804 b	0.634 a
50	3.876 abc	6.561	2.858 ab	4.965	6.733 abc	11.523	0.720 bc	0.527 b
75	2.941 c	5.611	2.129 b	4.227	5.069 c	9.836	0.585 d	0.513 b
100	3.366 bc	5.302	2.492 ab	3.998	5.855 bc	9.297	0.676 cd	0.373 c
เฉลี่ย	3.994 A[2/]	5.887 B	2.876 A	4.453 B	6.868 A	10.337 B	0.752 A	0.531 B

1/ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันตามสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2/ ค่าเฉลี่ยในแนวนอนที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันตามสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 21 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณ (ก) คลอโรฟิลล์ เอ (ข) คลอโรฟิลล์ บี และ(ค) คลอโรฟิลล์ทั้งหมดของไมยราบยักษ์



ภาพที่ 22 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณแคโรทีนอยด์ของไมยราบยักษ์

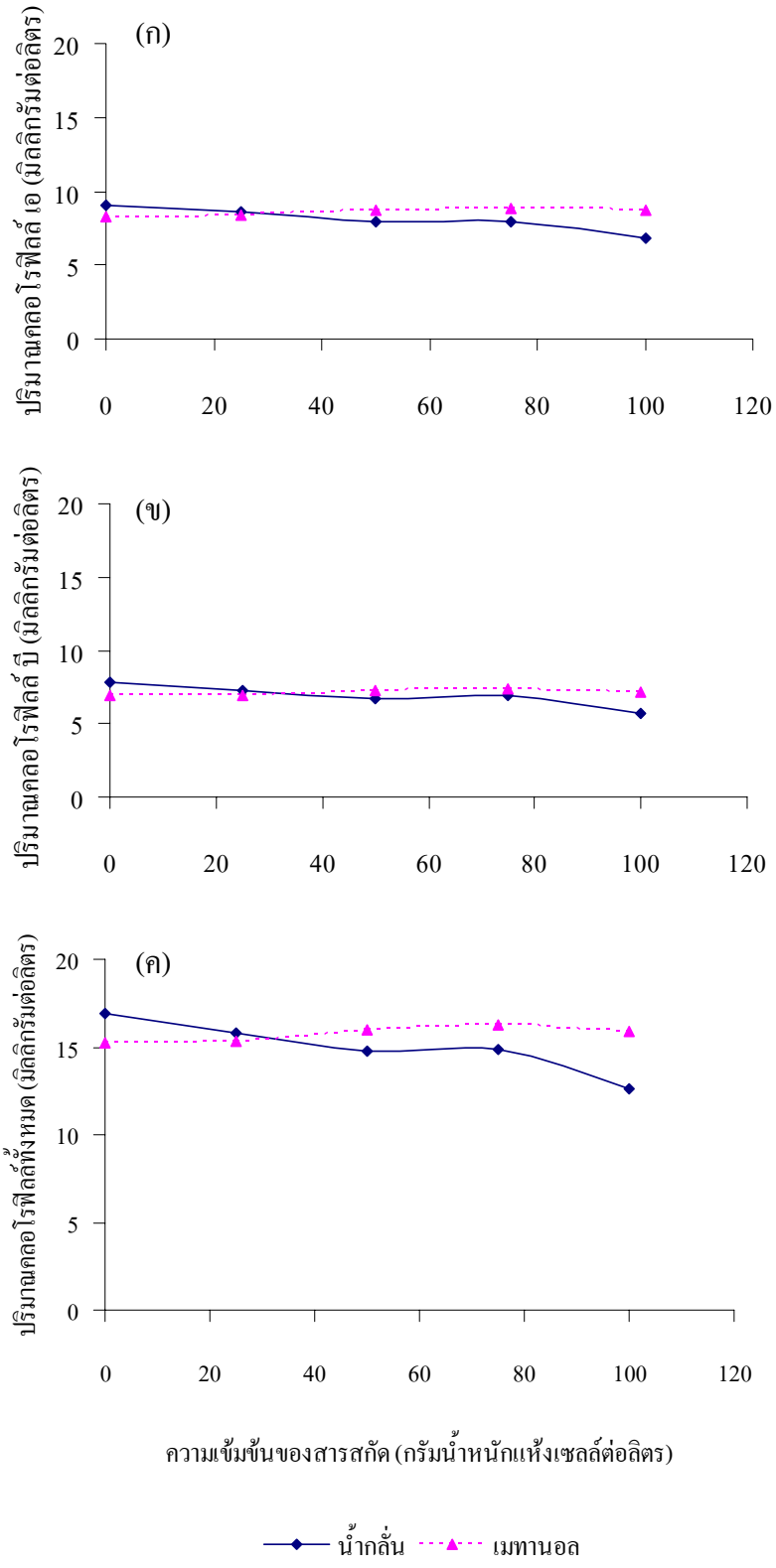
3.2 หญ้ายาง จากผลการทดลอง พบว่า สารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่ใช้น้ำกลั่นและเมทานอลเป็นตัวทำละลายมีผลทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ทั้งหมด และแคโรทีนอยด์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ปริมาณคลอโรฟิลล์ บี ไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 10) โดยที่เมื่อใช้สารสกัดด้วยน้ำกลั่น พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด จะส่งผลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และคลอโรฟิลล์ทั้งหมดลดลง แต่ปริมาณแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น ดังนี้ สารสกัดความเข้มข้น 50, 75 และ 100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ส่งผลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือมีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ 7.988, 7.945 และ 6.834 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ คลอโรฟิลล์ บี 6.747, 6.938 และ 5.741 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดวัดได้ 14.731, 14.879 และ 12.572 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และสารสกัดความเข้มข้น 50, 75 และ 100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ส่งผลให้ปริมาณแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น โดยวัดได้ 0.467, 0.474 และ 0.588 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับสารสกัดด้วยเมทานอล พบว่า สารสกัดทุกความเข้มข้นทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี คลอโรฟิลล์ทั้งหมด และแคโรทีนอยด์ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุม (ตารางที่ 10 และ ภาพที่ 23 และ 24)

ตารางที่ 10 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสงของหญ้ายาง

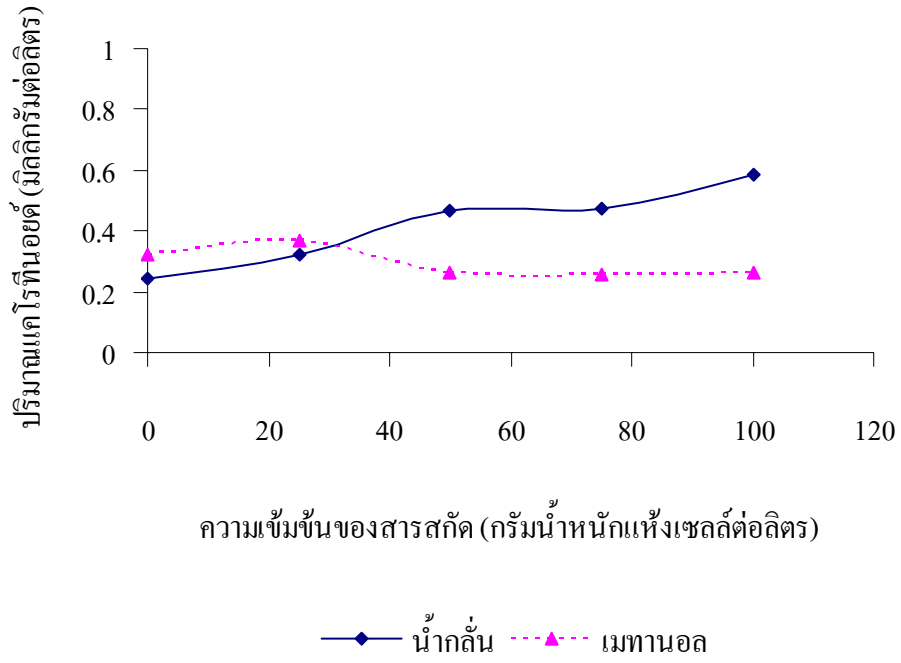
ความเข้มข้นของสารสกัด (กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร)	ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ (มิลลิกรัมต่อลิตร)		ปริมาณคลอโรฟิลล์ บี (มิลลิกรัมต่อลิตร)		ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)		ปริมาณแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
	น้ำกลั่น	เมทานอล	น้ำกลั่น	เมทานอล	น้ำกลั่น	เมทานอล	น้ำกลั่น	เมทานอล
0	9.089 a[1/]	8.284	7.853 a	6.952	16.937 a	15.232	0.243 c	0.320
25	8.575 ab	8.403	7.269 ab	6.974	15.839 ab	15.372	0.325 bc	0.370
50	7.988 b	8.676	6.747 b	7.268	14.731 b	15.939	0.467 ab	0.260
75	7.945 b	8.819	6.938 b	7.427	14.879 b	16.241	0.474 ab	0.259
100	6.834 c	8.708	5.741 c	7.205	12.572 c	15.908	0.588 a	0.264
เฉลี่ย	8.086 A[2/]	8.578 B	6.910	7.165	14.992 A	15.739 B	0.419 A	0.295 B

1/ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันตามสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2/ ค่าเฉลี่ยในแนวนอนที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันตามสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



<u>ภาพที่ 23</u> ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณ (ก) คลอโรฟิลล์ เอ (ข) คลอโรฟิลล์ บี และ(ค) คลอโรฟิลล์ทั้งหมดของหญ้ายาง



ภาพที่ 24 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณแคโรทีนอยด์ของหญ้ายาง

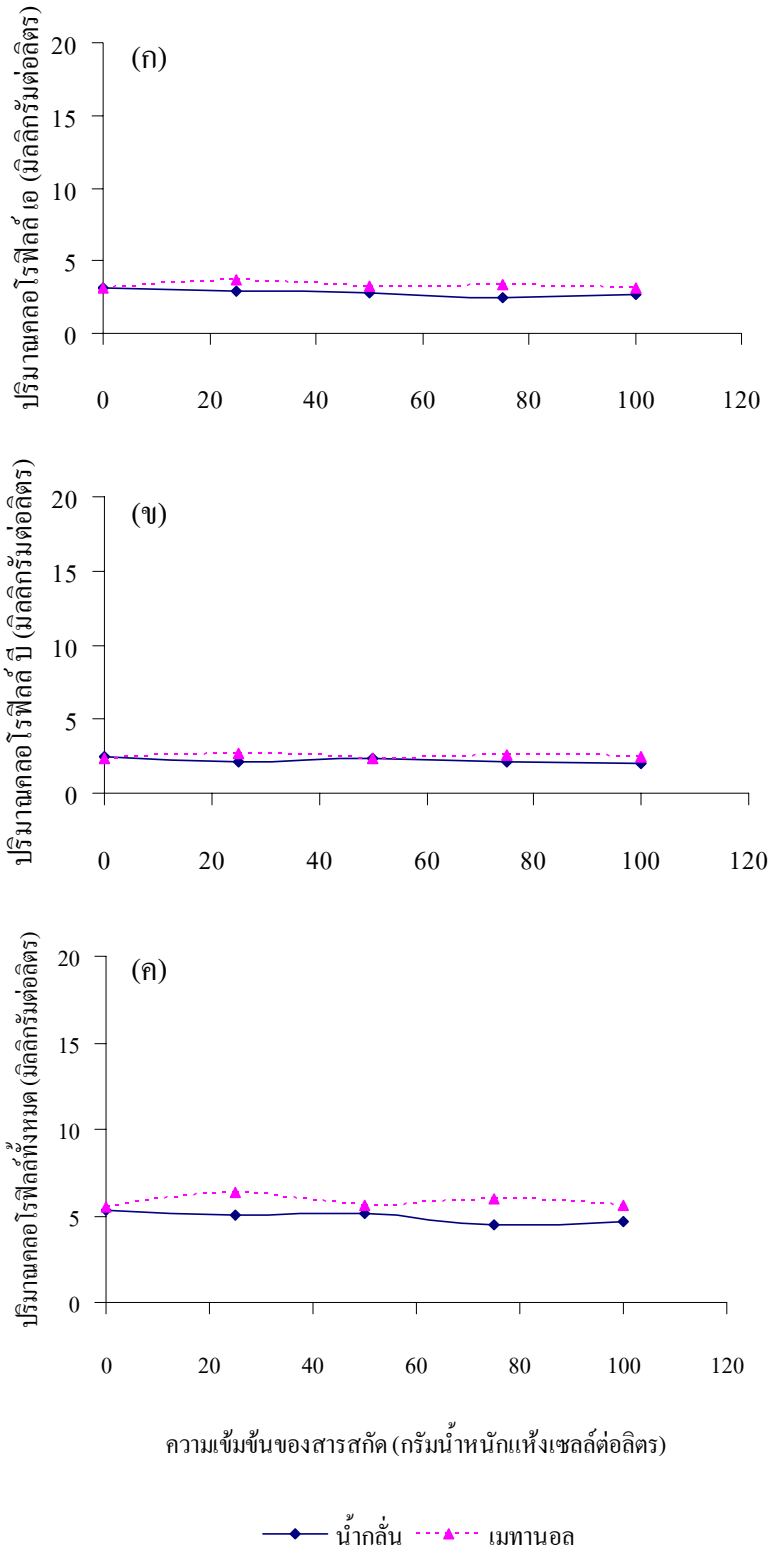
3.3 ผักกาดเขียวปลี จากผลการทดลอง พบว่า สารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่ใช้น้ำกลั่นและเมทานอลเป็นตัวทำละลาย มีผลทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และคลอโรฟิลล์ทั้งหมดแตกต่างกันทางสถิติ แต่ปริมาณแคโรทีนอยด์ไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 11) และสารสกัดด้วยน้ำกลั่น พบว่าสารสกัดความเข้มข้น 75 และ 100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ส่งผลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และคลอโรฟิลล์ บี ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ วัดได้ 2.503 และ 2.643 มิลลิกรัมต่อลิตร และคลอโรฟิลล์ บี วัดได้ 2.077 และ 2.013 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และสารสกัดความเข้มข้น 75 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ส่งผลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยวัดได้ 4.501 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่สารสกัดด้วยน้ำกลั่นไม่มีผลต่อปริมาณแคโรทีนอยด์ สำหรับสารสกัดด้วยเมทานอล พบว่า สารสกัดความเข้มข้น 25, 50 และ 100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ส่งผลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ วัดได้ 3.149, 3.245 และ 3.167 มิลลิกรัมต่อลิตร และปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดวัดได้ 5.478, 5.612 และ 5.584 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และสารสกัดความเข้มข้น 75 และ 100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ส่งผลให้ปริมาณแคโรทีนอยด์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยวัดได้ 0.441 และ 0.416 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่สารสกัดด้วยเมทานอลไม่มีผลทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ บีแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 11 และภาพที่ 25 และ 26)

ตารางที่ 11 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสงของผักกาดเขียวปลี

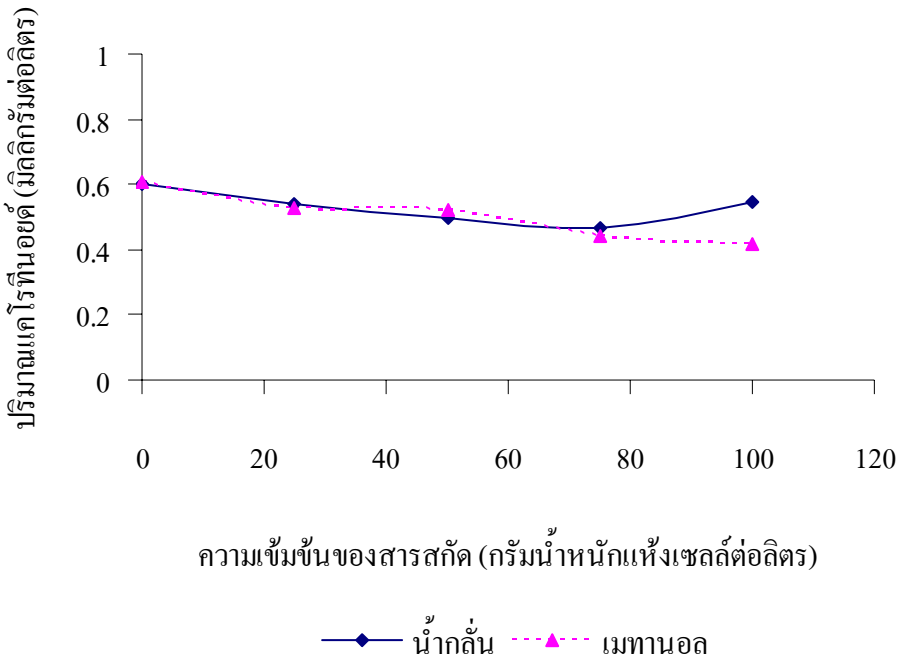
ความเข้มข้นของสารสกัด (กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร)	ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ (มิลลิกรัมต่อลิตร)		ปริมาณคลอโรฟิลล์ บี (มิลลิกรัมต่อลิตร)		ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)		ปริมาณแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
	น้ำกลั่น	เมทานอล	น้ำกลั่น	เมทานอล	น้ำกลั่น	เมทานอล	น้ำกลั่น	เมทานอล
0	3.086 a[1/]	3.701 a	2.409 a	2.660	5.284 a	6.359 a	0.601	0.609 a
25	2.901 ab	3.149 b	2.159 abc	2.330	5.059 ab	5.478 b	0.538	0.527 ab
50	2.750 ab	3.245 b	2.346 ab	2.368	5.094 ab	5.612 b	0.495	0.519 ab
75	2.503 b	3.392 ab	2.077 bc	2.570	4.501 b	5.960 ab	0.467	0.441 b
100	2.643 b	3.167 b	2.013 c	2.419	4.655 ab	5.584 b	0.549	0.416 b
เฉลี่ย	2.777 A[2/]	3.331 B	2.201 A	2.469 B	4.918 A	5.798 B	0.530	0.502

1/ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันตามสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2/ ค่าเฉลี่ยในแนวนอนที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันตามสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 25 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณ (ก) คลอโรฟิลล์ เอ (ข) คลอโรฟิลล์ บี และ(ค) คลอโรฟิลล์ทั้งหมดของผักกาดเขียวปลี



ภาพที่ 26 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณแคโรทีนอยด์ของผักกาดเขียวปลี

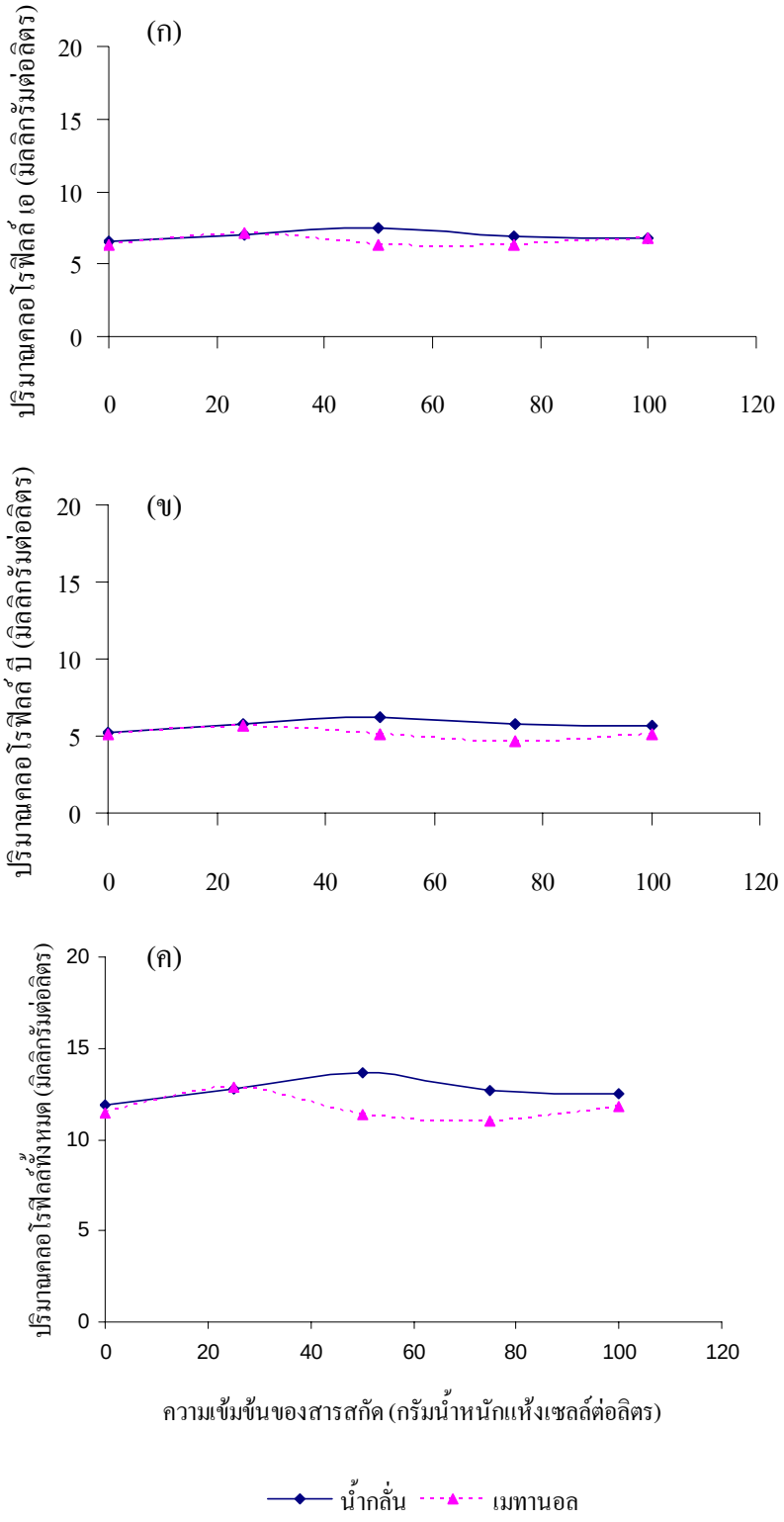
3.4 ถั่วเหลือง จากผลการทดลอง พบว่า สารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่สกัดด้วยน้ำกลั่นและเมทานอลมีผลทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ บี คลอโรฟิลล์ทั้งหมด และแคโรทีนอยด์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 12) โดยที่สารสกัดด้วยน้ำกลั่นความเข้มข้น 50 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ บี เพิ่มขึ้นซึ่งวัดได้ 6.264 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ไม่มีผลต่อปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ทั้งหมด และแคโรทีนอยด์ และสารสกัดด้วยเมทานอลความเข้มข้น 75 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ส่งผลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ บี ลดลง ซึ่งวัดได้ 4.705 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารสกัดความเข้มข้น 50 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ทำให้ปริมาณแคโรทีนอยด์ลดลง ซึ่งวัดได้ 0.583 มิลลิกรัมติอลิตร แต่ไม่มีผลต่อปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และคลอโรฟิลล์ทั้งหมด (ตารางที่ 12 และภาพที่ 27 และ 28)

ตารางที่ 12 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสงของถั่วเหลือง

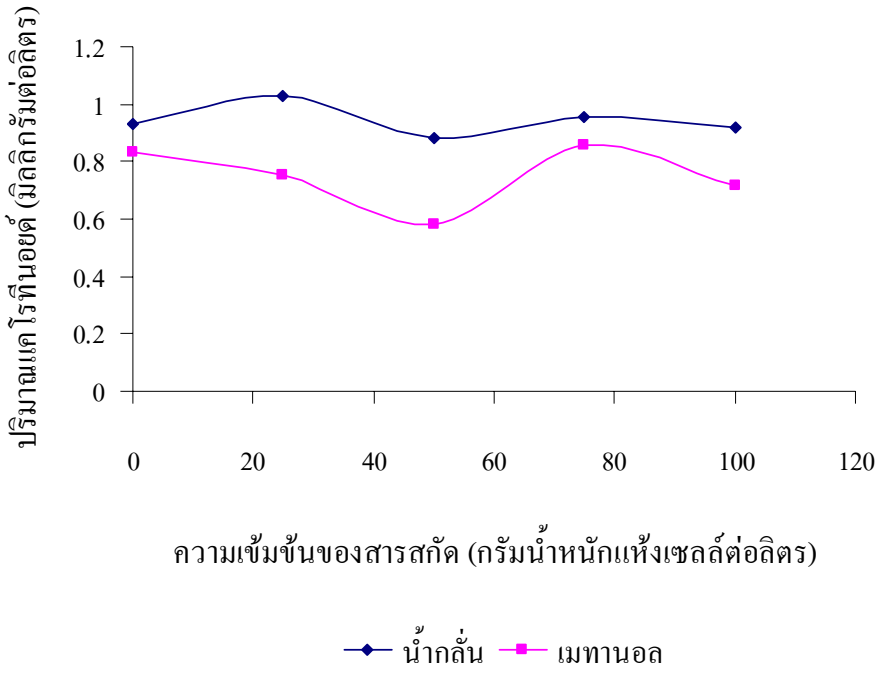
ความเข้มข้นของสารสกัด (กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร)	ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ (มิลลิกรัมต่อลิตร)		ปริมาณคลอโรฟิลล์ บี (มิลลิกรัมต่อลิตร)		ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)		ปริมาณแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
	น้ำกลั่น	เมทานอล	น้ำกลั่น	เมทานอล	น้ำกลั่น	เมทานอล	น้ำกลั่น	เมทานอล
0	6.602	6.349	5.272 b[1/]	5.008 ab	11.870	11.411	0.930	0.832 a
25	7.006	7.129	5.794 ab	5.720 a	12.797	12.845	1.029	0.754 a
50	7.437	6.264	6.264 a	5.076 ab	13.697	11.336	0.882	0.583 b
75	6.941	6.276	5.731 ab	4.705 b	12.668	10.978	0.957	0.855 a
100	6.837	6.767	5.653 ab	5.077 ab	12.486	11.839	0.919	0.716 ab
เฉลี่ย	6.964	6.557	5.743 A[2/]	5.117 B	12.704 A	11.682 B	0.943 A	0.748 B

1/ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันตามสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2/ ค่าเฉลี่ยในแนวนอนที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันตามสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 27 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณ (ก) คลอโรฟิลล์ เอ (ข) คลอโรฟิลล์ บี และ(ค) คลอโรฟิลล์ทั้งหมดของถั่วเหลือง



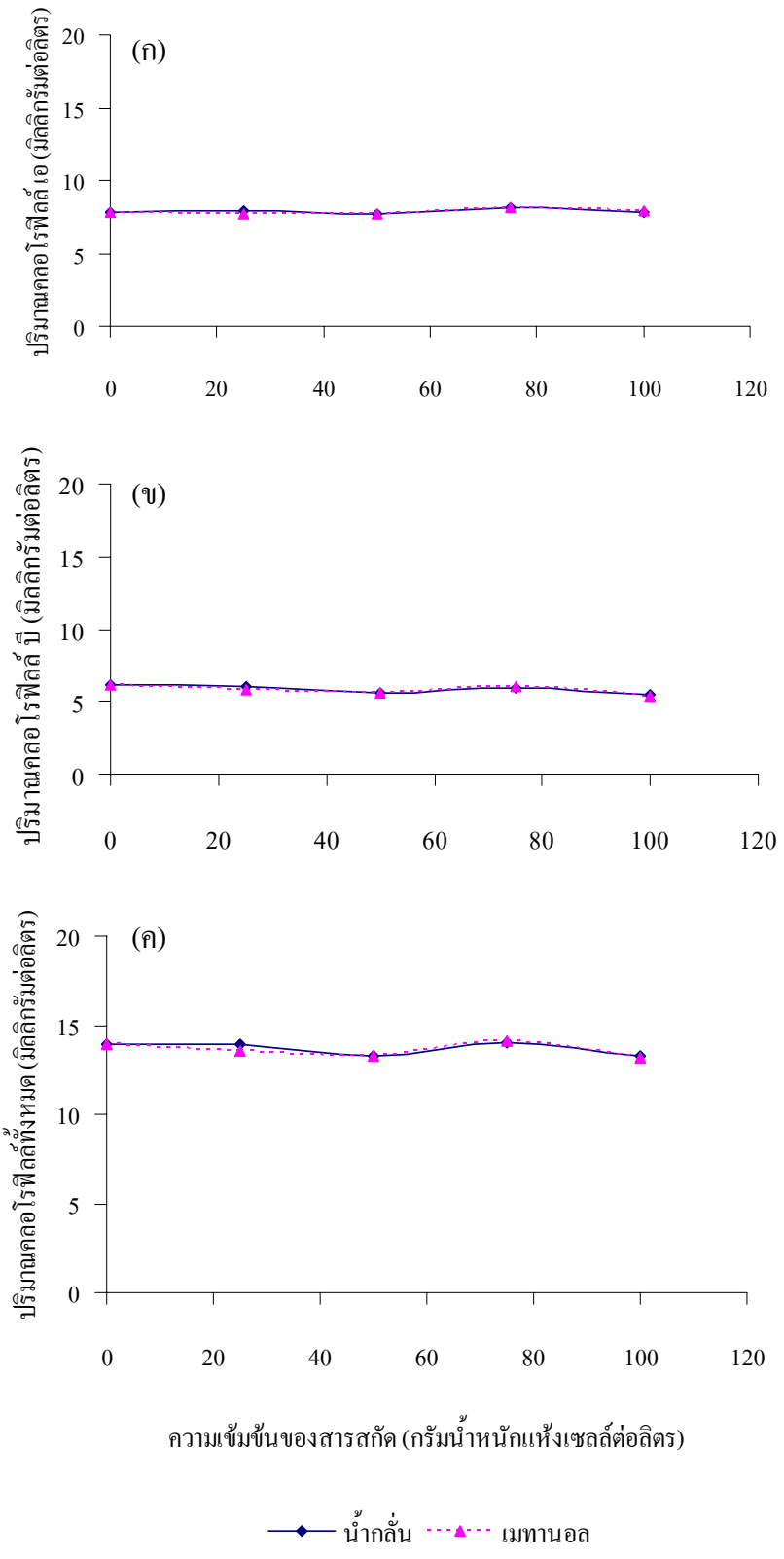
ภาพที่ 28 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณแคโรทีนอยด์ของถั่วเหลือง

3.5 หญ้ารังนก จากผลการทดลอง พบว่า สารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่สกัดด้วยน้ำกลั่นและเมทานอลมีผลทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี คลอโรฟิลล์ทั้งหมด และแคโรทีนอยด์ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 13) และสารสกัดด้วยน้ำกลั่นไม่มีผลต่อปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และคลอโรฟิลล์ทั้งหมด แต่มีผลต่อปริมาณแคโรทีนอยด์ โดยที่สารสกัดความเข้มข้น 50, 75 และ 100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ทำให้ปริมาณแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุม โดยวัดได้ 0.768, 0.813 และ 0.925 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดด้วยเมทานอลไม่มีผลต่อปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และคลอโรฟิลล์ทั้งหมด แต่มีผลต่อปริมาณคลอโรฟิลล์ บี และแคโรทีนอยด์ โดยสารสกัดความเข้มข้น 100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ บี ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ วัดได้ 5.324 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารสกัดความเข้มข้น 50, 75 และ 100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ทำให้ปริมาณแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุม โดยวัดได้ 0.767, 0.715 และ 0.932 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 13 และภาพที่ 29 และ 30)

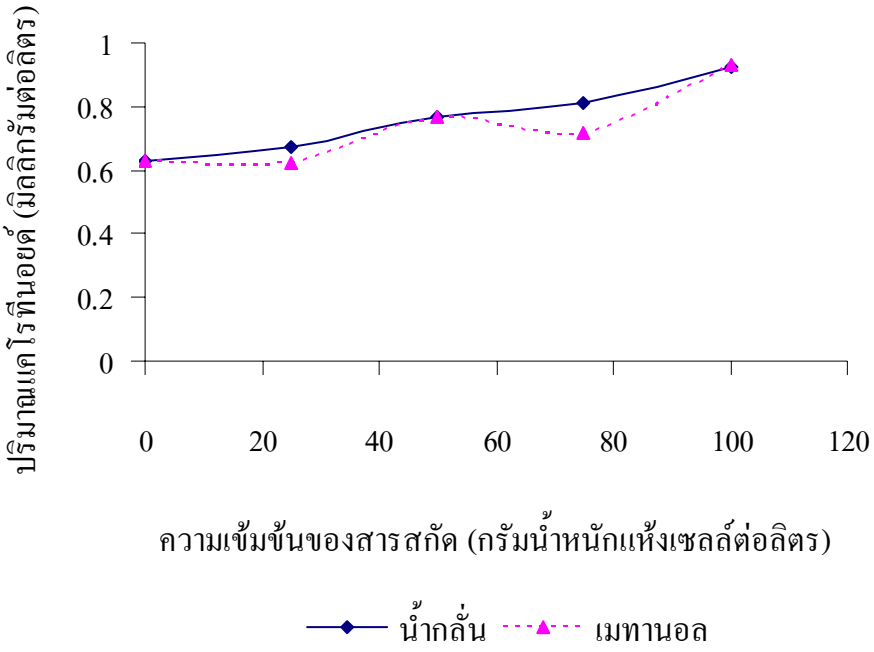
ตารางที่ 13 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสงของหญ้ารังนก

ความเข้มข้นของสารสกัด (กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร)	ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ (มิลลิกรัมต่อลิตร)		ปริมาณคลอโรฟิลล์ บี (มิลลิกรัมต่อลิตร)		ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)		ปริมาณแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
	น้ำกลั่น	เมทานอล	น้ำกลั่น	เมทานอล	น้ำกลั่น	เมทานอล	น้ำกลั่น	เมทานอล
0	7.748	7.748	6.135	6.135 a[1/]	13.879	13.879	0.631 c	0.631 c
25	7.959	7.745	5.995	5.855 ab	13.950	13.595	0.670 c	0.620 c
50	7.642	7.642	5.641	5.641 ab	13.279	13.280	0.768 b	0.767 b
75	8.121	8.084	5.902	6.069 a	14.019	14.148	0.813 b	0.715 b
100	7.784	7.880	5.523	5.324 b	13.303	13.200	0.925 a	0.932 a
เฉลี่ย	7.850	7.820	5.839	5.805	13.686	13.620	0.761	0.733

1/ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันตามสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 29 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณ (ก) คลอโรฟิลล์ เอ (ข) คลอโรฟิลล์ บี และ(ค) คลอโรฟิลล์ทั้งหมดของหญ้ารังนก



ภาพที่ 30 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณแคโรทีนอยด์ของหญ้ารังนก

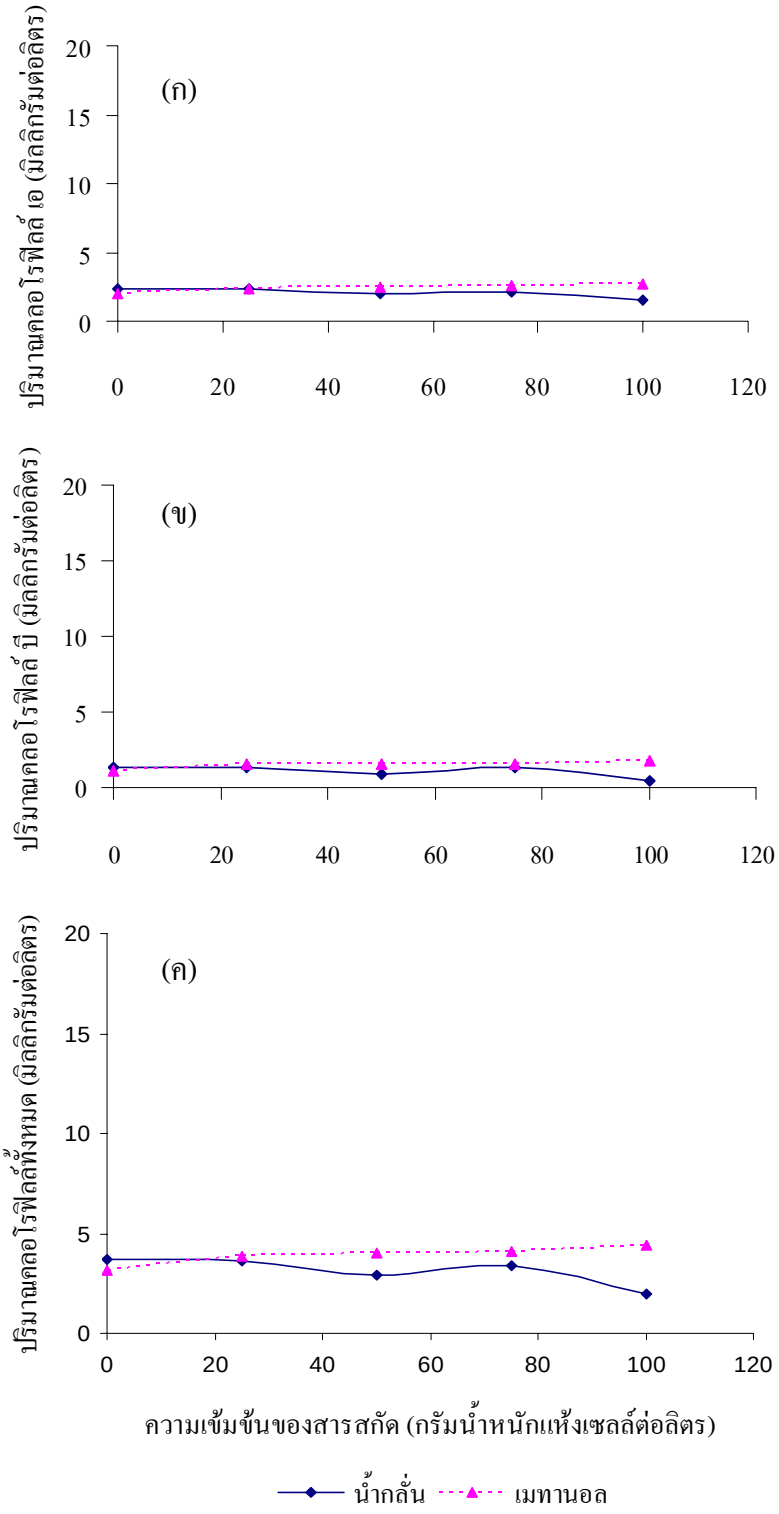
3.6 ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 จากผลการทดลอง พบว่า สารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่สกัดด้วยน้ำกลั่นและเมทานอลมีผลทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ บี คลอโรฟิลล์ทั้งหมด และแคโรทีนอยด์ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 14) และสารสกัดด้วยน้ำกลั่นความเข้มข้น 100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ส่งผลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ บี และคลอโรฟิลล์ทั้งหมดลดลงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุม โดยวัดได้ 0.494 และ 2.007 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่ไม่มีผลต่อปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และแคโรทีนอยด์ สำหรับสารสกัดด้วยเมทานอล พบว่า สารสกัดทุกความเข้มข้นไม่มีผลต่อปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี คลอโรฟิลล์ทั้งหมด และแคโรทีนอยด์ (ตารางที่ 14 และภาพที่ 31 และ 32)

ตารางที่ 14 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสงของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

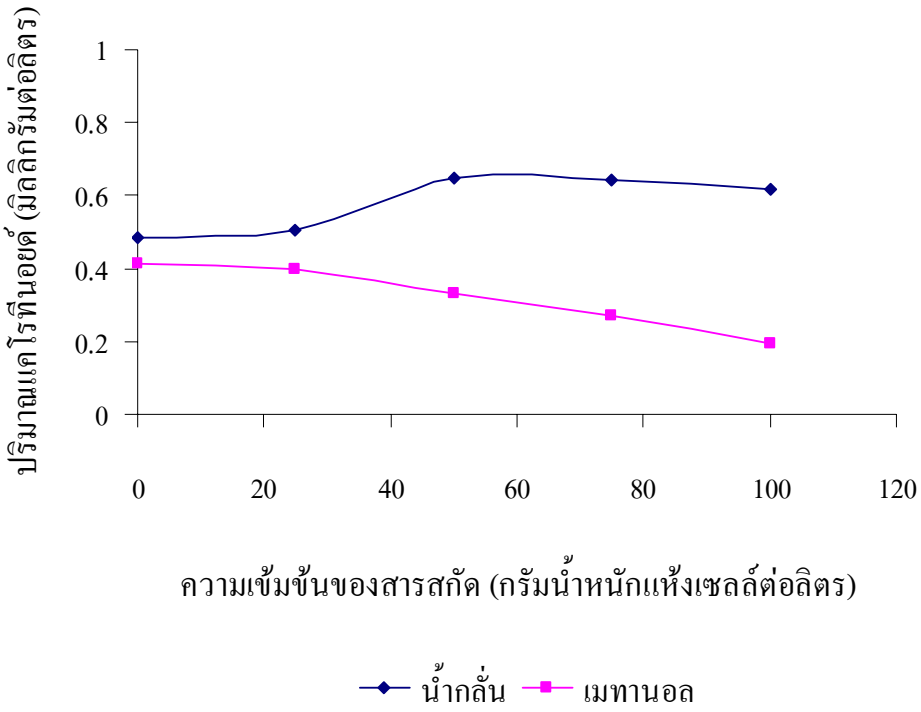
ความเข้มข้นของสารสกัด (กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร)	ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ (มิลลิกรัมต่อลิตร)		ปริมาณคลอโรฟิลล์ บี (มิลลิกรัมต่อลิตร)		ปริมาณคลอโรฟิลล์ ทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)		ปริมาณแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
	น้ำกลั่น	เมทานอล	น้ำกลั่น	เมทานอล	น้ำกลั่น	เมทานอล	น้ำกลั่น	เมทานอล
0	2.297	1.957	1.374 a[1/]	1.120	3.670 a	3.157	0.483	0.413
25	2.295	2.331	1.323 a	1.566	3.617 a	3.896	0.506	0.396
50	1.969	2.462	0.925 ab	1.590	2.893 ab	4.051	0.646	0.332
75	2.097	2.542	1.287 a	1.561	3.383 ab	4.102	0.641	0.269
100	1.513	2.717	0.494 b	1.730	2.007 b	4.446	0.617	0.192
เฉลี่ย	2.034	2.402	1.081 B[2/]	1.529 A	3.114 B	3.930 A	0.579 A	0.320 B

1/ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันตามสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2/ ค่าเฉลี่ยในแนวนอนที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันตามสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 31 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณ (ก) คลอโรฟิลล์ เอ (ข) คลอโรฟิลล์ บี และ(ค) คลอโรฟิลล์ทั้งหมดของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105



ภาพที่ 32 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อปริมาณแคโรทีนอยด์ของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

<u>การทดลองที่ 4 ศึกษาผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ต่อการสะสมแอมโมเนียจากกระบวนการ ammonia assimilation</u>

ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลาย และความเข้มข้นแตกต่างกันต่อกระบวนการ ammonia assimilation โดยวัดจากการสะสมปริมาณแอมโมเนีย (NH_3) ในวัชพืชและพืชปลูกชนิดต่างๆ ดังนี้

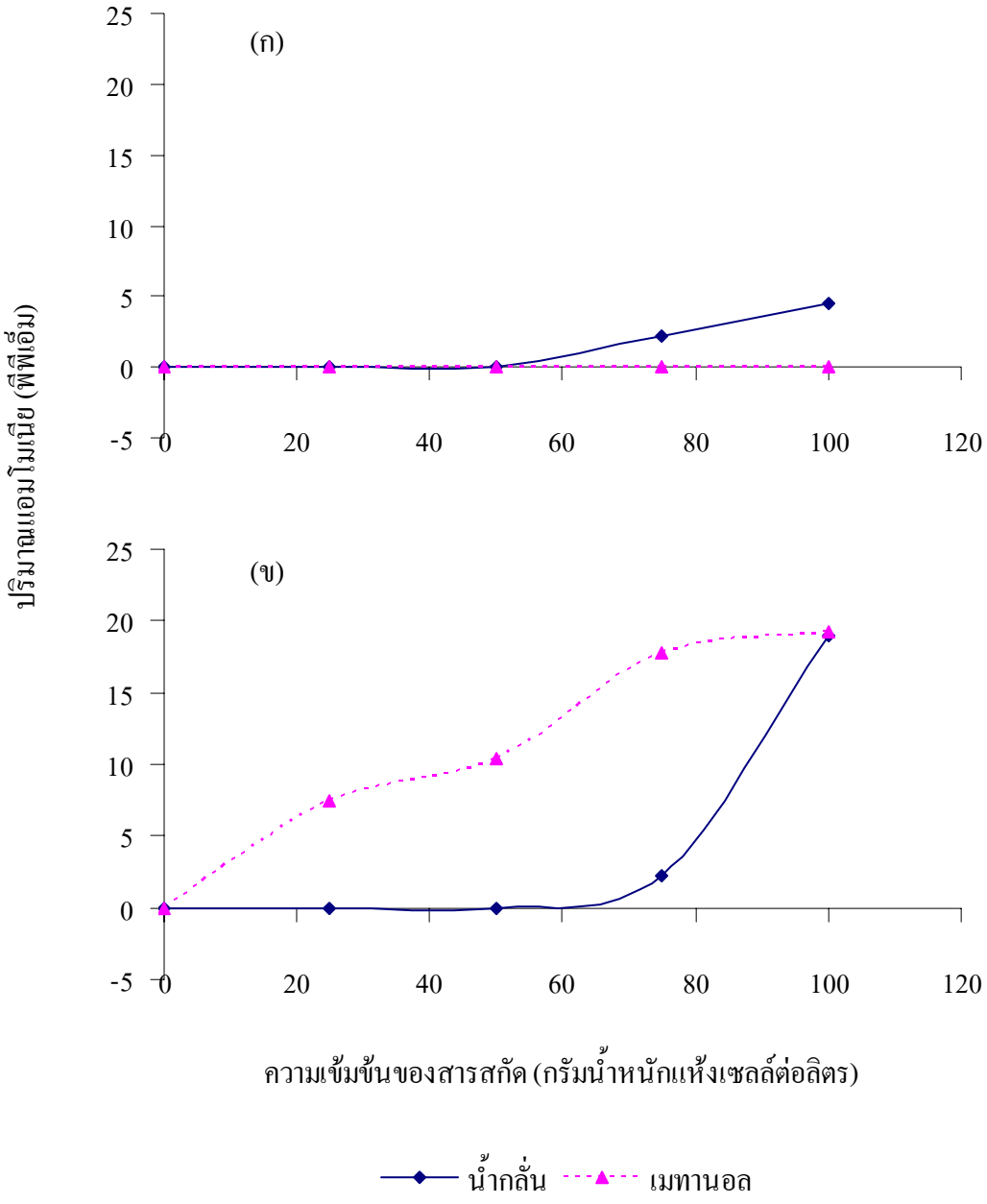
4.1 ไมยราบยักษ์ จากผลการทดลอง พบว่า สารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่สกัดด้วยน้ำกลั่นทำให้ปริมาณแอมโมเนียที่สะสมในลำต้นและรากของไมยราบยักษ์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากสารสกัดที่สกัดด้วยเมทานอล และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดจะทำให้มีการสะสมปริมาณแอมโมเนียเพิ่มขึ้น โดยที่สารสกัดด้วยน้ำกลั่น ความเข้มข้น 75 และ 100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ส่งผลให้ปริมาณแอมโมเนียเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยวัดปริมาณแอมโมเนียได้ 2.226 และ 4.452 พีพีเอ็ม ตามลำดับ แต่เมื่อใช้สารสกัดด้วยเมทานอล พบว่า สารสกัดทุกความเข้มข้นไม่มีผลต่อปริมาณแอมโมเนียของลำต้นไมยราบยักษ์ สำหรับรากของไมยราบยักษ์ พบว่า สารสกัดด้วยน้ำกลั่น ความเข้มข้น 75 และ 100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ส่งผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุม โดยวัดปริมาณแอมโมเนียได้ 2.234 และ 18.915 พีพีเอ็ม ตามลำดับ และเมื่อใช้สารสกัดด้วยเมทานอล พบว่า สารสกัดความเข้มข้น 25, 50, 75 และ 100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ส่งผลให้มีการสะสมปริมาณแอมโมเนียเพิ่มขึ้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุม โดยวัดปริมาณแอมโมเนียได้ 7.424, 10.393, 17.817 และ 19.302 พีพีเอ็ม ตามลำดับ (ตารางที่ 15 และภาพที่ 33)

ตารางที่ 15 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ต่อการสะสมปริมาณแอมโมเนียที่ลำต้นและรากของไมยราบยักษ์

ความเข้มข้นของสารสกัด (กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร)	ปริมาณแอมโมเนีย (พีพีเอ็ม)			
	ลำต้น		ราก	
	น้ำกลั่น	เมทานอล	น้ำกลั่น	เมทานอล
0	0.000 c[1/]	0.000	0.000 b	0.000 c
25	0.000 c	0.000	0.000 b	7.424 b
50	0.000 c	0.000	0.000 b	10.393 b
75	2.226 b	0.000	2.234 b	17.817 a
100	4.452 a	0.000	18.915 a	19.302 a
เฉลี่ย	1.336 A[2/]	0.000 B	4.230 A	10.987 B

1/ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันตามสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2/ ค่าเฉลี่ยในแนวนอนที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันตามสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 33 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นที่แตกต่างกันต่อการสะสมปริมาณแอมโมเนียที่ (ก) ลำต้นและ (ข) รากของไมยราบยักษ์

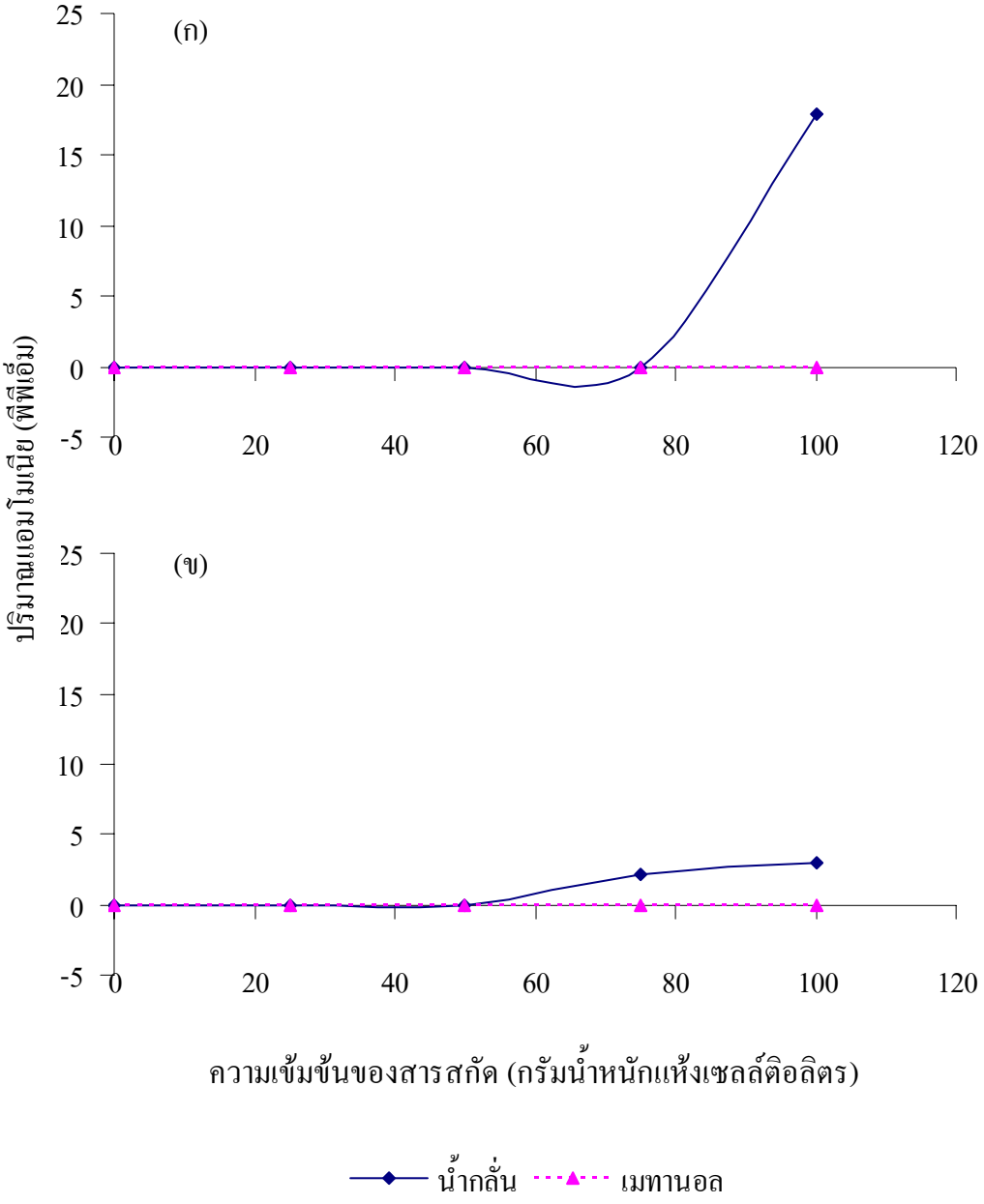
4.2 หญ้ายาง จากผลการทดลอง พบว่า ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* เมื่อใช้น้ำกลั่นและเมทานอลเป็นตัวทำละลายส่งผลให้ปริมาณแอมโมเนียที่สะสมทั้งในส่วนลำต้นและรากของหญ้ายางแตกต่างกันทางสถิติ โดยที่สารสกัดด้วยน้ำกลั่นความเข้มข้น 100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ส่งผลให้ปริมาณแอมโมเนียของลำต้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุม โดยวัดปริมาณแอมโมเนียได้ 17.810 พีพีเอ็ม และในกรณีของราก สารสกัดความเข้มข้น 75 และ 100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ส่งผลให้ปริมาณแอมโมเนียเพิ่มขึ้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุม ซึ่งวัดปริมาณแอมโมเนียได้ 2.204 และ 2.928 พีพีเอ็ม ตามลำดับ สำหรับสารสกัดด้วยเมทานอล พบว่าสารสกัดทุกความเข้มข้น ส่งผลให้ไม่มีการสะสมแอมโมเนียในส่วนลำต้นและรากของหญ้ายาง (ตารางที่ 16 และภาพที่ 34)

ตารางที่ 16 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ต่อการสะสมปริมาณแอมโมเนียที่ลำต้นและรากของหญ้ายาง

ความเข้มข้นของสารสกัด (กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร)	ปริมาณแอมโมเนีย (พีพีเอ็ม)			
	ลำต้น		ราก	
	น้ำกลั่น	เมทานอล	น้ำกลั่น	เมทานอล
0	0.000 b[1/]	0.000	0.000 b	0.000
25	0.000 b	0.000	0.000 b	0.000
50	0.000 b	0.000	0.000 b	0.000
75	0.000 b	0.000	2.204 a	0.000
100	17.810 a	0.000	2.928 a	0.000
เฉลี่ย	3.562 A[2/]	0.000 B	1.026 A	0.000 B

1/ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันตามสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2/ ค่าเฉลี่ยในแนวนอนที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันตามสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 34 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นที่แตกต่างกันต่อการสะสมปริมาณแอมโมเนียที่ (ก) ลำต้นและ (ข) รากของหญ้ายาง

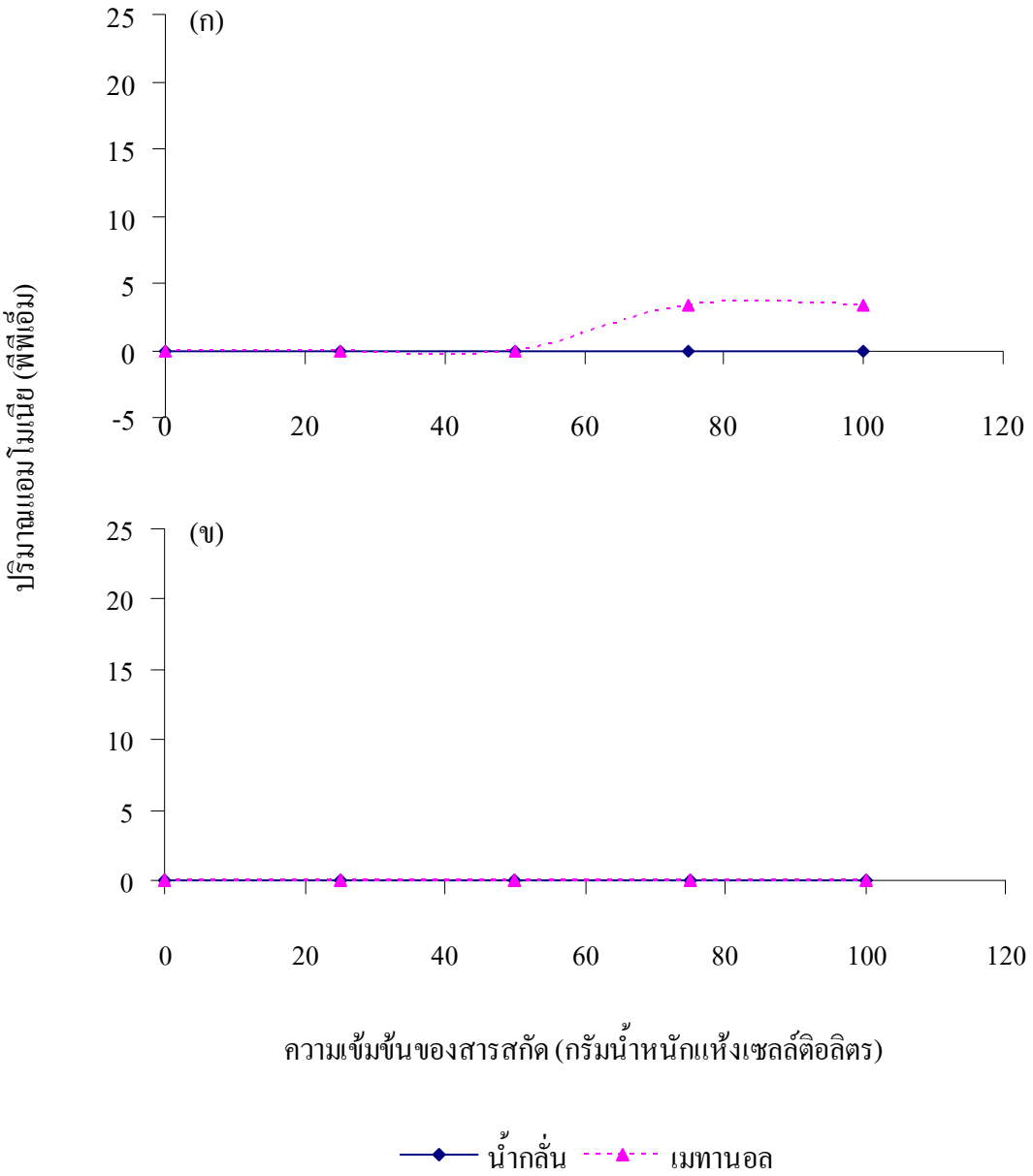
4.3 ผักกาดเขียวปลี จากผลการทดลอง พบว่า สารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่สกัดด้วยน้ำกลั่นและเมทานอลส่งผลให้ปริมาณแอมโมเนียของลำต้นแตกต่างกัน แต่ไม่แตกต่างกันในกรณีของราก โดยสารสกัดด้วยน้ำกลั่นไม่มีผลต่อการสะสมปริมาณแอมโมเนียทั้งส่วนลำต้นและราก ส่วนสารสกัดด้วยเมทานอลความเข้มข้น 75 และ 100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ทำให้มีการสะสมแอมโมเนียที่ลำต้นเพิ่มขึ้น ซึ่งวัดได้ 3.340 พีพีเอ็ม เท่ากันทั้งสองความเข้มข้น แต่ไม่มีผลต่อการสะสมแอมโมเนียที่รากเช่นเดียวกับสารสกัดด้วยน้ำกลั่น (ตารางที่ 17 และภาพที่ 35)

ตารางที่ 17 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ต่อการสะสมปริมาณแอมโมเนียที่ลำต้นและรากของผักกาดเขียวปลี

ความเข้มข้นของสารสกัด (กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร)	ปริมาณแอมโมเนีย (พีพีเอ็ม)			
	ลำต้น		ราก	
	น้ำกลั่น	เมทานอล	น้ำกลั่น	เมทานอล
0	0.000	0.000 b[1/]	0.000	0.000
25	0.000	0.000 b	0.000	0.000
50	0.000	0.000 b	0.000	0.000
75	0.000	3.340 a	0.000	0.000
100	0.000	3.340 a	0.000	0.000
เฉลี่ย	0.000 A[2/]	1.336 B	0.000	0.000

1/ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันตามสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2/ ค่าเฉลี่ยในแนวนอนที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันตามสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

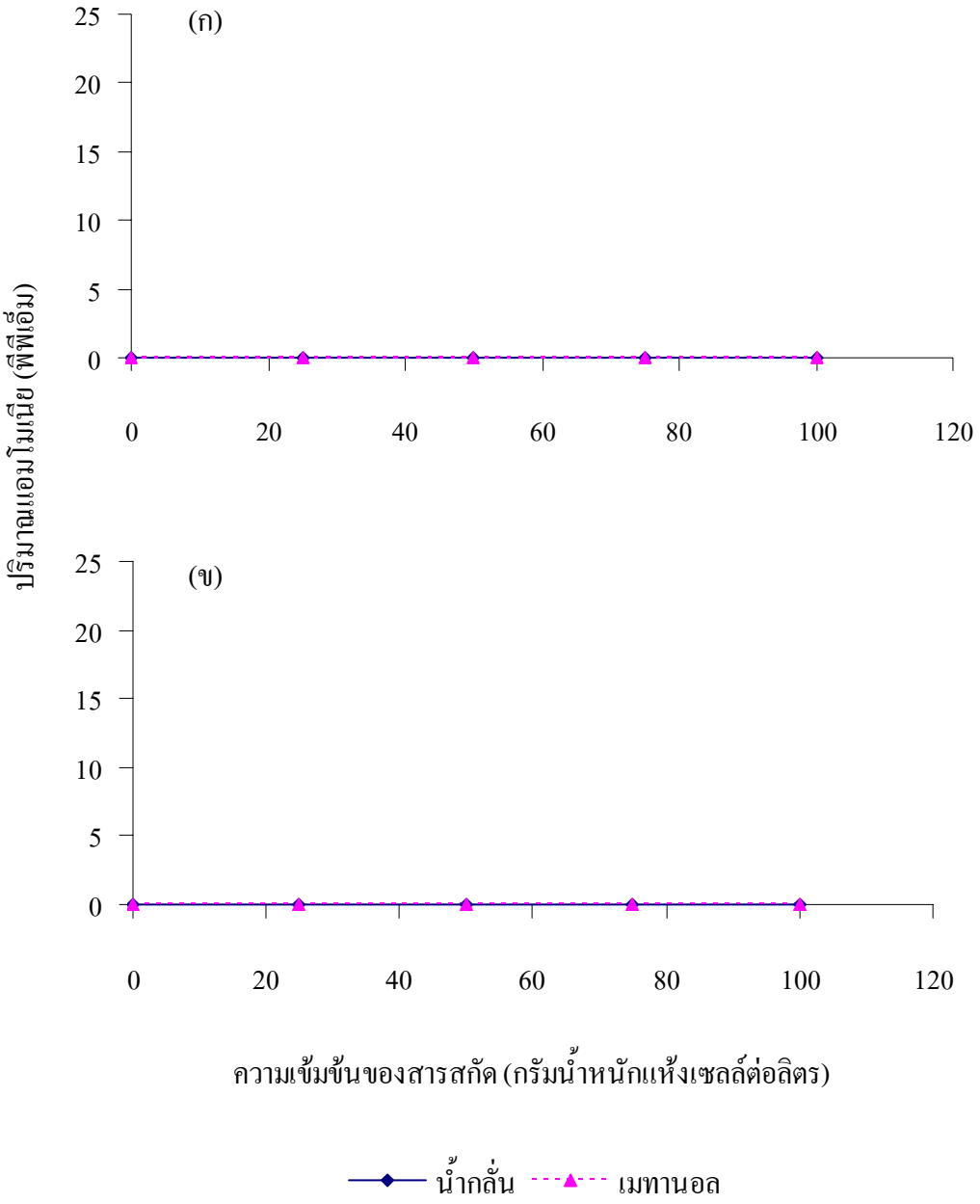


ภาพที่ 35 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ต่อการสะสมปริมาณแอมโมเนียที่ (ก) ลำต้นและ (ข) รากของผักกาดเขียวปลี

4.4 ถั่วเหลือง จากผลการทดลอง พบว่า สารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่สกัดด้วยน้ำกลั่นและเมทานอลทุกความเข้มข้นไม่มีผลต่อการสะสมปริมาณแอมโมเนียในส่วนของลำต้นและรากของถั่วเหลือง (ตารางที่ 18 และภาพที่ 36)

ตารางที่ 18 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นที่แตกต่างกันต่อการสะสมปริมาณแอมโมเนียที่ลำต้นและรากของถั่วเหลือง

ความเข้มข้นของสารสกัด (กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร)	ปริมาณแอมโมเนีย (พีพีเอ็ม)			
	ลำต้น		ราก	
	น้ำกลั่น	เมทานอล	น้ำกลั่น	เมทานอล
0	0.000	0.000	0.000	0.000
25	0.000	0.000	0.000	0.000
50	0.000	0.000	0.000	0.000
75	0.000	0.000	0.000	0.000
100	0.000	0.000	0.000	0.000
เฉลี่ย	0.000	0.000	0.000	0.000



ภาพที่ 36 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ต่อการสะสมปริมาณแอมโมเนียที่ (ก) ลำต้นและ (ข) รากของถั่วเหลือง

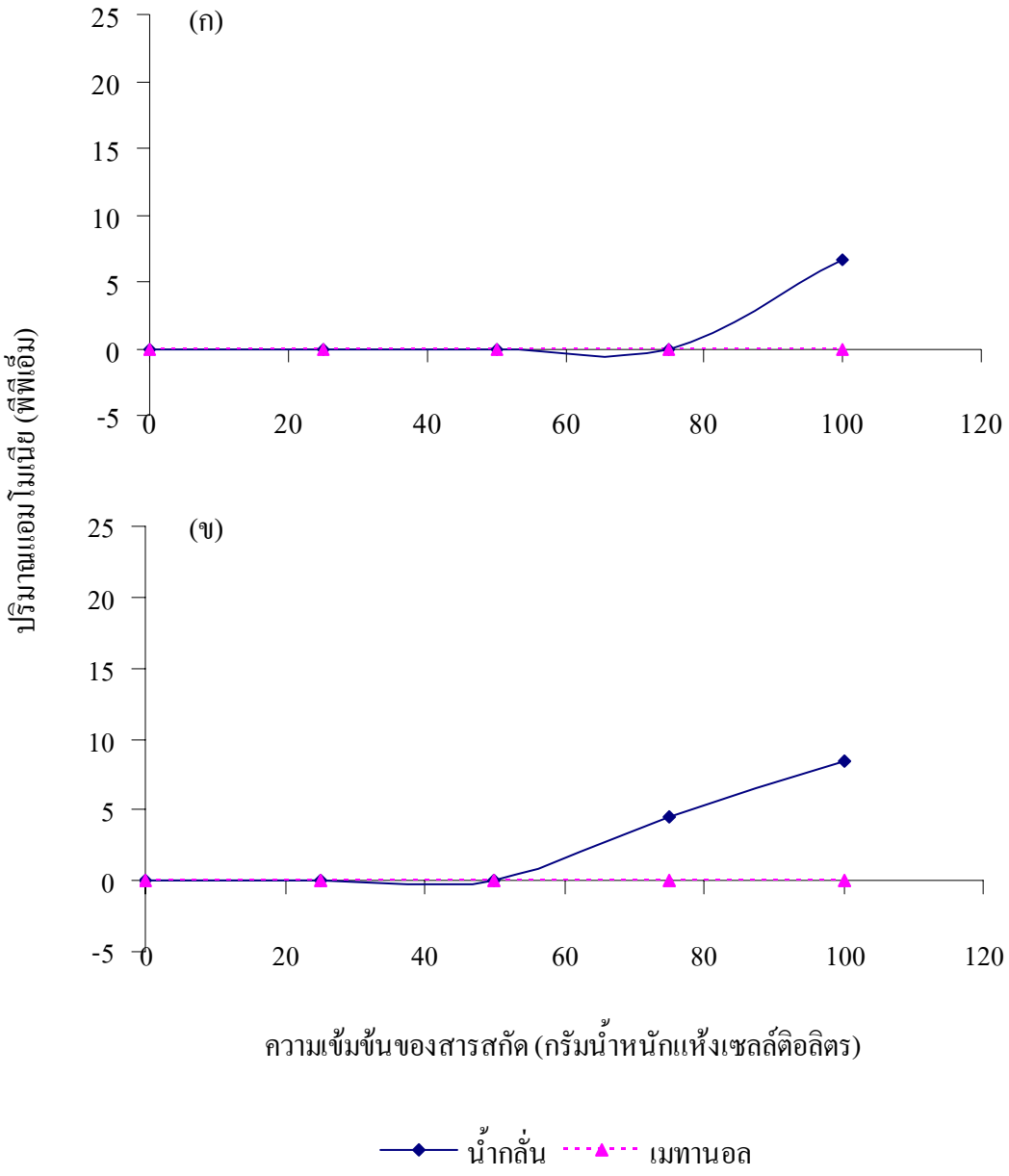
4.5 หญ้ารังนก จากผลการทดลอง พบว่า สารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่สกัดด้วยน้ำกลั่นและเมทานอลทำให้มีการสะสมแอมโมนียทั้งส่วนลำต้นและรากแตกต่างกันทางสถิติ โดยที่สารสกัดที่สกัดด้วยน้ำกลั่นความเข้มข้น 100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ทำให้มีการสะสมแอมโมเนียของลำต้นเพิ่มขึ้นแตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม โดยวัดปริมาณแอมโมเนียได้ 6.681 พีพีเอ็ม และสารสกัดความเข้มข้น 75 และ 100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ทำให้มีการสะสมแอมโมเนียในรากเพิ่มขึ้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุม โดยวัดปริมาณแอมโมเนียได้ 4.545 และ 8.436 พีพีเอ็ม ตามลำดับ สำหรับสารสกัดด้วยเมทานอลทุกความเข้มข้นทำให้ไม่มีการสะสมแอมโมเนียทั้งส่วนของลำต้นและรากของหญ้ารังนก (ตารางที่ 19 และภาพที่ 37)

ตารางที่ 19 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นที่แตกต่างกันต่อการสะสมปริมาณแอมโมเนียที่ลำต้นและรากของหญ้ารังนก

ความเข้มข้นของสารสกัด (กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร)	ปริมาณแอมโมเนีย (พีพีเอ็ม)			
	ลำต้น		ราก	
	น้ำกลั่น	เมทานอล	น้ำกลั่น	เมทานอล
0	0.000 b[1/]	0.000	0.000 c	0.000
25	0.000 b	0.000	0.000 c	0.000
50	0.000 b	0.000	0.000 c	0.000
75	0.000 b	0.000	4.545 b	0.000
100	6.681 a	0.000	8.436 a	0.000
เฉลี่ย	1.336 A[2/]	0.000 B	2.596 A	0.000 B

1/ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันตามสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2/ ค่าเฉลี่ยในแนวนอนที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันตามสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



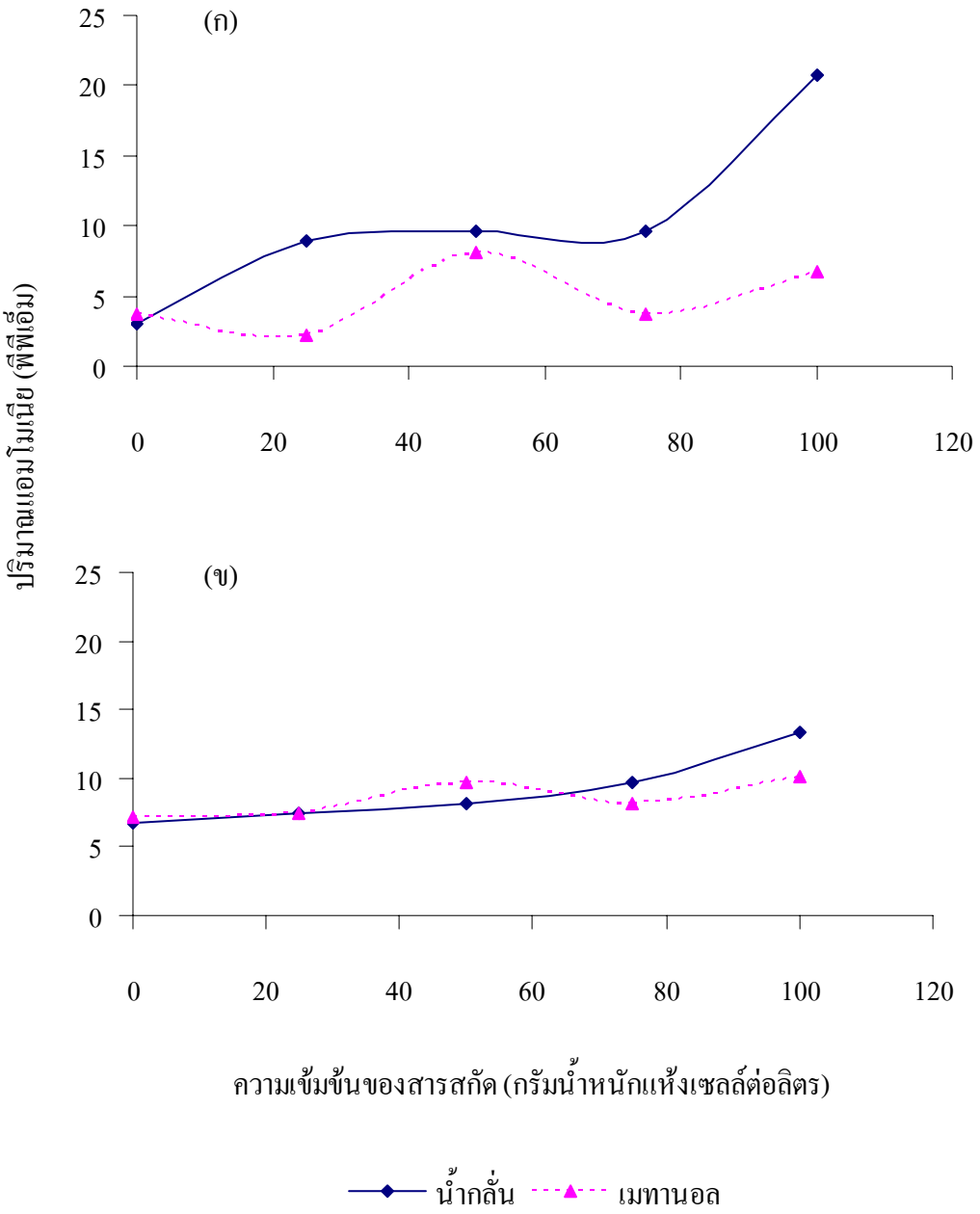
ภาพที่ 37 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ต่อการสะสมปริมาณแอมโมเนียที่ (ก) ลำต้นและ (ข) รากของหญ้ารังนก

4.6 ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 จากผลการทดลอง พบว่า สารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่สกัดด้วยน้ำกลั่นและเมทานอลมีผลให้การสะสมแอมโมเนียของลำต้นและรากของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่สารสกัดด้วยน้ำความเข้มข้น 100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ทำให้ปริมาณแอมโมเนียของลำต้นและรากของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุม โดยวัดปริมาณแอมโมเนียได้ 20.787 และ 13.363 พีพีเอ็ม ตามลำดับ ขณะที่สารสกัดด้วยเมทานอลทำให้มีการสะสมแอมโมเนียของลำต้นและรากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ไม่แตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม (ตารางที่ 20 และภาพที่ 38)

ตารางที่ 20 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นที่แตกต่างกันต่อการสะสมปริมาณแอมโมเนียที่ลำต้นและรากของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

ความเข้มข้นของสารสกัด (กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร)	ปริมาณแอมโมเนีย (พีพีเอ็ม)			
	ลำต้น		ราก	
	น้ำกลั่น	เมทานอล	น้ำกลั่น	เมทานอล
0	2.970 c[1/]	3.712	6.681 b	7.094
25	8.909 bc	2.227	7.424 b	7.424
50	9.651 abc	8.166	8.166 b	9.651
75	9.651 abc	5.578	9.651 ab	8.166
100	20.787 a	6.681	13.363 a	10.146
เฉลี่ย	10.393	5.273	9.057	8.496

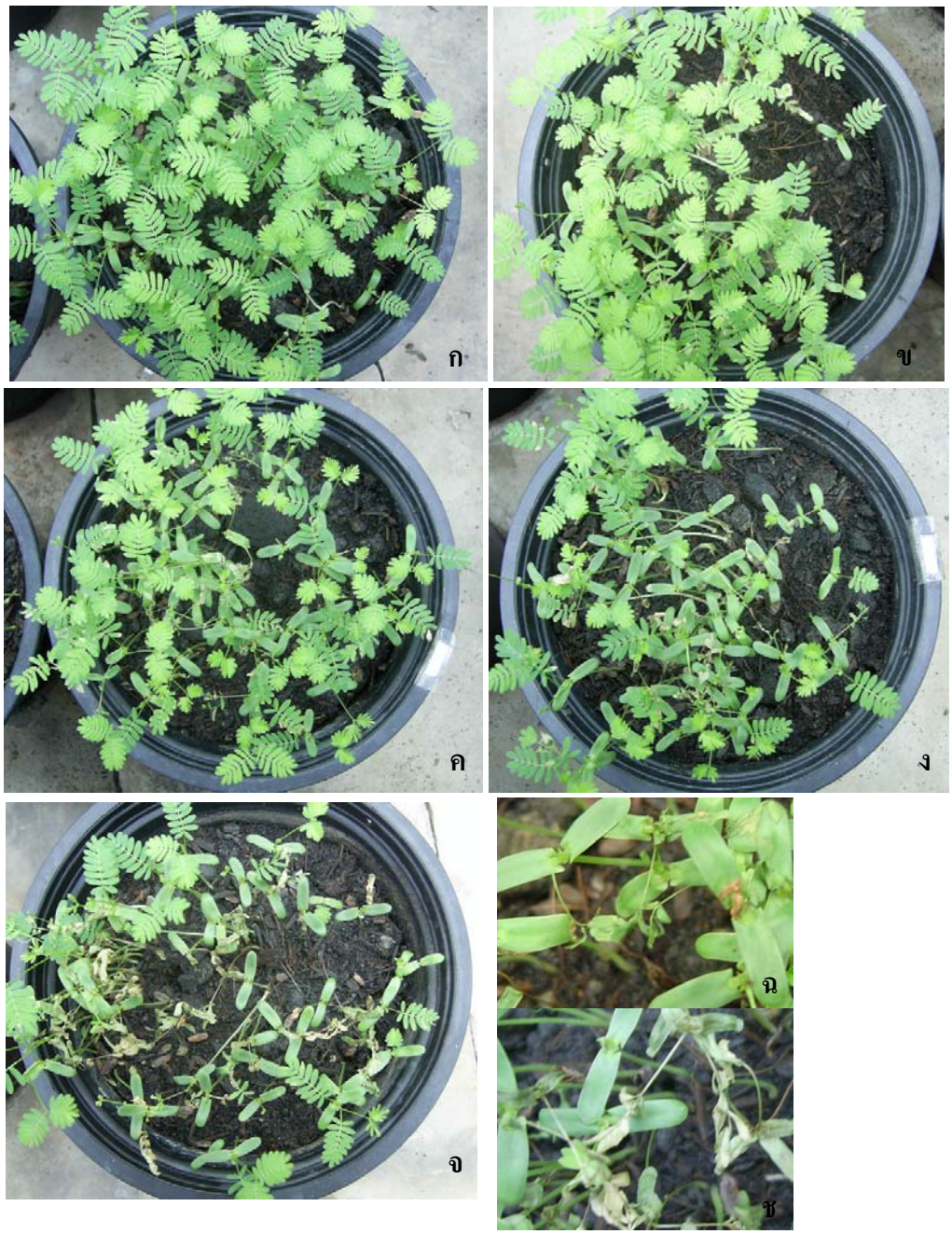
1/ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันตามสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



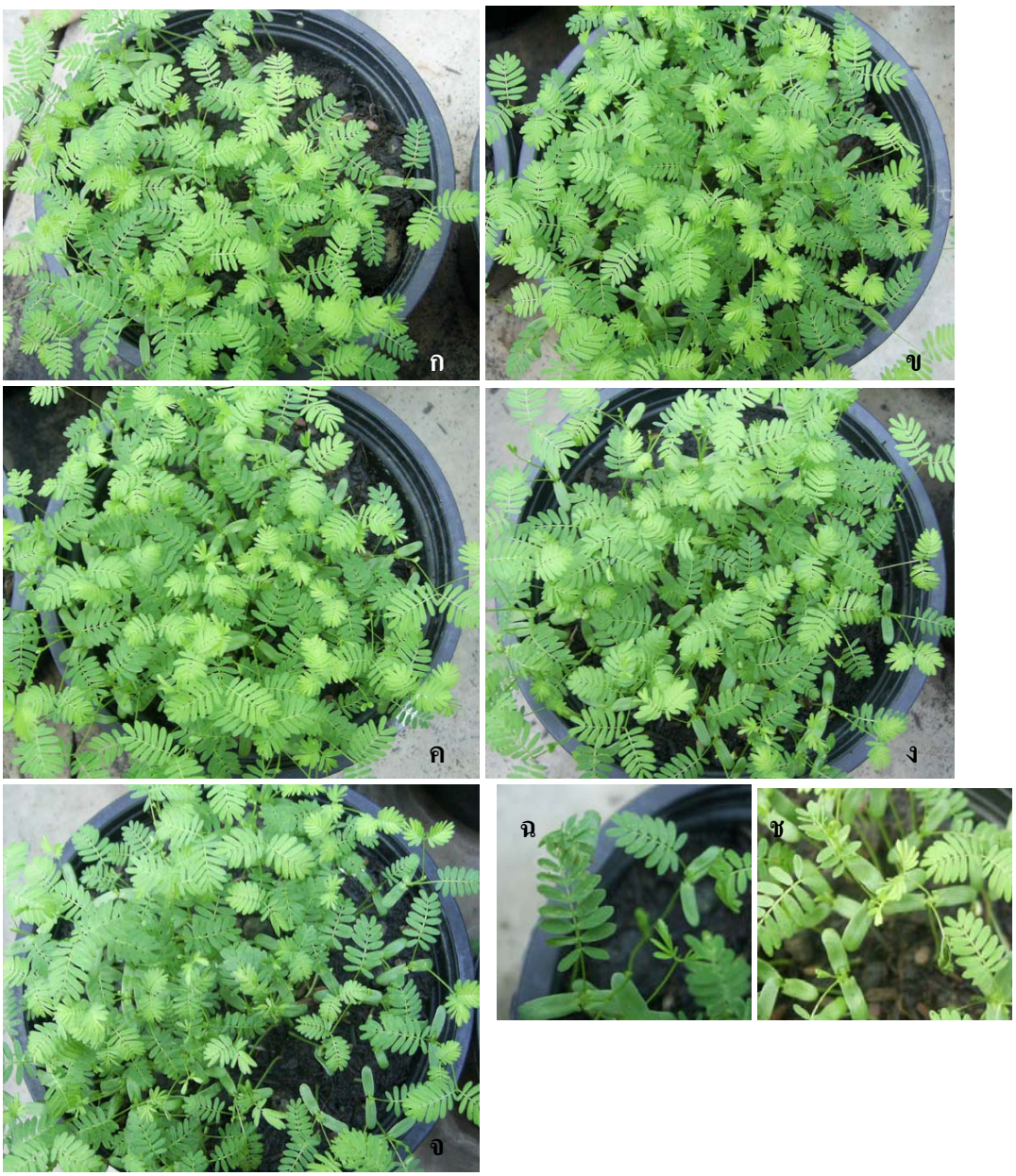
ภาพที่ 38 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ต่อการสะสมปริมาณแอมโมเนียที่ (ก) ลำต้นและ (ข) รากของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

ลักษณะอาการของพืชหลังจากได้รับสารสกัดจาก *H. fontinalis*

การทดลองที่ 2, 3 และ 4 ใช้พืชในการทดสอบ 6 ชนิดด้วยกัน ได้แก่ ไมยราบยักษ์ หญ้ายาง ผักกาดเขียวปลี ถั่วเหลือง หญ้ารังนก และข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเมื่อได้รับสารสกัดด้วยน้ำและเมทานอลจำนวน 3 ครั้ง เป็นระยะเวลา 15 วัน พืชแต่ละชนิดจะแสดงอาการผิดปกติแตกต่างกัน ดังนี้ ไมยราบยักษ์ เมื่อได้รับสารสกัดด้วยน้ำ จะแสดงอาการบริเวณใบและลำต้นบางส่วน โดยจะมีอาการเหี่ยวแห้ง และเมื่อสารสกัดความเข้มข้นเพิ่มขึ้น อาการผิดปกตินั้นก็จะเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 39) ขณะที่ต้นไมยราบยักษ์เมื่อได้รับสารสกัดด้วยเมทานอล จะแสดงอาการผิดปกติน้อยมาก (ภาพที่ 40) และหญ้ายาง เมื่อได้รับสารสกัดด้วยน้ำ อาการผิดปกติที่เกิดขึ้น คือ ใบเหี่ยว โดยเมื่อสารสกัดความเข้มข้นสูงขึ้น อาการใบเหี่ยวก็เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 41) ขณะที่หญ้ายางที่ได้รับสารสกัดด้วยเมทานอล ไม่แสดงอาการผิดปกติแต่อย่างใด (ภาพที่ 42) สำหรับผักกาดเขียวปลี (ภาพที่ 43 และ 44) ถั่วเหลือง (ภาพที่ 45 และ 46) หญ้ารังนก (ภาพที่ 47 และ 48) และข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (ภาพที่ 49 และ 50) เมื่อได้รับสารสกัดด้วยน้ำและเมทานอล ต้นพืชจะแสดงอาการผิดปกติน้อยมากหรือไม่มีการแสดงอาการเลย



ภาพที่ 39 ลักษณะของไมยราบยักษ์เมื่อได้รับสารสกัดจาก *H.fontinalis* ด้วยน้ำกลั่น ความเข้มข้นต่างๆ ก) ชุดควบคุม ข) 25 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ค) 50 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ง), ฉ) 75 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร จ), ช) 100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร



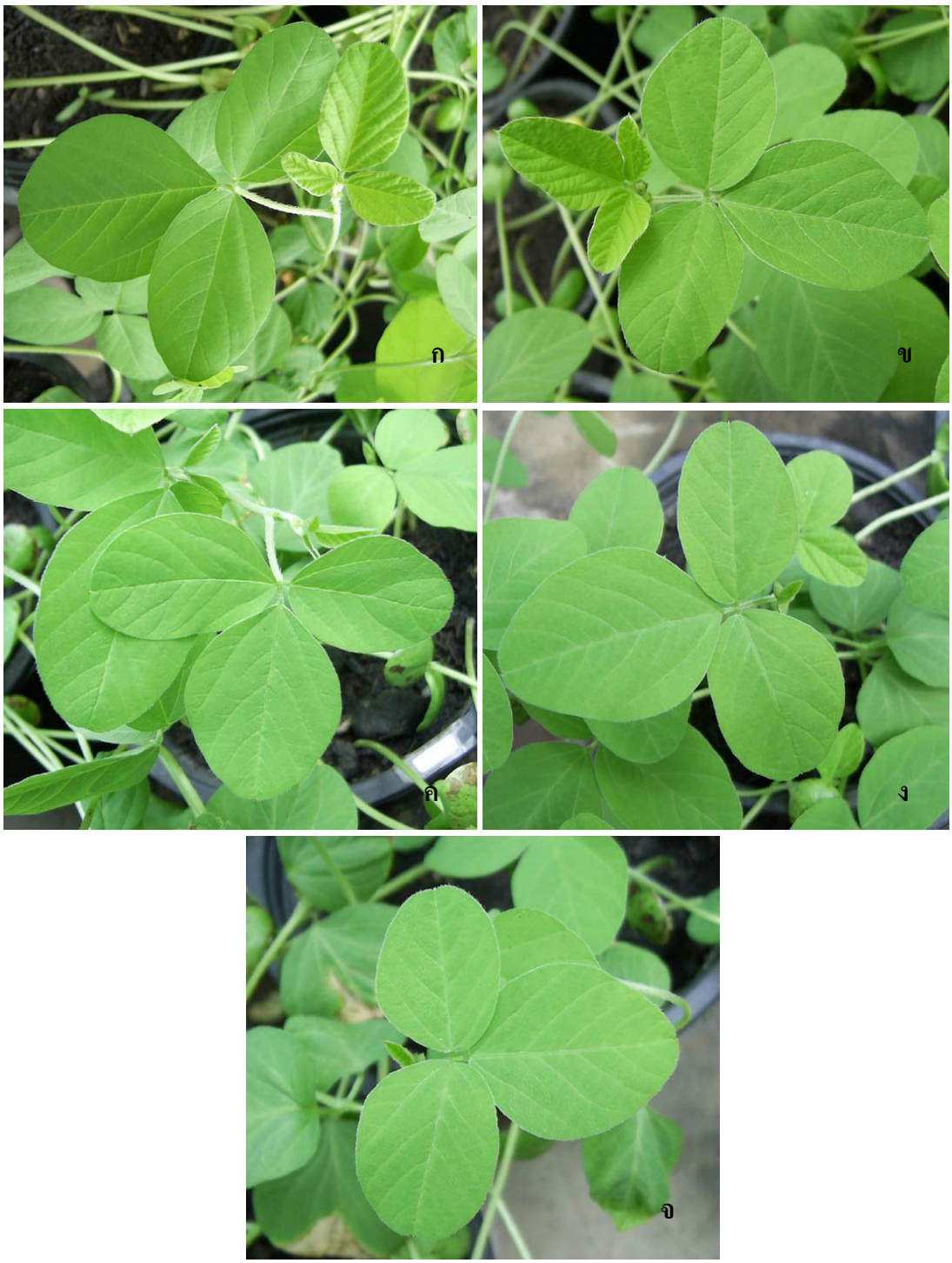
ภาพที่ 40 ลักษณะของไมยราบยักษ์เมื่อได้รับสารสกัดจาก *H. fontinalis* ด้วยเมทานอล ความเข้มข้นต่างๆ ก) ชุดควบคุม ข) 25 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ค) 50 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ง), ฉ) 75 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร จ), ช) 100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร

ภาพที่ 41 ลักษณะของหญ้ายางเมื่อได้รับสารสกัดจาก *H. fontinalis* ด้วยน้ำกลั่น ความเข้มข้นต่างๆ ก) ชุดควบคุม ข) 25 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ค) 50 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ง) 75 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร จ) 100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร

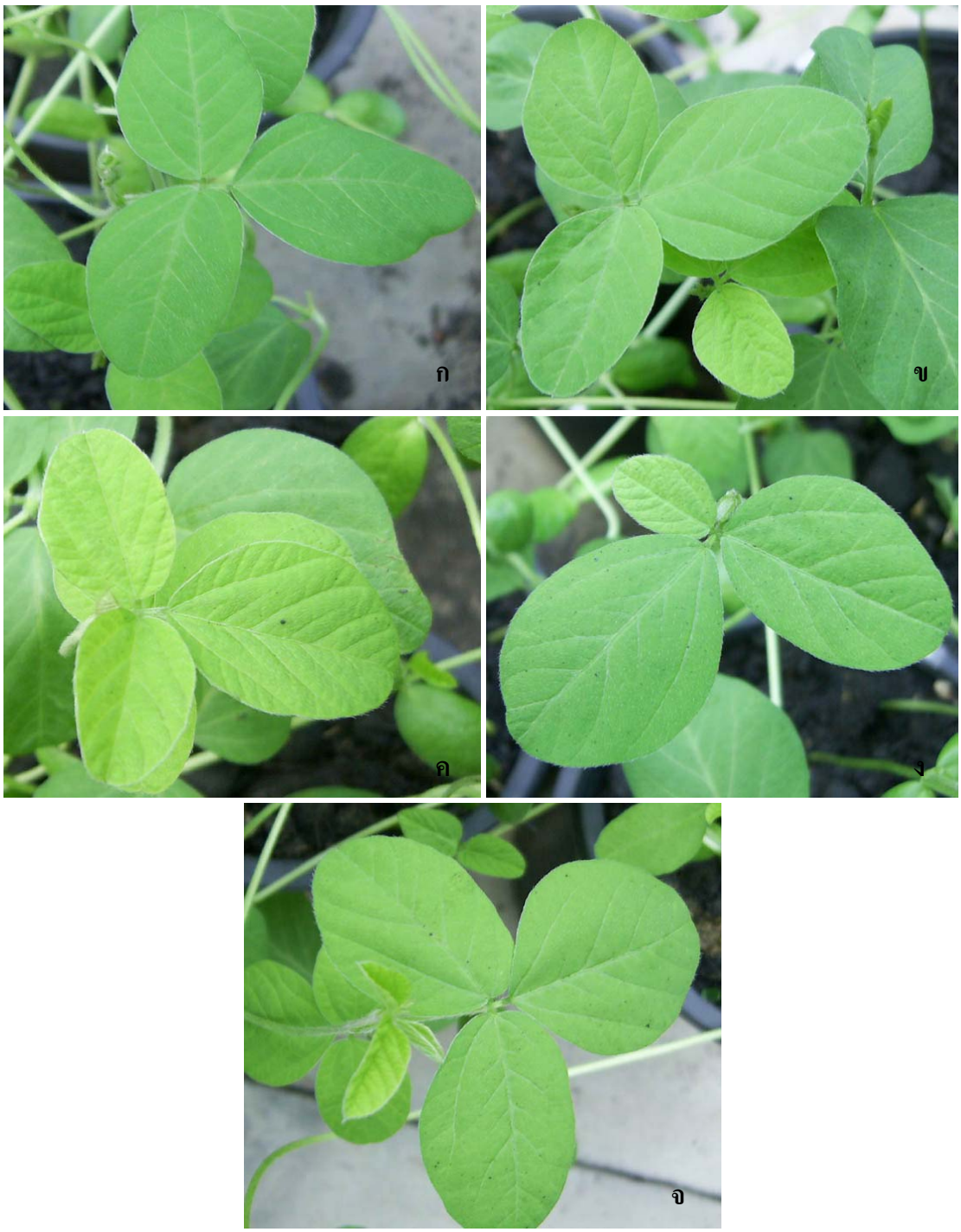
ภาพที่ 42 ลักษณะของหญ้ายางเมื่อได้รับสารสกัดจาก *H. fontinalis* ด้วยเมทานอล ความเข้มข้นต่างๆ ก) ชุดควบคุม ข) 25 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ค) 50 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ง) 75 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร จ) 100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร

ภาพที่ 43 ลักษณะของผักกาดเขียวปลีเมื่อได้รับสารสกัดจาก *H. fontinalis* ด้วยน้ำกลั่นความเข้มข้นต่างๆ ก) ชุดควบคุม ข) 25 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ค) 50 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ง) 75 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร จ) 100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร

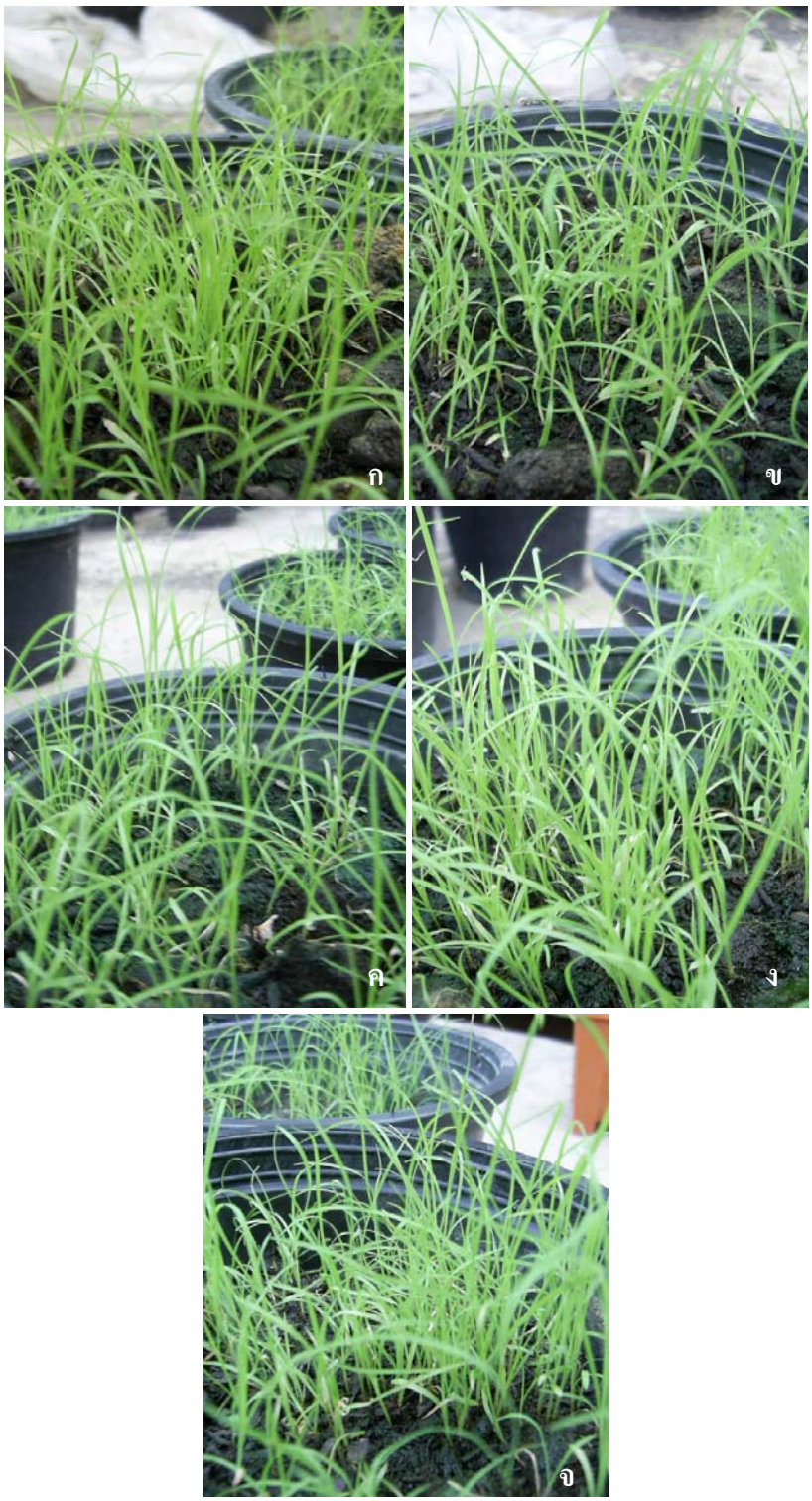
<u>ภาพที่ 44</u> ลักษณะของผักกาดเขียวปลีเมื่อได้รับสารสกัดจาก *H. fontinalis* ด้วยเมทานอลความเข้มข้นต่างๆ ก) ชุดควบคุม ข) 25 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ค) 50 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ง) 75 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร จ) 100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร



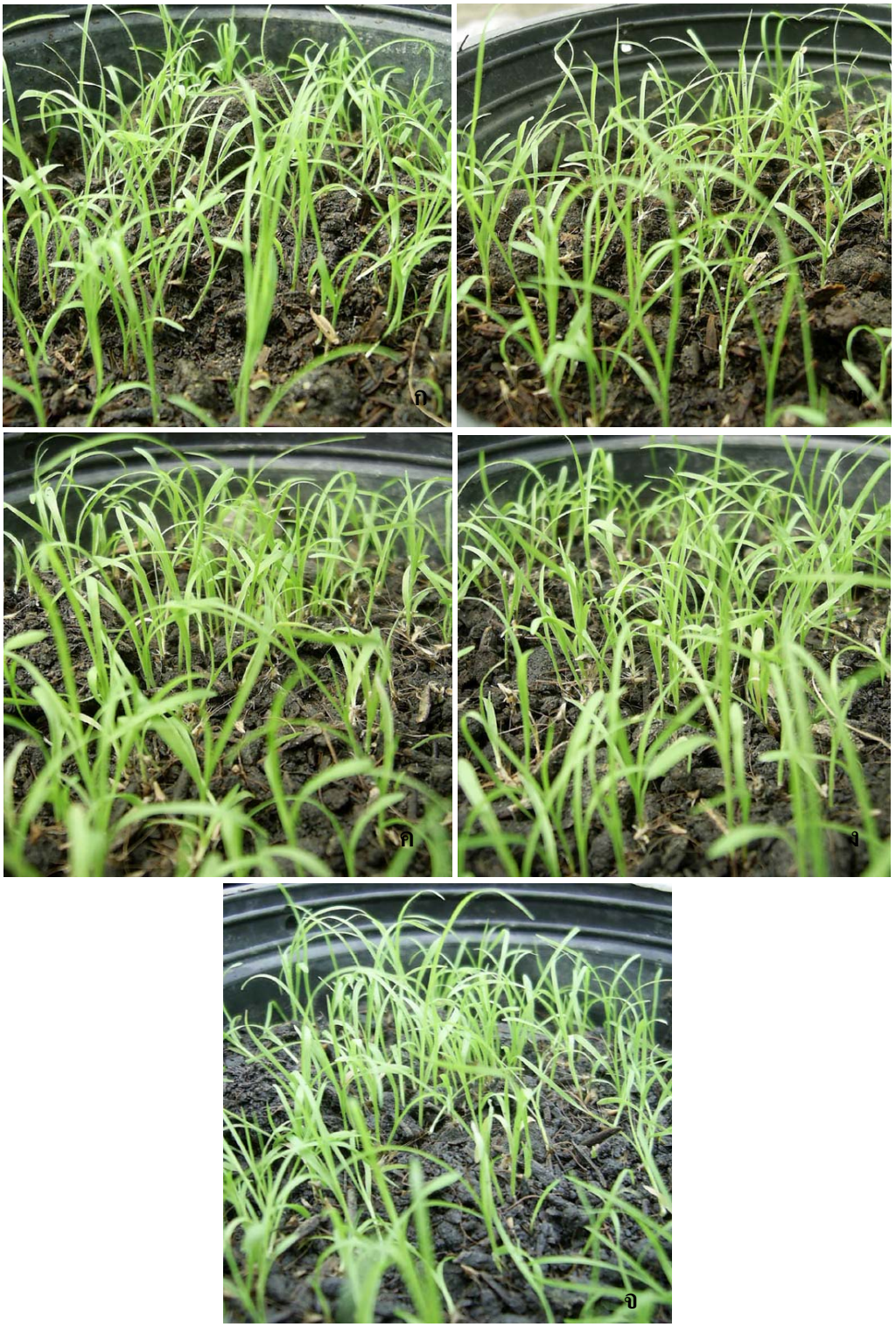
<u>ภาพที่ 45</u> ลักษณะของถั่วเหลืองเมื่อได้รับสารสกัดจาก *H. fontinalis* ด้วยน้ำกลั่นความเข้มข้นต่างๆ ก) ชุดควบคุม ข) 25 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ค) 50 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ง) 75 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร จ) 100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร



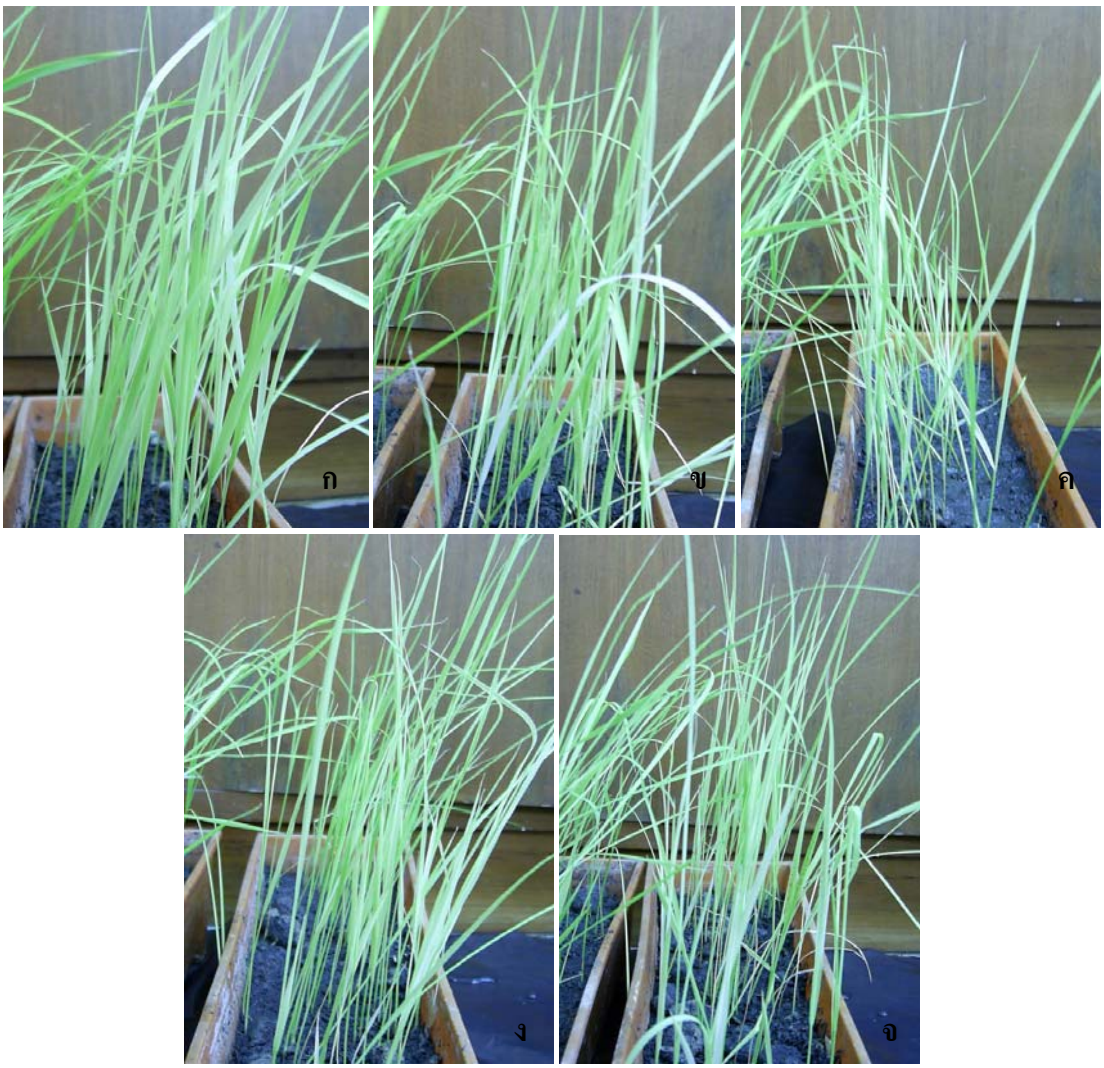
ภาพที่ 46 ลักษณะของถั่วเหลืองเมื่อได้รับสารสกัดจาก *H. fontinalis* ด้วยเมทานอลความเข้มข้นต่างๆ ก) ชุดควบคุม ข) 25 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ค) 50 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ง) 75 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร จ) 100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร



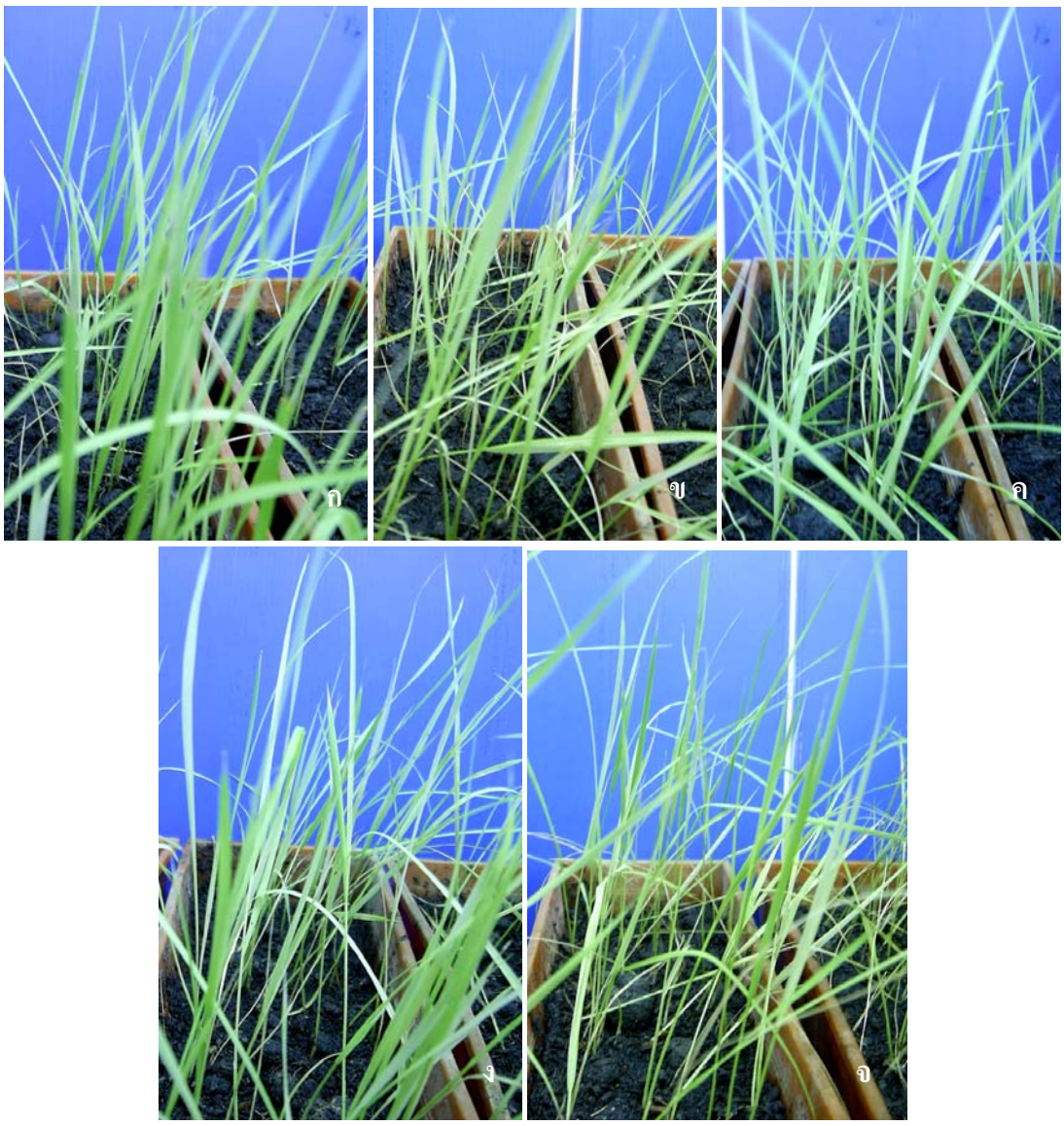
ภาพที่ 47 ลักษณะของหญ้ารังนกเมื่อได้รับสารสกัดจาก *H. fontinalis* ด้วยน้ำกลั่นความเข้มข้นต่างๆ ก) ชุดควบคุม ข) 25 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ค) 50 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ง) 75 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร จ) 100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร



ภาพที่ 48 ลักษณะของหญ้ารังนกเมื่อได้รับสารสกัดจาก *H. fontinalis* ด้วยเมทานอลความเข้มข้นต่างๆ ก) ชุดควบคุม ข) 25 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ค) 50 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ง) 75 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร จ) 100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร



ภาพที่ 49 ลักษณะของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เมื่อได้รับสารสกัดจาก *H. fontinalis* ด้วยน้ำกลั่นความเข้มข้นต่างๆ ก) ชุดควบคุม ข) 25 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ค) 50 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ง) 75 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร จ) 100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร



ภาพที่ 50 ลักษณะของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เมื่อได้รับสารสกัดจาก *H. fontinalis* ด้วยเมทานอลความเข้มข้นต่างๆ ก) ชุดควบคุม ข) 25 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ค) 50 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร ง) 75 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร จ) 100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร

วิจารณ์

จากการที่มีรายงานว่า ไซยาโนแบคทีเรียหลายชนิด มีการสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งมีการใช้เป็นสารปฏิชีวนะ (antibiotic) หรือสารประกอบอัลลิโลเคมี (allelochemical compounds) ที่มีผลต่อกระบวนการทางชีวเคมีภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตที่อยู่ใกล้เคียง (Smith and Doan, 1999) และจากการทดลองของณรงค์ (2548) พบว่า สารสกัดจาก *H. fontinalis* สามารถยับยั้งการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสง มีผลยับยั้งการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ผักกาดขาวปลี ถั่วผีและหญ้ารังนก และสารสกัดความเข้มข้นสูงมีผลยับยั้งความยาวยอดและความยาวรากได้ ในการศึกษาครั้งนี้ จึงศึกษาเกี่ยวกับผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาภายในพืชบางชนิด

เนื่องจากมีรายงานว่า สารประกอบอัลลิโลเคมีมีกลไกยับยั้งการเจิญเติบโตและพัฒนาการของพืช ซึ่งจะไปยับยั้งกระบวนการทางสรีรวิทยาที่สำคัญของพืช เช่น การแบ่งเซลล์ (cell division) การขยายขนาดของเซลล์ (cell extention) สมบัติเยื่อเลือกผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane permeability) การดูดซึมธาตุอาหาร (nutrient uptake) การสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ (chlorophyll synthesis) กระบวนการสังเคราะห์แสง (photosynthesis) การสังเคราะห์โปรตีน (protein synthesis) กิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activity) กระบวนการหายใจ (respiration) ฮอร์โมน และสมดุลของน้ำ (water balance) (Leather and Einhellig, 1988) การศึกษาครั้งนี้จึงได้ศึกษาถึงผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ต่อการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส กระบวนการ lipid peroxidation รงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสง และกระบวนการ ammonia assimilation โดยการฉีดพ่นสารสกัดไปที่ใบและลำต้นเหนือดิน ซึ่งเป็นการใช้ควบคุมวัชพืชหลังงอก (postemergence) ซึ่งจะแบ่งเป็นระยะต้นอ่อน (early postemergence) หมายถึงการใช้สารที่ขณะเมล็ดพืชปลูกและวัชพืชงอกได้ไม่นาน (เป็นต้นกล้า) ระยะหลังการเป็นต้นกล้า (late postemergence) หมายถึงการใช้สารขณะที่เมล็ดพืชปลูกและวัชพืชเจริญเติบโตพ้นระยะต้นกล้าแล้ว (รังสิต, 2531) โดยผลที่ได้จะได้นำไปประยุกต์ใช้ต่อไป

ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ต่อการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสที่ปลายรากหอม

จากผลการทดลอง พบว่า สารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่สกัดด้วยน้ำกลั่นและเมทานอล ความเข้มข้น 10 และ 20 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร มีผลทำให้ความยาวของรากหอมลดลง เมื่อ

สังเกตด้วยตาเปล่า (ภาพที่ 10) แสดงว่า สารสกัดจาก *H. fontinalis* อาจจะมีผลยับยั้งการแบ่งเซลล์ที่ปลายรากหอม

จากการศึกษาการแบ่งเซลล์ระยะไมโทซิส พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดทั้งสารสกัดด้วยน้ำและเมทานอล จะทำให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ในระยะต่างๆ ลดลง และเมื่อพิจารณาที่ค่า mitotic index พบว่า สารสกัดความเข้มข้น 20 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร มีผลทำให้ค่า mitotic index ลดลงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุม (ตารางที่ 2) แสดงว่า สารสกัดจาก *H. fontinalis* มีผลยับยั้งการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสที่ปลายรากหอม ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Sanevas *et al*. (2006a) ที่พบว่าสารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon* sp. ส่งผลยับยั้งการแบ่งเซลล์ที่ปลายรากของพืชหลายชนิด และส่งผลให้ค่า mitotic index ของหอม (*A. cepa*) ลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด โดยผลที่เกิดขึ้นอาจจะเนื่องจากสารสกัดจาก *H. fontinalis* ส่งผลยับยั้งวัฏจักรของเซลล์ ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับการยับยั้งกิจกรรมของ cyclin-dependent kinase (CDK) ซึ่ง CDK จัดเป็นตัวควบคุมวัฏจักรของเซลล์ โดยที่จะควบคุมการเปลี่ยนจากระยะ G_1 ไปเป็น S หรือจากระยะ G_2 ไปเป็นระยะ M หรือระยะไมโทซิส (Hopkins and Hüner, 2004) จึงทำให้การแบ่งเซลล์ในระยะไมโทซิสลดลง และอีกเหตุผลหนึ่ง คือสารสกัดจาก *H. fontinalis* อาจจะไปมีผลยับยั้งการทำงานของ microtubule ซึ่งทศพล (2545) กล่าวว่า สารในกลุ่ม dinitroaniline จะยับยั้งการจับกันของ tubulin ให้เป็น microtubule เนื่องจากสารในกลุ่มนี้จะเข้าไปเกาะจับกับ tubulin เกิดเป็น HB-tubulin complex ทำให้ไม่สามารถสร้าง microtubule ได้ มีผลทำให้ระยะเมทาเฟสของการแบ่งเซลล์ไม่มีการสร้าง spindle fiber ขึ้นมา ส่งผลให้การพัฒนาส่วนต่างๆ ของเซลล์ผิดปกติไป รวมถึงการสร้างผนังเซลล์ด้วย ซึ่ง microtubule จัดเป็นออแกเนลล์ที่ทำหน้าที่เป็นโครงสร้าง 4 ชุด ต่อเนื่องกันตลอดวัฏจักรของการแบ่งเซลล์ ที่สำคัญ คือ ทำหน้าที่เป็น mitotic spindle ซึ่งเป็นตัวดึงโครโมโซมให้แยกออกจากกัน ในระยะเมทาเฟส และแอนาเฟส เมื่อถึงระยะเทโลเฟส spindle จะหายไป แต่ spindle microtubules จะยังคงอยู่ และเกิดเป็นโครงร่างชุดต่อไปคือ phagmoplast โดยเป็นส่วนที่เกิดของ cell plate ซึ่ง microtubules ของ phagmoplast จะยึดเกาะกันแน่นตลอด cell plate และค่อยๆ ดันออกไปด้านข้างเพื่อสร้างเป็น cell plate (ลิลลี่, 2546) นอกจากนี้ยังมีรายงานที่เกี่ยวข้อง เช่น Chauhan *et al*. (1999) พบว่า สารสังเคราะห์จำพวก alpha-cyano pyrethroid insecticide ที่มีชื่อว่า cypermethrin และ fenvalerate ทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซม และยับยั้ง mitotic index โดยจะส่งผลต่อ mitotic spindle ที่ปลายรากหอม (*A. cepa* L.) Oliva *et al*. (2002) พบว่า podophyllotoxin และ etoposide ส่งผลยับยั้งการแบ่งเซลล์ในทุกระยะของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส โดยส่งผลกระทบอันดับแรกต่อการสร้าง spindle microtubule ที่ปลายรากหอม

(*A. cepa* L.) และ podophyillin ซึ่งเป็นสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของ *Popdophyllum* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช โดยส่งผลต่อการสร้าง mitotic microtubules ที่ปลายราก และรายงานว่าสารกำจัดวัชพืชหลายชนิดจะยับยั้งการแบ่งเซลล์ และชักนำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซม เช่น carbamate จะส่งผลต่อการสร้าง microtubule Badr and Elkington (1982) รายงานว่า สารกำจัดวัชพืช isoproturon ยับยั้งการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส และการทำงานของ spindle fiber ที่ปลายรากของ *A. cepa* และ *Hordeum vulgare* นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Zoldos *et al*. (1997) ว่า น้ำมันและแก๊สจากโรงงานผลิตสารเคมี ส่งผลกระทบต่อการแบ่งเซลล์ โดยมีผลต่อการทำงานของ spindle fiber ที่ปลายรากหอม (*A. ascalonicum* L.) ซึ่งจะให้ผลคล้ายกับสารกำจัดวัชพืชหลายชนิด เช่น carbamates, mercurials, chlorocyclohexan, nitralin, maleic hydrazide, atrazine เป็นต้น

อย่างไรก็ตาม นอกจากสารเคมีมีผลต่อการยับยั้ง microtubule แล้ว ยังมีผลต่อความผิดปกติของโครโมโซม เช่น เกิด polyploidy nuclei, loped nuclei และโครมาตินมีลักษณะหดสั้นหนากว่าปกติ เป็นต้นเหตุให้เกิดการเกาะกลุ่มของโครโมโซม ทำให้เกิด sticky bridge ในระยะแอนาเฟสและเทโลเฟส และส่งผลกระทบต่อการแบ่งไซโทพลาสซึม (cytokinesis) ต่อไป (Zoldos *et al*., 1997) และมีรายงานของ Oliva *et al*. (2002) ว่าสารกำจัดวัชพืชบางชนิด มีผลกระทบทางอ้อมต่อกระบวนการแบ่งเซลล์ โดยไปมีผลยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ที่สารที่ *H. fontinalis* ปลดปล่อยออกมาในอาหารเลี้ยง ส่งผลต่อความผิดปกติของโครโมโซม โดยจากการทดลอง จะพบลักษณะความผิดปกติของโครโมโซมที่ชัดเจนสองลักษณะคือ พบการเกิด anaphase bridge จากปลายรากหอมที่แช่ในสารสกัดด้วยเมทานอลความเข้มข้น 10 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร และการเกิด stickiness จากปลายรากหอมที่แช่ในสารสกัดด้วยน้ำความเข้มข้น 10 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร (ภาพที่ 14)

เมื่อพิจารณาตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารจาก *H. fontinalis* ซึ่งในการทดลองนี้ใช้น้ำกลั่นและเมทานอลเป็นตัวทำละลาย พบว่า เมื่อใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลายจะทำให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ในระยะต่างๆ ของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสน้อยกว่าเมื่อใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย และจากค่า mitotic index พบว่า เมื่อใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลายทำให้ค่า mitotic index น้อยกว่าเมื่อใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายเช่นกัน เนื่องจากน้ำและเมทานอล จัดเป็นตัวทำละลายที่มีขั้ว (protic solvent) แต่น้ำเป็นตัวทำละลายที่มีขั้ว (polarity) สูงกว่าเมทานอล (Reichardt, 2003) ผลการทดลองนี้จึงแสดงให้เห็นว่า สารจาก *H. fontinalis* ที่มีผลในการยับยั้งการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสที่บริเวณปลายรากหอมน่าจะจัดเป็นสารละลายที่มีขั้ว เนื่องจากสารที่สกัดได้ด้วยน้ำกลั่น จัดเป็นสารที่มีขั้ว

(polar compound) ทำให้สามารถละลายได้ดีในน้ำ (Keil *et al*., 2002) ส่วนเมทานอลมีส่วนที่ไม่มีขั้วมากกว่าน้ำ จึงทำให้สกัดสารชนิดนี้ได้ไม่ดีเท่าน้ำกลั่น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ ณรงค์ (2548) ที่สกัดสารจาก *H. fontinalis* ด้วยน้ำกลั่นจะให้ผลในการยับยั้งการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ผักกาดขาวปลี ถั่วผี และหญ้ารังนกได้ดีกว่าสารที่สกัดด้วยเมทานอล และณัฏฐา (2543) พบว่า สารสกัดจาก *Hapalosiphon* sp. ด้วยน้ำกลั่นทำให้เปอร์เซ็นต์การงอกของหญ้ารังนกและผักกาดขาวปลีลดลง

ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ต่อการเกิด lipid peroxidation

กระบวนการ lipid peroxidation จัดเป็นกระบวนการหนึ่งที่เกิดขึ้น เนื่องมาจากการเกิด oxidative stress ภายในพืช โดยวัดจากปริมาณ MDA ที่เพิ่มขึ้น (Hodges *et al*., 1999) จากการศึกษาผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ด้วยน้ำกลั่นและเมทานอลที่ได้จากเซลล์ในระยะ stationary ต่อการเกิดกระบวนการ lipid peroxidation ในวัชพืชและพืชปลูก พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด จะมีแนวโน้มทำให้ปริมาณ MDA ในไมยราบยักษ์ หญ้ายาง ผักกาดเขียวปลี และหญ้ารังนกเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 15, 16, 17 และ 19) ทั้งในส่วนลำต้นและราก แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นจะส่งผลให้เกิด oxidative stress ในพืชทั้งสี่ชนิด โดยสารสกัดมีการเคลื่อนย้ายจากบริเวณใบไปสู่รากได้ จึงเกิดผลทั้งในส่วนลำต้นและราก สำหรับในกรณีของถั่วเหลืองและข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 พบว่าสารสกัดจาก *H. fontinalis* ไม่ก่อให้เกิด oxidative stress เพราะว่าปริมาณ MDA ที่วัดได้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุมทั้งส่วนลำต้นและราก แสดงว่าถั่วเหลืองและข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มีความต้านทานต่อสารสกัดจาก *H. fontinalis* ในการเกิด oxidative stress มากกว่าพืชชนิดอื่น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของอินทิรา (2548) ในกรณีของถั่วเหลือง ที่พบว่าสารสกัดด้วยน้ำจาก *H. fontinalis* ไม่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ในถั่วเหลืองระยะต้นกล้า และเพ็ญนภา (2547) ที่พบว่าสารสกัดจาก *Hapalosiphon* sp. ไม่มีผลยับยั้งการงอกของถั่วเหลือง ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากถั่วเหลืองมีการสร้างสาร antioxidant หรือ antioxidative enzymes เพื่อกำจัดพิษของ ROS ที่เกิดขึ้นโดยสารสกัดจาก *H. fontinalis* ซึ่งมีรายงานของ Posmyk *et al*. (2005) ว่าถั่วเหลืองมีการสร้างสาร antioxidant enzymes และ isoflavonoid เพื่อป้องกันอันตรายจาก ROS ที่เกิดขึ้นเมื่อเกิดสภาวะเครียดจากความเย็น (chilling temperature) แต่สำหรับข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 อินทิรา (2548) พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดจาก *H. fontinalis* จะทำให้ปริมาณ MDA เพิ่มขึ้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากชุดควบคุมของข้าวระยะต้นกล้า ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า เมื่อข้าวมีการเติบโตมากขึ้น จึงมีความต้านทานต่อ

สารสกัดเพิ่มขึ้น เนื่องจากพืชหรือวัชพืชที่มีอายุแตกต่างกัน จะมีการตอบสนองต่อการใช้สารกำจัดวัชพืชแตกต่างกัน ซึ่งโดยปกติแล้วพืชที่มีอายุน้อยจะอ่อนแอต่อสารเคมีมากกว่าพืชที่มีอายุมาก ทั้งนี้เนื่องจากพืชที่มีอายุน้อยนั้นเป็นระยะที่มีการเติบโตไม่เต็มที่ ความทนทานต่อสารเคมีจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อพืชมีอายุมากขึ้น เช่น ข้าวสาลีจะมีความทนทานต่อสาร 2,4-D, dicamba และ MCPA เมื่อเข้าสู่ระยะที่มี 6 ใบ และข้าวฟ่างจะทนต่อสารที่ใช้ฉีดทางใบแบบหลังงอกของสาร 2,4-D เมื่อพืชเข้าสู่ระยะที่มีความสูง 4-12 นิ้ว (พรชัย, 2531)

เมื่อพิจารณาที่ตัวทำละลาย พบว่า สารสกัดด้วยน้ำเท่านั้นที่ส่งผลในการเกิดปฏิกิริยาในไมยราบยักษ์ ผักกาดเขียวปลี และหญ้ารังนก แต่ในกรณีของหญ้ายางทั้งสารสกัดด้วยน้ำและเมทานอลมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation โดยที่สารสกัดด้วยน้ำส่งผลทั้งในส่วนลำต้นและราก แต่สารสกัดด้วยเมทานอลมีผลเฉพาะที่ลำต้นเท่านั้น แสดงว่าสารสกัดจากเมทานอลไม่มีการเคลื่อนย้ายจากลำต้นไปสู่ราก จากการทดลองนี้จะเห็นว่าสารสกัดด้วยน้ำกลั่นมีประสิทธิภาพในการก่อให้เกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation หรือ oxidative stress ได้มากกว่าสารสกัดด้วยเมทานอล

ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ต่อรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสง (photosynthetic pigment)

รงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสงที่สำคัญ ได้แก่ คลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และแคโรทีนอยด์ ซึ่งถ้าคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ถูกทำลายลงก็จะทำให้ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงลดลง โดยจากผลการทดลอง พบว่า ในไมยราบยักษ์ และผักกาดเขียวปลี ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี คลอโรฟิลล์ทั้งหมด และแคโรทีนอยด์ลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด (ภาพที่ 21, 22, 25 และ 26) ซึ่งมีรายงานว่าสารกำจัดวัชพืชในกลุ่ม nitrodiphenylether (NDPE) จะไปมีผลยับยั้งเอนไซม์ protoporphyrinogen-oxidase (PPG-oxidase) ในกระบวนการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ (tetrapyrrol synthesis) โดยถ้าเอนไซม์ PPG-oxidase ถูกยับยั้งจะทำให้การสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ลดลง นอกจากนี้ยังจะนำไปสู่การเกิด singlet oxygen-generating protoporphyrin IX (PPIX) ซึ่ง PPIX นี้เมื่อได้รับแสงจะเกิดปฏิกิริยา photooxidation และจะไปทำลาย tetrapyrrol ตัวอื่นๆ อย่างรวดเร็ว ซึ่งจะทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลง นอกจากนี้สารกำจัดวัชพืช เช่น difunon, fluridone, dichlomate, methoxyphenone จะไปมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ desaturase ในกระบวนการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ (carotenoid biosynthesis) โดยอาจจะยับยั้งที่เอนไซม์ phytoene desaturase หรือ ζ-carotene desaturse หรือทั้ง

สองชนิด โดยผลที่เกิดขึ้นจะทำให้ปริมาณของแคโรทีนอยด์ลดลง (Devine *et al*., 1993) ซึ่งสารสกัดจาก *H. fontinalis* อาจจะไปมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ จึงทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ของไมยราบยักษ์และผักกาดเขียวปลีลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Kim *et al*. (2002) ที่พบว่าสารกำจัดวัชพืช diuron, fluridone หรือ sulcotrione ส่งผลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ลดลง และสารกำจัดวัชพืช SAN 9789 มีผลยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ และรบกวนการสร้างเยื่อหุ้มของพลาสทิด (plastid membrane) (Frosch *et al*., 1979) และสารกำจัดวัชพืช เช่น สาร amitrol, norflurazon, pyridazinones และ clomazone จัดเป็นสารยับยั้งการสร้างรงควัตถุ (pigment synthesis inhibitor) ได้แก่ คลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ ซึ่งการยับยั้งการสร้างแคโรทีนอยด์ จะส่งผลต่อการลดประสิทธิภาพของการสังเคราะห์แสง และทำให้เกิดกระบวนการ photooxidation ขึ้น (ทศพล, 2545) แต่ในหญ้ายาง พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ส่งผลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และคลอโรฟิลล์ทั้งหมดลดลง แต่ปริมาณแคโรทีนอยด์กลับเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 23 และ 24) โดยสอดคล้องกับการทดลองของ Moharekar *et al*. (2003) ซึ่งศึกษาผลของ salicylic acid (SA) ต่อต้นกล้าข้าวสาลีและ moong พบว่า SA ส่งผลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลง แต่ปริมาณแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น ซึ่งโดยปกติแล้วนอกจากแคโรทีนอยด์จะมีหน้าที่ในการดูดกลืนแสงในกระบวนการสังเคราะห์แสงแล้ว ยังมีหน้าที่สำคัญอีกประการหนึ่ง คือ photoprotection คือ ป้องกันระบบการสังเคราะห์แสงจากการทำลายของ photooxidation (Hopkin and Huner, 2004) โดยแคโรทีนอยด์จะไปกำจัดพิษของ triplet chlorophyll และ singlet oxygen และ ROS ตัวอื่นๆ ดังนั้นถ้ามีการทำลายแคโรทีนอยด์ จะทำให้เกิดปฏิกิริยา photooxidation มากขึ้น (Choudhury and Behera, 2001) ในสภาวะปกติของกระบวนการสังเคราะห์แสง คลอโรฟิลล์เมื่อได้รับพลังงานจะถูกกระตุ้นจากสถานะพื้น (ground state) ไปอยู่ในสถานะเร้า (excited state) ($^1Chl \rightarrow {}^1Chl^* \rightarrow {}^3Chl^*$) โดยที่ singlet chlorophyll จะถ่ายทอดหนึ่งอิเล็กตรอนให้ plastoquinone (PQ) และจะมีเบต้าแคโรทีน (β-carotene) ซึ่งเป็นแคโรทีนอยด์ชนิดหนึ่ง จะไปทำปฏิกิริยากับ $^3Chl^*$ อย่างรวดเร็วได้กลับมาเป็นคลอโรฟิลล์สถานะพื้น ($^3Chl^* + {}^1Car \rightarrow {}^1Chl + {}^3Car^*$, $^3Car^* \rightarrow {}^1Car$ + พลังงานความร้อน) เพื่อไม่ให้มี $^3Chl^*$ ที่มากเกินไป เนื่องจาก $^3Chl^*$ จะไปทำปฏิกิริยากับออกซิเจน ($^3O_2$) ได้เป็น singlet excited O_2 ($^1O_2$) ($^3Chl^* + {}^3O_2 \rightarrow {}^1Chl + {}^1O_2$) ซึ่ง $^1O_2$ นี้จะมีความสามารถในการทำลายรงควัตถุ (pigment bleaching) และการเกิด lipid peroxidation โดย $^1O_2$ นี้สามารถเกิดขึ้นได้ในสภาวะแวดล้อมปกติ ซึ่งพืชก็มีกลไกในการกำจัดพิษของ $^1O_2$ โดย α-tocopherol หรือ β-carotene จะเข้าทำปฏิกิริยากับ $^1O_2$ อย่างรวดเร็วเกิดเป็น $^3O_2$ ($^1Car + {}^1O_2 \rightarrow {}^3Car^* + {}^3O_2$) (Halliwell and Gutteridge, 1989; Devine *et al*., 1993) ฉะนั้นการที่ปริมาณแคโรทีนอยด์ของหญ้ายางเพิ่มขึ้น ก็

อาจจะเพื่อไปกำจัดพิษของ ROS ที่เพิ่มขึ้น แต่ว่าอาจจะไม่มากพอ ปริมาณคลอโรฟิลล์จึงยังลดลง หรือในอีกทางหนึ่งการลดลงของคลอโรฟิลล์อาจจะเนื่องมาจากสารสกัดจาก *H. fontinalis* ส่งผลยับยั้งการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ เช่นเดียวกับในกรณีของหญ้ารังนกที่พบว่าเมื่อได้รับสารสกัดจาก *H. fontinalis* ส่งผลให้ปริมาณแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น แต่ปริมาณคลอโรฟิลล์มีแนวโน้มไม่เปลี่ยนแปลง (ภาพที่ 29 และ 30) ซึ่งในกรณีนี้ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่เพิ่มขึ้นอาจจะมากพอที่จะไปกำจัดพิษของ ROS จึงทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์มีแนวโน้มที่ไม่เปลี่ยนแปลง สำหรับกรณีของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 พบว่า สารสกัดด้วยน้ำความเข้มข้น 100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์เท่านั้นที่ทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ บี และคลอโรฟิลล์ทั้งหมดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนปริมาณแคโรทีนอยด์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่มีแนวโน้มลดลง (ภาพที่ 31 และ 32) ซึ่งสารสกัดจาก *H. fontinalis* อาจจะส่งผลยับยั้งที่กระบวนการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์เท่านั้น ส่วนกรณีของถั่วเหลือง พบว่า ปริมาณคลอโรฟิลล์ และแคโรทีนอยด์มีแนวโน้มที่ไม่เปลี่ยนแปลง แสดงว่าถั่วเหลืองมีความต้านทานต่อสารสกัดจาก *H. fontinalis* (ภาพที่ 27 และ 28)

เมื่อพิจารณาที่ตัวทำละลาย พบว่า สารสกัดด้วยน้ำกลั่นมีผลต่อปริมาณคลอโรฟิลล์ของไมยราบยักษ์ หญ้ายาง ผักกาดเขียวปลี และข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (ตารางที่ 9, 10, 11 และ 14) และปริมาณแคโรทีนอยด์ของไมยราบยักษ์ หญ้ายาง และหญ้ารังนก (ตารางที่ 9, 10 และ 13) ขณะที่สารสกัดด้วยเมทานอลจะส่งผลต่อปริมาณคลอโรฟิลล์ของผักกาดเขียวปลี (ตารางที่ 11) และปริมาณแคโรทีนอยด์ของไมยราบยักษ์ ผักกาดเขียวปลี และหญ้ารังนก (ตารางที่ 9, 11 และ 13) ซึ่งสารสกัดทั้งสองชนิดส่งผลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ในพืชลดลง แต่ปริมาณแคโรทีนอยด์จะเพิ่มขึ้นหรือลดลงขึ้นอยู่กับชนิดของพืช โดยที่สารสกัดด้วยน้ำมีแนวโน้มที่ส่งผลกระทบต่อพืชมากกว่าสารสกัดด้วยเมทานอล

<u>ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ต่อกระบวนการ ammonia assimilation</u>

กระบวนการ ammonia assimilation เป็นกระบวนการที่พืชใช้ในการเปลี่ยนแอมโมเนียเป็นสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจน เนื่องจากการสะสมแอมโมเนียที่มากเกินไปในพืช จะทำให้พืชแสดงอาการผิดปกติหรือตายได้ (Hopkins, 1999) โดยจากผลการทดลองนี้ พบว่า มีการสะสมแอมโมเนียในไมยราบยักษ์ หญ้ายาง ผักกาดเขียวปลี หญ้ารังนก และข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เพิ่มขึ้น เมื่อได้รับสารสกัดความเข้มข้นสูงขึ้น (ภาพที่ 33, 34, 35, 37 และ 38) โดยสาเหตุสำคัญน่าจะมาจากสารสกัดจาก *H. fontinalis* ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ GS ในกระบวนการ ammonia

assimilation จึงทำให้เกิดการสะสมแอมโมเนียซึ่งเหมือนกับสารกำจัดวัชพืชในกลุ่ม phosphinic acid เช่นสาร glufosinate, bialaphos , methionine sulfoximine และ tabtoxinine-β-lactam ที่จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ GS และทำให้เกิดการสะสมแอมโมเนียในพืช ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้พืชตาย (ทศพล, 2545; Devine *et al*., 1993) และ Fentem *et al*. (1983) พบว่า methionine sulfoximine (MSO) ซึ่งเป็นสารยับยั้งกระบวนการ ammonia assimilation จะไปมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ GS จึงทำให้มีผลต่อการสะสมแอมโมเนียในรากของข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare* L.)

จากผลการทดลองนี้จะเห็นว่า สารสกัดด้วยน้ำและเมทานอลส่งผลแตกต่างกันต่อการสะสมแอมโมเนียที่ลำต้นและราก ดังนี้ ในไมยราบยักษ์ พบว่า สารสกัดด้วยน้ำจะมีผลทั้งส่วนลำต้นและราก ขณะที่สารสกัดด้วยเมทานอลมีผลกับรากเท่านั้น สำหรับหญ้ายาง หญ้ารังนก และข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 พบว่ามีเพียงสารสกัดด้วยน้ำกลั่นเท่านั้นที่มีผลต่อการสะสมแอมโมเนียที่ลำต้นและราก และกรณีของผักกาดเขียวปลีมีเพียงสารสกัดด้วยเมทานอลเท่านั้นที่มีผลต่อการสะสมแอมโมเนียที่ลำต้น ซึ่ง Chien *et al*. (2000) พบว่าเอนไซม์ GS จะมี 2 รูปแบบ (isoform) ได้แก่ cytosolic form (GS1) และ chloroplastic form (GS2) ซึ่ง GS ทั้งสองรูปแบบจะพบในได้ในไซโทพลาสซึมและพลาสติด โดยตำแหน่งและอัตราส่วนจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับรูปแบบและชนิดของเซลล์และพืช โดยที่ในเนื้อเยื่อที่มีสีเขียวมักจะพบ chloroplastic form (Devine *et al*., 1993) GS1 จึงพบในไซโทซอล (cytosol) ส่วน GS2 จะพบใน plastid (Tobin and Yamaya, 2001) เอนไซม์ GS จึงพบได้ในคลอโรพลาสต์และไซโทซอลของเซลล์ใบ และในไซโทซอลของเซลล์ราก (ศรีสม, 2549 ข) ฉะนั้นสารที่สกัดจาก *H. fontinalis* ด้วยน้ำและเมทานอลอาจจะยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ GS คนละรูปแบบกัน โดยที่สารสกัดด้วยน้ำจาก *H. fontinalis* ซึ่งสามารถเคลื่อนย้ายจากลำต้นไปสู่รากได้ อาจจะมีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ GS ทั้งบริเวณลำต้นและราก จึงมีการสะสมแอมโมเนียเพิ่มขึ้นทั้งส่วนลำต้นและรากของไมยราบยักษ์ หญ้ายาง หญ้ารังนก และข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ขณะที่สารสกัดด้วยเมทานอล อาจจะมีผลยับยั้งเอนไซม์ GS ที่บริเวณรากของไมยราบยักษ์เท่านั้น และกรณีของผักกาดเขียวปลี พบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลอาจจะมีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ GS ที่บริเวณลำต้นเท่านั้น หรือสารสกัดอาจไม่มีการเคลื่อนย้ายไปสู่บริเวณราก จึงทำให้ไม่มีการสะสมแอมโมเนียที่ราก สำหรับถั่วเหลือง พบว่าไม่มีการสะสมของแอมโมเนียทั้งส่วนลำต้นและราก แสดงว่าถั่วเหลืองมีความต้านทานต่อสารสกัด และกรณีของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 พบว่ามีการสะสมปริมาณแอมโมเนียในชุดควบคุม จึงวัดปริมาณแอมโมเนียได้ตั้งแต่ตัวอย่างพืชที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้น 0-100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตรทั้งสารสกัดด้วยน้ำและเมทานอล (ตารางที่ 20 และภาพที่ 38) โดยที่ข้าวไม่แสดงอาการผิดปกติแต่อย่างใด ทั้งที่แอมโมเนียมีความเป็นพิษกับ

พืช มีรายงานว่าข้าวจะใช้แอมโมเนียม (ammonium) เป็นแหล่งของไนโตรเจน แต่แอมโมเนียมจะถูกเก็บหรือมีการเคลื่อนย้ายได้น้อยมาก เนื่องจากปัญหาที่จะเกิดความเป็นพิษกับพืช จึงมีการ assimilated ในรากเพื่อเปลี่ยนเป็นกลูตามีนก่อนแล้วจึงเคลื่อนย้ายผ่ายไซเลมไปที่ยอด ซึ่งพืชที่ใช้แอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจนจะมีประสิทธิภาพของกลไก ammonium assimilation มากที่ราก (Tobin and Yamaya, 2001) ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ที่มีการสะสมแอมโมเนียในชุดควบคุม นอกจากบทบาทของเอนไซม์ GS แล้ว ยังมีอีกกลไกหนึ่งโดยใช้เอนไซม์ GDH ในกระบวนการ ammonia assimilation แต่เนื่องจากกลไกหลักในกระบวนการ ammonia assimilation เป็นกิจกรรมของเอนไซม์ GS/GOGAT ผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ GDH จึงมีการศึกษายังไม่มากนัก แต่มีรายงานว่า GDH ต้องการพลังงานน้อยกว่า GS จึงอาจจะมีประสิทธิภาพในกระบวนการ ammonia assimilation สูงกว่าเมื่ออยู่ในสภาวะเครียด (Nguyen *et al*., 2005)

จากผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกันต่อผลของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส กระบวนการ lipid peroxidation รงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสง และกระบวนการ ammonia assimilation สามารถกล่าวโดยรวมได้ดังนี้

Oxidative stress เป็นสภาวะเครียดที่เกิดจาก ROS โดยที่ ROS สามารถเกิดเพิ่มขึ้นได้โดยผลจากสภาวะเครียดชนิดต่างๆ เช่น อุณหภูมิสูงหรือต่ำเกินไป สภาวะขาดน้ำ ความเค็ม แสง UV และโอโซน เป็นต้น ซึ่งการสะสมของ ROS นี้จะเป็นอันตรายต่อพืช โดยจะไปออกซิไดซ์สารชีวโมเลกุล อาทิ DNA โปรตีน และไขมัน (Breusegem *et al*., 2001) ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการเสื่อมสลายของโปรตีน ทำให้เอนไซม์เสียสภาพในการทำงาน การเสื่อมสลายของคลอโรฟิลล์ และการเกิด lipid peroxidation (Inzé and Montagu, 2002) นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการแบ่งเซลล์ โดย ROS เป็นตัวการสำคัญในการยับยั้งวัฏจักรเซลล์ในพืช โดย ROS จะส่งผลต่อการเปลี่ยนระยะจาก G_1 เป็น S และทำให้การสังเคราะห์ DNA ช้าลง ซึ่งจะทำให้กระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสช้าลงไปด้วย ซึ่งการยับยั้งวัฏจักรของเซลล์นี้ เกี่ยวข้องกับการยับยั้งกิจกรรมของ cyclin-dependent kinase (CDK) (Breusegem *et al*., 2001) มีการทดลองในเซลล์แขวนลอยของยาสูบ โดยให้แสง fluorescence ที่ความเข้มข้นสูงซึ่งจะชักนำให้เกิด ROS และจะไปยับยั้งการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (Dixit and Cyr, 2003) และมีการใช้ menadione ชักนำให้เกิด oxidative stress ซึ่งพบว่า menadione ที่ความเข้มข้นต่ำ (25-50 μM) จะรบกวนการเปลี่ยนระยะจาก G_1 ไปเป็น S ทำให้การสังเคราะห์ DNA ช้าลง ซึ่งทำให้การเข้าสู่กระบวนการไมโทซิสช้าลง และมีการทดลองกับต้นกล้าของยาสูบ

พบว่า oxidative stress ยับยั้งการแบ่งเซลล์ที่ปลายราก โดยส่งผลสำคัญต่อวัฏจักรของเซลล์ โดยจะทำให้เซลล์หยุดที่ระยะ G_1 และ G_2 และส่งผลไปลดค่า mitotic index อีกด้วย (Reichheld *et al*., 1999) จากการทดลองนี้ พบว่า สารสกัดจาก *H. fontinalis* มีผลยับยั้งการแบ่งเซลล์ที่ปลายราก ซึ่งอาจจะเป็นผลเนื่องมาจาก oxidative stress เพราะว่าสารสกัดจาก *H. fontinalis* ส่งผลในการเกิด oxidative stress ในพืชหลายชนิดที่นำมาทดลอง จึงอาจจะมีผลในการเกิด oxidative stress ในหอมได้ ซึ่งมีการทดลองของ Senevas *et al*. (2006b) พบว่าสารสกัดจาก *Hapalosiphon* sp. ส่งผลให้เกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ในรากของข้าวสาลี (*Triticum aestivum*) และเพิ่มการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ทั้งในลำต้นและรากของหอม (*A. cepa*) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด และเกิดการแตกหักของ DNA (DNA fragmentation) ที่รากหอม ซึ่งเกิดจากสารสกัดจาก *Hapalosiphon* sp. ชักนำให้เกิดการสะสมของ ROS ที่รากหอม

นอกจากนี้ Chien *et al*. (2000) พบว่า การลดลงของกิจกรรมของเอนไซม์ GS และปริมาณการสะสมแอมโมเนียมไอออนที่เพิ่มขึ้นในใบข้าว เป็นผลสืบเนื่องมาจากการเกิด oxidative stress ซึ่งเกิดจากการได้รับแคดเมียมที่มากเกินไป โดยพบว่าการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation จะเกิดก่อนการสะสมของแอมโมเนียมไอออนและการลดลงของเอนไซม์ GS และพบว่า paraquat ซึ่งเป็นสารกำจัดวัชพืช สามารถเพิ่มปริมาณ MDA และแอมโมเนียมไอออน และในขณะเดียวกันก็มีผลไปลดกิจกรรมเอนไซม์ GS ในใบข้าวเช่นกัน และมีการทดลองว่า salt stress ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งในการเกิด oxidative stress จะไปมีผลกระทบต่อ photosynthetic electron flux ที่จำเป็นสำหรับการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ GS และภายใต้ salt stress จะทำให้เกิด ROS มากขึ้น จนเกินภาวะสมดุลภายในพืช ซึ่ง HO• นี้จะไปทำปฏิกิริยากับส่วนของ histidine และ cysteine ทำให้เกิดการออกซิไดซ์เอนไซม์ GS ซึ่งจะทำให้เอนไซม์เสียสภาพในการทำงาน และง่ายต่อการถูก proteolysis (Ortega *et al*., 1999; Debouba *et al*., 2006) จากการทดลองนี้ พบว่า เมื่อเกิดปฏิกริยา lipid peroxidation มักจะเกิดการสะสมปริมาณแอมโมเนียในพืชด้วย ซึ่งจะพบในไมยราบยักษ์ (ตารางที่ 3 และ 15) หญ้ายาง (ตารางที่ 4 และ 16) และหญ้ารังนก (ตารางที่ 7 และ 19) โดยที่สารสกัดด้วยน้ำของ *H. fontinalis* จะทำให้เกิดกระบวนการ lipid peroxidation ทั้งส่วนลำต้นและราก และจะมีการสะสมปริมาณแอมโมเนียทั้งส่วนลำต้นและรากด้วย ในขณะที่ถั่วเหลือง (ตารางที่ 6 และ 18) เมื่อไม่เกิดกระบวนการ lipid peroxidation ก็จะไม่มีการสะสมปริมาณแอมโมเนีย แต่ในกรณีของผักกาดเขียวปลี สารสกัดด้วยน้ำทำให้เกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation เท่านั้น ไม่มีการสะสมของปริมาณแอมโมเนีย (ตารางที่ 5 และ 17) ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากกลไกที่แตกต่างกันออกไปในพืชแต่ละชนิด หรือผักกาดเขียวปลีอาจมีกลไกควบคุมหรือกำจัด ROS ก่อนที่จะชักนำให้มีการสะสมแอมโมเนีย

ขณะที่ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 สารสกัดด้วยน้ำไม่ก่อให้เกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation แต่ทำให้มีการสะสมแอมโมเนียของทั้งส่วนลำต้นและราก (ตารางที่ 8 และ 20) และสารสกัดด้วยเมทานอลจะส่งผลแตกต่างกันออกไป คือทำให้เกิดการสะสมของปริมาณแอมโมเนีย แต่ไม่เกิดกระบวนการ lipid peroxidation ในไมยราบยักษ์และผักกาดเขียวปลี หรือเกิดเพียงแต่ปฏิกิริยา lipid peroxidation แต่ไม่มีการสะสมแอมโมเนียในหญ้ายาง ซึ่งอาจจะเนื่องจากสารออกฤทธิ์ที่สกัดด้วยน้ำและเมทานอลเป็นสารที่มีความแตกต่างกัน จึงมีผลต่อพืชแตกต่างกัน ซึ่งสารสกัดด้วยเมทานอลอาจจะไม่ทำให้เกิด oxidative stress ในไมยราบยักษ์และผักกาดขียวปลี แต่อาจจะมีผลกระทบต่อกลไกอื่นในการทำให้มีการสะสมแอมโมเนียเพิ่มขึ้น เช่นกระบวนการ photorespiration เนื่องจากในพืช C_3 กระบวนการ photorespiration จะเป็นแหล่งปล่อยแอมโมเนีย และภายใต้สภาวะเครียดจะทำให้เกิดกระบวนการ photorespiration เพิ่มขึ้น ปริมาณแอมโมเนียก็เพิ่มขึ้น (Nguyen *et al*., 2005)

Calatayud and Barreno (2004) ทดลองผลกระทบของโอโซน (O_3) ต่อผักกาดหอม (*Lactuca sativa* L.) สองสายพันธุ์ คือ Valladolid และ Morella พบว่า เกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ที่ใบผักกาดทั้งสองสายพันธุ์ และปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดลดลงในสายพันธุ์ Valladolid แต่ไม่แตกต่างในสายพันธุ์ Morella โดยแคโรทีนอยด์จัดเป็นสาร antioxidant สำหรับขจัดพิษของ singlet oxygen และลดระดับพลังงานของคลอโรฟิลล์เอ (de-exciting chlorophyll a) ซึ่งการลดลงของปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์นี้จะทำให้ปริมาณ MDA เพิ่มขึ้น ซึ่งก็หมายถึงเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation เพิ่มขึ้น นอกจากนี้สารกำจัดวัชพืช chlorimuron-ethyl ชักนำให้เกิด oxidative stress โดยการเพิ่มปริมาณของ Chlorimuron-ethyl ในใบและรากของข้าวสาลี ซึ่งหลังจากได้รับสาร 1 วัน จะทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลง (Wang and Zhou, 2006) Panda *et al*. (2003) พบว่า Zn และ Cr ชักนำให้เกิดอนุมูลอิสระ (free radicals) ในใบของข้าวสาลี ซึ่งมีผลทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ลดลง และส่งผลให้ปริมาณของ MDA เพิ่มขึ้น และ chrysolite asbestos ส่งผลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ลดลง และเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation เพิ่มขึ้นใน *Lemna gibba* (Trivedi *et al*., 2004) จากที่ได้กล่าวมาแล้วว่า ROS จะไปออกซิไดซ์ไขมัน โดยทำให้เกิดกระบวนการ lipid peroxidation ซึ่งเมื่อเกิดกระบวนการนี้แล้วจึงส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย เซลล์หรือออแกเนลล์นั้นก็จะเสื่อมสลายไปด้วย ดังนั้นจึงส่งผลต่อออแกเนลล์ต่างๆ ที่มีเยื่อหุ้มเซลล์ รวมถึงคลอโรพลาสต์ด้วย ซึ่งการเกิด lipid peroxidation เกี่ยวข้องกับทั้งการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ เนื่องจากเมื่อเกิด lipid peroxidation จะไปทำลายเยื่อหุ้มเซลล์และมีผลต่อหน้าที่ของเซลล์นั้น ซึ่งจะเกิดขึ้นในพืชภายใต้สภาวะเครียด และจะเกี่ยวข้องกับการเกิด bleaching

ของคลอโรฟิลล์ (Takeuchi *et al*., 1995) โดยจากผลการทดลองนี้ พบว่า ในไมยราบยักษ์ (ตารางที่ 3 และ 9) และผักกาดเขียวปลี (ตารางที่ 5 และ 11) เมื่อเกิดกระบวนการ lipid peroxidation จะมีแนวโน้มที่คลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี คลอโรฟิลล์ทั้งหมด และแคโรทีนอยด์ลดลง โดยที่อาจจะเมื่อมีการสะสม ROS ขึ้นภายในต้นพืช จะไปทำให้เกิดกระบวนการ lipid peroxidation ที่เยื่อหุ้มของคลอโรพลาสต์ ทำให้คลอโรพลาสต์ถูกทำลาย ซึ่งก็จะส่งผลถึงรงควัตถุที่อยู่ภายในคลอโรพลาสต์ คือ คลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ให้ลดลงตามไปด้วย แต่ในหญ้ายาง พบว่า เมื่อเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation จะมีแนวโน้มที่คลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และคลอโรฟิลล์ทั้งหมดลดลง แต่ปริมาณแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น เมื่อสารสกัดความเข้มข้นสูงขึ้น ซึ่งแคโรทีนอยด์จัดเป็นสาร antioxidant molecule ชนิดหนึ่งที่มีความสามารถในการกำจัดพิษของ ROS ดังนั้นปริมาณแคโรทีนอยด์ที่เพิ่มขึ้นก็เพื่อที่จะมากำจัดพิษของ ROS แต่คงไม่มากพอที่ทำให้ ROS อยู่ในภาวะสมดุลหรือหมดไป สำหรับกรณีของหญ้ารังนก พบว่า เมื่อเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ปริมาณแคโรทีนอยด์จะเพิ่มขึ้น ซึ่งปริมาณแคโรทีนอยด์ที่เพิ่มขึ้นนี้ อาจจะมากพอที่กำจัดพิษของ ROS จึงมีแนวโน้มทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และคลอโรฟิลล์ทั้งหมดไม่แตกต่างจากชุดควบคุม แต่ในพืชบางชนิด คือ ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 สารสกัดด้วยน้ำไม่ก่อให้เกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation แต่ปริมาณคลอโรฟิลล์กลับลดลง โดยอาจจะเนื่องมาจากกลไกอื่น เช่น สารสกัดจาก *H. fontinalis* ไปยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

โดยรวมแล้ว สารสกัดจาก *H. fontinalis* อาจจะส่งผลให้เกิด oxidative stress โดยวัดจากการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation โดยอาจจะมีผลเกี่ยวเนื่องไปถึงการแบ่งเซลล์ การลดลงของรงควัตถุ ได้แก่ คลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี คลอโรฟิลล์ทั้งหมด และแคโรทีนอยด์ และการสะสมแอมโมเนีย โดยที่พืชแต่ละชนิดที่นำมาทดลองก็มีการตอบสนองที่แตกต่างกัน บางชนิดสารสกัดจาก *H. fontinalis* มีผลต่อกระบวนการหนึ่ง แต่ไม่มีผลต่ออีกกระบวนการหนึ่ง หรือบางชนิดมีผลต่อทุกกระบวนการ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าพืชแต่ละชนิดมีความต้านทานต่อสารสกัดจาก *H. fontinalis* ได้แตกต่างกัน เนื่องจากพืชแต่ละชนิดนอกจากจะมีคุณสมบัติทั้งทางด้านสรีรวิทยาและเคมีที่แตกต่างกัน ซึ่งในบางกรณีถึงแม้จะเป็นพืชชนิดเดียวกันแต่มีอายุแตกต่างกันจะมีผลตอบสนองต่อสารเคมีไม่เหมือนกัน ลักษณะการตอบสนองต่อสารกำจัดวัชพืชหรือสารเคมี อาจเกิดจากความแตกต่างของอายุพืช รูปร่างและสรีรวิทยาของพืชและกระบวนการทางชีวเคมีภายในพืช (พรชัย, 2531) โดยนอกจากที่สารสกัดจาก *H. fontinalis* จะมีผลต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาภายในต้นพืชแล้ว ยังมีผลต่อการแสดงอาการผิดปกติทางลักษณะภายนอกอีกด้วย ที่ชัดเจนที่สุดคือไมยราบยักษ์ โดยเมื่อได้รับสารสกัดความเข้มข้นสูงขึ้น ต้นพืชจะแสดงอาการเหี่ยวแห้งและมีจำนวนการตายมาก

ขึ้น (ภาพที่ 39 และ 40) และหญ้ายาง เมื่อได้รับสารสกัดความเข้มข้นสูงขึ้น จะแสดงอาการที่ใบ คือ ใบจะเหี่ยว (ภาพที่ 41 และ 42) โดยลักษณะอาการที่สังเกตได้ชัดเจนนี้มักจะเกิดกับต้นพืชที่ได้รับการฉีดพ่นจากสารสกัดด้วยน้ำ สำหรับพืชชนิดอื่นอันได้แก่ ผักกาดเขียวปลี (ภาพที่ 43 และ 44) ถั่วเหลือง (ภาพที่ 45 และ 46) หญ้ารังนก (ภาพที่ 47 และ 48) และข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (ภาพที่ 49 และ 50) มักไม่แสดงหรือแสดงลักษณะผิดปกติน้อยหรือไม่ชัดเจน นอกจากนี้ยังจัดได้ว่าถั่วเหลืองเป็นพืชชนิดที่ทนทานต่อสารสกัดจาก *H. fontinslis* ได้มากกว่าพืชชนิดอื่นที่นำมาทดสอบ

เมื่อพิจารณาตัวทำละลาย การทดลองนี้ได้มีการใช้ตัวทำละลายสองชนิด คือน้ำกลั่นและเมทานอล ในการสกัดสารจาก *H. fontinalis* ซึ่งตัวทำละลายทั้งสองชนิดนี้จัดเป็นตัวทำละลายที่มีขั้ว แต่น้ำเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วสูงกว่าเมทานอล (Reichardt, 2003) ดังนั้นสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่ใช้ในการทดลองนี้จึงน่าจะมีส่วนของสารที่มีขั้วมากกว่าสารที่ไม่มีขั้ว โดยที่สารสกัดด้วยเมทานอลจะมีส่วนของสารที่ไม่มีขั้วมากกว่าสารสกัดด้วยน้ำ ซึ่งจากผลการทดลอง พบว่าสารสกัดด้วยน้ำมีแนวโน้มยับยั้งการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส การเกิด lipid peroxidation การลดลงของรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสง และการสะสมแอมโมเนียในกระบวนการ ammonia assimilation ได้มากกว่าสารสกัดด้วยเมทานอล แสดงว่าสารออกฤทธิ์ที่มีผลกระทบต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาเหล่านี้น่าจะเป็นสารที่มีขั้ว

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. สารสกัดจาก *H. fontinalis* ส่งผลยับยั้งการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสที่ปลายรากหอม โดยที่สารสกัดด้วยน้ำกลั่นและเมทานอลส่งผลต่อการแบ่งเซลล์ไม่แตกต่างกัน

2. สารสกัดจาก *H. fontinalis* ส่งผลต่อการเกิด lipid peroxidation ในไมยราบยักษ์ หญ้ายางผักกาดเขียวปลี และหญ้ารังนก ทั้งส่วนลำต้นและราก ซึ่งเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด มีผลให้ปริมาณ MDA เพิ่มขึ้น โดยที่สารสกัดด้วยน้ำกลั่นมีประสิทธิภาพในการก่อให้เกิด oxidative stress ได้ดีกว่าสารสกัดด้วยเมทานอล

3. สารสกัดด้วยน้ำกลั่นจาก *H. fontinalis* เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด ส่งผลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ และแคโรทีนอยด์ของไมยราบยักษ์ลดลง และปริมาณคลอโรฟิลล์ของหญ้ายางผักกาดเขียวปลี และข้าวลดลง และปริมาณแคโรทีนอยด์ของหญ้ายางและหญ้ารังนกเพิ่มขึ้น ส่วนสารสกัดด้วยเมทานอล ส่งผลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ของผักกาดเขียวปลีลดลง และปริมาณของหญ้ารังนกเพิ่มขึ้น

4. สารสกัดจาก *H. fontinalis* ด้วยน้ำกลั่นที่ความเข้มข้นสูง ส่งผลให้ปริมาณแอมโมเนียในลำต้นและรากของไมยราบยักษ์ หญ้ายางและหญ้ารังนก และข้าวเพิ่มขึ้น และสารสกัดด้วยเมทานอล เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดส่งผลให้ปริมาณแอมโมเนียของรากไมยราบยักษ์ และลำต้นผักกาดเขียวปลีเพิ่มขึ้น โดยที่สารสกัดด้วยน้ำกลั่นและเมทานอลส่งผลต่อบริเวณที่มีการสะสมแอมโมเนียในพืชแต่ละชนิดแตกต่างกัน

5. สารสกัดด้วยน้ำกลั่นและเมทานอลจาก *H. fontinalis* จะส่งผลแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิดต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาต่างๆ ที่ทดสอบ โดยที่สารสกัดด้วยน้ำกลั่นมีแนวโน้มที่ส่งผลกระทบต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาได้มากกว่าสารสกัดด้วยเมทานอล

6. พืชแต่ละชนิดที่นำมาทดลองมีการตอบสนองต่อสารสกัดจาก *H. fontinalis* แตกต่างกัน โดยที่ถั่วเหลืองมีทนทานต่อสารสกัดมากที่สุด

ข้อเสนอแนะ

1. การทดสอบผลของสารสกัดด้วยวิธีการฉีดพ่นควรจะมีการเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดให้สูงมากขึ้น หรือเพิ่มจำนวนครั้งในการฉีดพ่นสารสกัดเพิ่มมากขึ้น เพื่อจะได้เห็นผลชัดเจนขึ้น

2. แนวทางการศึกษาต่อไปควรมีการทดลองในสภาพแปลงของจริงในธรรมชาติ เพื่อจะได้ทดสอบดูว่าสารสกัดมีผลในสภาพแปลงหรือไม่ อย่างไร โดยถ้าจะเลือกใช้ตัวทำละลาย ควรจะเลือกใช้น้ำกลั่นเป็นตัวสกัดสาร เนื่องจากหาได้ง่ายและราคาถูกกว่าเมทานอล นอกจากนี้สารสกัดด้วยน้ำมีแนวโน้มส่งผลต่อกระบวนการสรีรวิทยาในพืชมากกว่าสารสกัดด้วยเมทานอล และควรมีการทดลองใช้ตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วในการสกัดสาร เพื่อจะได้ทราบว่าสารออกฤทธิ์จาก *H. fontinalis* เป็นสารที่ไม่มีขั้วหรือไม่

การนำไปใช้

งานวิจัยนี้เป็นพื้นฐานในการที่จะประยุกต์ใช้สารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรีย *H. fontinalis* เพื่อเป็นสารควบคุมหรือกำจัดวัชพืชที่มีประสิทธิภาพต่อไป

อุปสรรคของงานวิจัย

1. ในช่วงการทดลอง มีการระบาดของหนูภายในเรือนเพาะชำที่ใช้ปลูกพืช ทำให้ไม่สามารถปลูกข้าวภายในเรือนเพาะชำได้ สภาพแวดล้อมที่ใช้ในการปลูกข้าวจึงอาจจะแตกต่างจากพืชชนิดอื่น ซึ่งอาจจส่งผลต่อผลการทดลองได้

2. ความไม่สมบูรณ์ของเครื่องมือ ได้แก่ เครื่อง spectrophotometer ซึ่งทำให้เกิดความล่าช้าในการวัดค่าการดูดกลืนแสง

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กวิยา เรือนจันทร์. 2548. **ผลของสารชีวภาพจากสารสกัดและอาหารเลี้ยง *Hapalosiphon* sp. ต่อการเติบโตและผลผลิตของพืชบางชนิดในสภาพไร่**. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

คณาจารย์ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2544. **พันธุศาสตร์ปฏิบัติการ**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ณรงค์ วงศ์กันทรากร. 2548. **ผลของสารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon fontinalis* (Ag.) Bornet TISTR 8437 ต่อการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงและการงอกของเมล็ด**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ณัฏฐา เสนีวาส. 2543. **ผลของสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในสกุล *Scytonema* sp. และ *Hapalosiphon* sp. ต่อการเจริญเติบโตของวัชพืชและพืชปลูกบางชนิด**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ทศพล พรพรหม. 2545. **สารกำจัดวัชพืช: หลักการและกลไกการทำลาย**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

นิตย์ศรี แสงเดือน. 2528. **พันธุศาสตร์พืช**. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

เปรมทิพย์ ธนรุ่งเรืองกิจ. 2547. **ผลของสารชีวภาพจากอาหารเลี้ยง *Hapalosiphon* sp. ต่อการงอกและการเจริญเติบโตของวัชพืชและพืชปลูกบางชนิด**. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พรชัย เหลืองอาภาพงศ์. 2531. **สารกำจัดวัชพืช**. เชียงใหม่คอมฟิวกราฟฟิค, เชียงใหม่.

พรรณี ชิโนรักษ์. 2545. **พันธุศาสตร์**. พิมพ์ครั้งที่ 2. ศิลปาบรรณาคาร, กรุงเทพฯ.

เพ็ญนภา จำปาศรี. 2547. **ผลของสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Hapalosiphon* sp. ต่อการเจริญเติบโตของพืชบางชนิด**. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รังสิต สุวรรณเขตนิคม. 2531. **สารกำจัดวัชพืชและผลทางสรีรวิทยาของพืช เล่ม 1 พื้นฐานการเลือกทำลาย**. จงเจริญการพิมพ์, กรุงเทพฯ.

ลิลลี่ กาวีต๊ะ. 2546. **การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานและพัฒนาการของพืช**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วิสุทธิ์ ใบไม้. 2527. **พันธุศาสตร์**. มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.

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

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

สุภาพร พันจี. 2544. **อิทธิพลของสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (*Sytonema* sp. TISTR 8208 และ *Hapalosiphon* sp) ต่อการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสง**. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อภิวัฒน์ ไชยะ. 2548. **ผลของสารชีวภาพจากสารสกัดและอาหารเลี้ยง *Hapalosiphon* sp. ต่อการเติบโตและผลผลิตของพืชบางชนิดในสภาพไร่**. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อมรา คัมภิรานนท์. 2535. **พันธุศาสตร์ของเซลล์**. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

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

_____. 2549. **ผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากอาหารเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon fontinalis* (Ag) Bornet ต่อการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของปลายรากหอม (*Allium ascalonicum* L.)**. ปัญหาพิเศษปริญญโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Armbruster, B.L., W.T. Molin and M.W. Bugg. 1991. Effect of the herbicide dithiopyr on cell division in wheat root tip. **Pesticide. Biochem. And Physiol**. 39: 110-120.

Armstrong, J. E., K. E. Janda, B. Alvorado and A.E. Wright. 1991. Cytotoxin production by a marine *Lynbya* strain (cyanobacterium) in a large-scale laboratory bioreactor. **J. Appl. Phycol**. 3: 277-282.

Arnon, D. I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiol**. 24: 1-15.

Asthana, R. K., A. Srivastana, A. P. Singh, Deepali, S. P. Singh, G. Nath, R. Srivastana and B. S. srivastana. 2006. Identification of an antimicrobial entity from the cyanobacterium *Fischerella* sp. isolate from bark of *Azadirachta indica* (Neem) tree. **J. Appl. Phycol.** 18: 33-39.

Ateeq, B., M. Abul Farah, M. Niamat Ali and W. Ahmad. 2002. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by *Allium* root tip test. **Mut. Res**. 514: 105-113.

Avendano, C. and J. C. Menendez. 2004. Synthetic studies on N-Methylwelwitindolinone C isothiocyanate (welwistatin) and related substructures. **Current Org. Syn**. 1: 65-82.

Badr, A. and T.T. Elkington. 1982. Antimitotic and chromotoxic activities of isoproturon in *Allium cepa* and *Hordeum vulgare*. **Environ. Exp. Bot**. 22: 265-270.

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

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.

Breusegem, F. V., E. Vranova′, J. F. Dat and D. Inze′. 2001. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Sci**. 161: 405-414.

Calatayud, A. and E. Barreno. 2004. Response to ozone in two lettuce varieties on chlorophyll a fluorescence, photosynthetic pigments and lipid peroxidation. **Plant Physiol. Biochem**. 42: 549-555.

Campbell, N.A., Reece, J.B. and Mitchell, L. G. 1999. **Biology**, 5th ed. Addison Wesley Longmann, Inc. California.

Chauhan, L. K. S., P. N. Saxena and S. K. Gupta. 1999. Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Env. Exp. Bot**. 42: 181-189.

Chien, H. F., C. C. Lin, J. W. 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 Regul**. 00: 1-7.

Cho, U.H. and I.T. Kim. 2003. Effects of cadmium on oxidative stress and activities of antioxidant enzymes in tomato seedlings. **Korean J. Ecol.** 26(3): 115-121.

Choudhury, N. K. and R. K. Behera. 2001. Photoinhibition of photosynthesis: role of carotenoids in photoprotection of chloroplast constituents. **Photosynthetica** 39(4): 481-488

Debouba, M., H. Gouia, M.-H. Valadier, M. H. Ghorbel and A. Suzuki. 2006. Salinity-induced tissue-specific diurnal changes in nitrogen assimilatory enzymes in tomato seedlings grown under high or low nitrate medium. **Plant Physiol. Biochem**. 44: 409-419.

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.

Dixit, R. and R. Cyr. 2003. Cell damage and reactive oxygen species production induced by fluorescence microscopy: effect on mitosis and guideline for non-invasive fluorescence microscopy. **Plant J**. 36: 280-290.

Doan, N. T., R. W. Rickards, J. M. Rothschild and G. D. Smith. 2000. Allelopathic action of the alkaloid 12-*epi*-hapalindole E isonitrile and carothrixin A from cyanobacteria of the genera *Fischerella* and *Calothrix*. **J. Appl. Phycol.** 12: 409-416.

Fastner, J., I. Flieger and U. Neumann. 1998. Optimized extraction of microcystins from field samples-a comparison of different solvents and procedures. **Wat. Res**. 32(10): 3177-3181.

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 Physiol**. 71: 502-506.

Frosch, S., M. Jabben, R. Bergfeld, H. Kleinig and H. Mohr. 1979. Inhibition of carotenoid biosynthesis by the herbicide SAN 9789 and its consequences for the action of phytochrome on plastogenesis. **Planta** 145: 497-505.

Gleason, F. K. and J. L. Paulson. 1984. Site of action of the natural algicide, cyanobacterin, in the blue green algae, *Synecgococcus* sp. **Arch. Microbial**. 138: 273-277.

Halliwell, B. and J. M. C. Gutterridge. 1989. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford Science Publication, London.

Herfindal, L., L. Oftedal, F. Selheim, M. Wahlsten, K. Sivonen and S. O. Døskeland. 2005. A high proportion of Baltic Sea benthic cyanobacterial isolates contain apoptogens able to induce rapid death of isolated rat hepatocytes. **Toxicon**. 46: 252-260.

Hill, C.M., S.A. Pearson, A.J. Smith and L.J. Rogers. 1985. Inhibition of chlorophyll synthesis in *Hordeum volgare* by 3- amino 2,3-dihydrobenzoic acid (gabaculin). **Bioscience Reports** 5: 775-781.

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 Edition. John Wiley & Sons, Inc., New York.

_____ and N. P. A. Hüner. 2004. **Introduction to Plant Physiology**. 3rd Edition. John Wiley & Sons, Inc., New York.

Inzé, D. and M. V. Montagu. 2002. **Oxidative Stress in Plants**. Taylor & Francis, London.

Jaki, B., O. Zerbe, J. Heilmann and O. Sticher. 2001. Two noval cyclic peptides with antifungal actiaity from the cyanobacterium *Tolypothrix byssoidea* (EAWAG 195). **J. Nat. Prod**. 64: 154-158.

Kajiyama, S., H. Kanzaki, K. Kawazu and A. Kobayashi. 1998. Nostofungicidine, an antifungal lipopeptide from the field-grown terrestrial blue-green Alga *Nostoc commune*. **Tetrahedron Lett**. 39: 3737-3740.

Keil, C., A. Forchert, J. Fastner, U. Szewzyk, W. Rotard, I. Chorus and R. Kratke. 2002. Toxicity and microcystin content of extracts from a Planktothrik bloom and two laboratory strains. **Wat. Res**. 36: 2133-2139.

Kim, J.-S., T.-J. Kim, O. K. Kwon and K. Y. Cho. 2002. Mechanism of action of sulcotrione, a 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitor, in developed plant tissues. **Photosynthetica** 40(4): 541-545.

Klein, D., D. Daloze, J. C. Braekman, L. Hoffmann and V. Demoulin. 1995. New hapalindoles from the cyanophyte *Hapalosiphon laingii*. **J. Nat. Prod**. 58: 1781-1785.

Kuras, M., J. Nowakowska, E. Sliwinska, R. Pilarski, R. Ilasz, T. Tykarska, A. Zobel and K. Gulewicz. 2006. Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of Allium Test induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. **J. Ethpharm**. In Press, Corrected Proof.

Leather, G. R. and F. A. Einhellig. 1988. Bioassay of naturally occurring allelochemicals for phytotoxicity. **J. Chem. Ecol.** 14(10): 1821-1828.

Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Sci**. 7(9): 405-410.

Moharekar, S. T., S. D. Lokhande (Moharekar), T. Hara, R. Tanaka, A. Tanaka and P. D. Chavan. 2003. Effect of salicylic acid on chlorophyll and carotenoid contents of wheat and moong seedlings. **Photosynthetica** 41(2): 315-317.

Moore, R. E., C. Cheuk and G. M. L. Patterson. 1984. Hapalindoles: new alkaloids from the blue-green algae *Hapalosiphon fontinalis*. **J. Am. Chem. Soc**. 106: 6456-6457.

_____, _____, X. G. Yang and G. M. L. Patterson. 1987. Hapalindoles, antibacterial and antimycotic alkaloids from the cyanophyte *Hapalosiphon fontinalis*. **J. Org. Chem**. 52: 1036-1043.

_____, X. G. Yang, G. M. L. Patterson, R. Bonjouklian and T. A. Smitka. 1989. Hapalonaminds and other oxidized hapalindoles from *Hapalosiphon fontinalis*. **Phytochem**. 5(28): 1565-1567.

Nguyen, H. T. T., I. S. Shim, K. Kobayashi and K. Usui. 2005. Reguration of ammonium accumulation during salt stress in rice (Oryza sativa L.) seedling. **Plant Prod. Sci.** 8(4): 397-404.

Oliva, A., R. M. Moraes, S.B. Watson, S.O. Duke and F.E. Dayan. 2002. Aryltetralin lignans inhibit plant growth by affecting the formation of mitotic microtubular organizing centers. **Pesticide. Biochem. Physiol**. 72: 45-54.

Ortega, J.L., D. Roche and C. Sengupta-Gopalan. 1999. Oxidative turnover of soybean root glutamine synthetase. In vitro and in vivo studies. **Plant Physiol**. 119: 1483-1495.

Panda, S. K., I. Chaudhury and M. H. Khan. 2003. Heavy metals induce lipid peroxidation and affect antioxidants in wheat leaves. **Biologia Plantarum** 46(2): 289-294.

Patterson, G. M., L. K. Larsen and R. R. Moore. 1994. Bioactive natural products from from blue green algae. **J. of Appl. Phycol**. 6: 151-157.

Pechová, R., J. Kutík, D. Holá, M. Kocová, D. Haisel and A. Vicánková. 2003. The ultrastructure of chloroplasts, content of photosynthetic pigments, and photochemical activity of maize (*Zea mays* L.) as influenced by different concentrations of the herbicide amitrole. **Photosynthetica** 41(1): 127-136.

Peixoto, P.H.P., J. Cambraia, R. Sant'Anna, P.R. Mosquim and M.A. Moreira. 1999. Aluminium effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **R. Bras. Fisiol. Veg**. 11(3): 137-143.

Pornprom, T., S. Surawattananon and P. Srinives. 2000. Ammonia accumulation as an index of glufosinate-tolerant soybean cell lines. **Pestic. Biochem. Physiol.** 68: 102-106.

Posmyk, M. M., C. Bailly, K. Szafranska, K. M. Janas and F. Corbineau. 2005. Antioxidant enzymes and isoflavonoids in chilling soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seedling. **J. Plant Physiol.** 162(4): 403-412.

Ranieri, A., G. D´Urso, C. Nali, G. Lorenzini and G.F. Soldatini. 1996. Ozone stimulates apoplastic antioxidant systems in pumpkin leaves. **Physiol. Plant**. 97: 381-387.

Reichardt, C. 2003. **Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry**. 3rd ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim/Germany.

Reichheld, J-P., T. Vernoux, F. Lardon, M. V. Montagu and D. inze. 1999. Specific checkpoints regulate plant cell cycle progression in response to oxidative stress. **Plant J**. 17(6): 647-656

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. **J. Gen Microbiol**. 111: 1-61.

Russo, V. M., C. L. Webber III and D. L. Myers. 1997. Kenaf extract affects germination and post-germination development of weed, grass and vegetable seeds. **Ind. Crops Prod**. 6: 59-69.

Sanevas, N., Y. Sunohara and H. Matsumoto. 2006a. Crude extract of the cyanobacterium, *Hapalosiphon* sp., causes a cessation of root elongation and cell division in several plant species. **Weed Biol. Manage**. 6: 25-29.

_____. 2006b. Lipid peroxidation and DNA fragmentation induced by *Hapalosiphon* sp. extract in several plant species. **J. Weed Sci. Tech.** 51: 82-83.

Shim, I., Y. Naruse, Y. Kim, K. Kobayashi and K. Usui. 1999. Scavenging activity of NaCl-induced activated oxygen in two rice (Oryza sativa L.) cultivars differing in salt tolerance. **Jpn. J. Trop. Agr**. 43(1): 32-41.

Smith, G.D. and N.T. Doan. 1999. Cyanobacteria metabolites with bioactivity against photosynthesis in cyanobacteria, algal and higher plants. **J. Appl. Phycol**. 11: 337-344.

Stratmann, K., R. E. Moore, R. Bonjouklian and J. B. Deeter. 1994. Welwitindolinones, unusual alkaloids from the blue-green algae *Hapalosiphon welwitschii* and *Westiella intricata*. Relationship to fischerindoles and hapalindoles. **J. Am. Chem. Soc.** 116: 9935-9942.

Suikkanen, S., G. O. Fistarol and E. Graneli. 2004. Allelopathic effects of the Baltic cyanobacteria *Nodularia spumigena*, *Aphanizomenon flos-aquae* and *Anabaena lemmermannii* on algal monocultures. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol**. 308: 85-101.

Taiz, L. and E. Zeiger. 1998. **Plant Physiology**. 2nd Edition. Sinauer Associates, Inc., Massachusetts.

_____. 2002. **Plant Physiology**. 3rd Edition. Sinauer Associates, Inc., Massachusetts.

Takeuchi, Y., R. Fukumoto, H. Kasahara, T. Sakaki and M. Kitao. 1995. Peroxidation of lipid and growth inhibition by UV-B irradiation. **Plant Cell Report** 14: 566-570.

Tobin, A. K. and T. Yamaya. 2001. Cellular compartmentation of ammonium assimilation in rice and barley. **J. Exp. Bot.** 52(356): 591-604.

Trainor, F.R. 1978. **Introductory Phycology**. John Willey & Sons, Inc., Ontario.

Trivedi, A. K., I. Ahmad, M. S. Musthapa, F. A. Ansari and Q. Rahman. 2004. Enviromental contamination of chrysotile asbestos and its toxic effects on growth and physiological and biochemical parameter of *Lemna gibba*. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** 47: 281-289

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 Sci**. 151: 59-66.

Wang, M. and Q. Zhou. 2006. Effects of herbicide chlorimuron-ethyl on physiological mechanisms in wheat (*Triticum aestivum*). **Ecotoxicol. Environ. Safety**. 64: 190-197.

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

Yin, Q., W.W. Carmichael and W.R. Evans. 1997. Factor influencing growth and toxin production by cultures of the freshwater cynobacterium *wollei* Farlow ex Gomont. **J. Appl. Phycol**. 9: 55-63.

Zoldos, V., Z. Vidakovic-cifrek, M. Tomic and D. Papes. 1997. Oil and gas industrial chemicals' cytotoxicity studied by Allium test. **Water, Air and Soil Pollution** 94: 181-190.

ภาคผนวก

<u>อาหารเลี้ยงไซยาแบคทีเรีย</u>

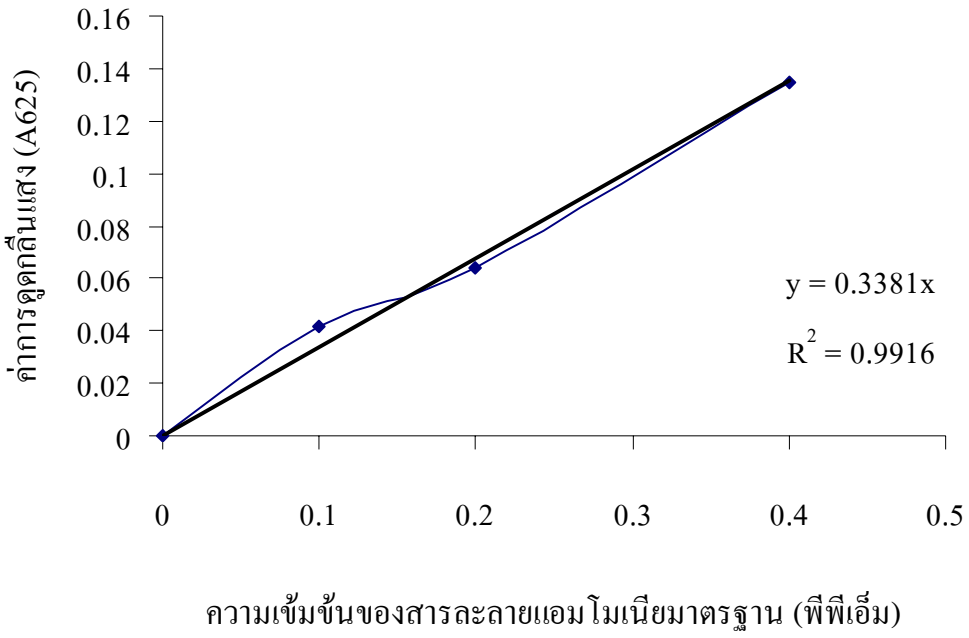
เลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียโดยใช้อาหารเหลว (Liquid medium) สูตร BG-11 (Rippka *et al.,* 1979) ประกอบด้วย

$NaNO_3$	1.500	กรัม
K_2HPO_4	0.040	กรัม
$MgSO_4 \cdot H_2O$	0.075	กรัม
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.036	กรัม
Citric acid	0.006	กรัม
Ferric ammonium citrate	0.006	กรัม
Ethylenediaminetetra acetic acid (EDTA)	0.001	กรัม
Na_2CO_3	0.020	กรัม
Trace metal mix A5	1.000	มิลลิลิตร
Deionized water	1000	มิลลิลิตร

Trace metal mix A5 ประกอบด้วย

H_3BO_3	2.8600	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1.8100	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2220	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.3900	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.0790	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0.0494	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ปรับ pH ให้อาหารผสมมี pH 7.5 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ อุณหภูมิ 121.5 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที



ภาพผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานของสารละลายแอมโมเนียมาตรฐาน

ตารางผนวกที่ 1 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสระยะต่างๆ และ mitotic index ในปลายรากหอม *(A. cepa* L.)

	การแบ่งเซลล์ (เปอร์เซ็นต์)					
	Interphase	Prophase	Metaphase	Anaphase	Telophase	Mitotic Index (MI)
น้ำกลั่น	97.68	0.82	0.56	0.36	0.58	2.32
เมทานอล	95.97	1.45	0.80	0.39	1.40	4.03
F-test	*	*	ns	ns	*	*
0 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร	93.83	2.14	1.25	0.69	2.11	6.17
10 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร	97.42	1.02	0.61	0.33	0.62	2.57
20 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร	99.22	0.25	0.19	0.11	0.23	0.78
F-test	**	*	**	*	*	**
$LSD_{0.05}$	1.74	0.76	0.40	0.38	0.63	1.74

ns, *, ** ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ และมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางผนวกที่ 2 วิเคราะห์ความแปรปรวนผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสระยะต่างๆ และ mitotic index ในปลายรากหอม *(A. cepa* L.)

Source of Variation	DF	Mean Square					
		การแบ่งเซลล์					
		Interphase	Prophase	Metaphase	Anaphase	Telophase	Mitotic Index (MI)
Treatment	5	10.1003 **	0.8045 ns	0.7394 **	0.2261 ns	1.0461 ns	10.5059 *
Solvent (S)	1	2.5765 ns	0.0589 ns	0.2473 ns	0.0025 ns	0.6235 ns	2.1980 ns
Concentration (C)	2	23.6088 **	1.9546 *	1.6941 **	0.5108 *	2.2525 *	24.6885 **
S x C	2	0.3537 ns	0.0273 ns	0.0308 ns	0.0533 ns	0.0510 ns	0.4771 ns
Error	12	1.9558	0.3339	0.1002	0.0906	0.3400	2.1853
CV (%)		1.4	66.0	46.5	80.3	76.6	54.2

ns, *, ** ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ และมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางผนวกที่ 3 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ต่อปริมาณ MDA ของพืชชนิดต่างๆ

	ปริมาณ MDA (มิลลิโมลต่อกรัมน้ำหนักสด)											
	ไมยราบยักษ์		หญ้ายาง		ผักกาดเขียวปลี		ถั่วเหลือง		หญ้ารังนก		ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105	
	ลำต้น	ราก	ลำต้น	ราก	ลำต้น	ราก	ลำต้น	ราก	ลำต้น	ราก	ลำต้น	ราก
น้ำกลั่น	7.850	5.805	15.432	8.038	1.684	2.826	33.007	6.787	6.813	7.864	1.819	3.200
เมทานอล	5.716	1.492	14.297	6.091	1.329	2.555	32.039	6.400	5.123	6.374	1.922	3.239
F-test	*	*	*	*	*	*	ns	ns	*	*	ns	ns
0 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร	5.662	1.648	13.258	5.355	1.226	2.468	32.516	6.516	5.419	6.742	1.645	3.097
25 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร	6.774	2.276	14.000	7.097	1.226	2.710	32.710	6.613	5.065	7.548	1.645	3.226
50 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร	6.435	4.550	14.258	6.903	1.516	2.516	31.871	6.710	6.419	6.806	1.710	3.065
75 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร	6.839	5.110	16.516	6.968	1.790	2.999	32.548	6.484	6.420	6.629	1.645	3.387
100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร	8.206	4.658	16.290	9.000	1.774	2.758	32.968	6.645	6.516	7.870	2.710	3.323
F-test	ns	*	*	*	*	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns
$LSD_{0.05}$	2.143	0.857	1.579	1.920	0.542	0.409	6.810	1.373	1.631	1.281	1.024	1.364

ns, * ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ และมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางผนวกที่ 4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ต่อปริมาณ MDA ของพืชชนิดต่างๆ

Source of Variation	DF	Mean Square											
		ปริมาณ MDA (มิลลิโมลต่อกรัมน้ำหนักสด)											
		ไมยราบยักษ์		หญ้ายาง		ผักกาดเขียวปลี		ถั่วเหลือง		หญ้ารังนก		ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105	
		ลำต้น	ราก	ลำต้น	ราก	ลำต้น	ราก	ลำต้น	ราก	ลำต้น	ราก	ลำต้น	ราก
Solvent (S)	1	34.162	139.470	9.671	28.453	0.944	0.549	7.027	1.124	21.429	16.638	0.080	0.011
		*	*	*	*	*	*	ns	ns	*	*	ns	ns
Concentration ©	4	5.109	14.780	12.686	10.058	0.464	0.270	0.988	0.052	2.737	1.842	1.323	0.012
		ns	*	*	*	*	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns
S x C	4	14.142	9.001	0.795	4.331	0.123	0.024	0.680	0.172	3.326	1.315	0.142	0.083
		*	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Error	20	3.066	0.472	1.718	2.504	0.199	0.101	31.973	1.300	1.833	1.107	0.723	1.284
CV(%)		26.3	18.8	8.8	22.4	30.2	11.8	17.4	17.3	22.7	15.0	45.4	35.2

ns, * ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ และมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางผนวกที่ 5 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นที่แตกต่างกันต่อปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืชชนิดต่างๆ

	ปริมาณรงควัตถุ (มิลลิกรัมต่อลิตร)											
	ไมยราบยักษ์				หญ้ายาง				ผักกาดเขียวปลี			
	คลอโรฟิลล์ เอ	คลอโรฟิลล์ บี	คลอโรฟิลล์ทั้งหมด	แคโรทีนอยด์	คลอโรฟิลล์ เอ	คลอโรฟิลล์ บี	คลอโรฟิลล์ทั้งหมด	แคโรทีนอยด์	คลอโรฟิลล์ เอ	คลอโรฟิลล์ บี	คลอโรฟิลล์ทั้งหมด	แคโรทีนอยด์
น้ำกลั่น	3.994	2.876	6.868	0.752	8.806	6.910	14.991	0.419	2.777	2.201	4.918	0.529
เมทานอล	5.887	4.453	10.337	0.531	8.578	7.165	15.739	0.295	3.331	2.470	5.798	0.502
F-test	*	*	*	*	*	ns	*	*	*	*	*	ns
0 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร	5.654	4.084	9.735	0.791	8.687	7.401	16.085	0.282	3.394	2.535	5.821	0.605
25 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร	5.222	3.904	9.123	0.719	8.489	7.121	15.606	0.348	3.025	2.245	5.268	0.532
50 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร	5.219	3.912	9.128	0.624	8.332	7.008	15.335	0.364	2.998	2.357	5.353	0.508
75 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร	4.276	3.178	7.452	0.549	8.382	7.183	15.560	0.367	2.947	2.323	5.230	0.454
100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร	4.333	3.245	7.576	0.524	7.771	6.473	14.240	0.426	2.905	2.216	5.119	0.482
F-test	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
$LSD_{0.05}$	0.966	0.796	1.756	0.068	0.549	0.588	1.134	0.123	0.283	0.221	0.487	0.081

ns, * ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ และมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางผนวกที่ 6 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นที่แตกต่างกันต่อปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืชชนิดต่างๆ (ต่อ)

	ปริมาณรงควัตถุ (มิลลิกรัมต่อลิตร)											
	ถั่วเหลือง				หญ้ารังนก				ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105			
	คลอโรฟิลล์ เอ	คลอโรฟิลล์ บี	คลอโรฟิลล์ทั้งหมด	แคโรทีนอยด์	คลอโรฟิลล์ เอ	คลอโรฟิลล์ บี	คลอโรฟิลล์ทั้งหมด	แคโรทีนอยด์	คลอโรฟิลล์ เอ	คลอโรฟิลล์ บี	คลอโรฟิลล์ทั้งหมด	แคโรทีนอยด์
น้ำกลั่น	6.965	5.743	12.704	0.943	7.851	5.839	13.686	0.761	2.034	1.081	3.114	0.579
เมทานอล	6.557	5.129	11.682	0.748	7.820	5.805	13.620	0.733	2.402	1.529	3.930	0.320
F-test	ns	*	*	*	ns	ns	ns	ns	ns	*	*	*
0 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร	6.476	5.169	11.641	0.881	7.748	6.135	13.879	0.631	2.127	1.287	3.413	0.448
25 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร	7.067	5.757	12.821	0.892	7.852	5.925	13.772	0.645	2.313	1.444	3.756	0.451
50 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร	6.850	5.670	12.517	0.732	7.642	5.641	13.279	0.768	2.216	1.258	3.472	0.489
75 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร	6.608	5.218	11.823	0.906	8.102	5.986	14.084	0.764	2.320	1.424	3.742	0.455
100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร	6.802	5.365	12.163	0.817	7.831	5.423	13.251	0.929	2.115	1.112	3.226	0.405
F-test	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns
$LSD_{0.05}$	0.670	0.671	1.336	0.108	0.534	0.586	1.114	0.081	0.616	0.388	0.968	0.154

ns, * ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ และมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางผนวกที่ 7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ต่อปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืชชนิดต่างๆ

Source of Variation	DF	Mean Square											
		ปริมาณรงควัตถุ (มิลลิกรัมต่อลิตร											
		ไมยราบยักษ์				หญ้ายาง				ผักกาดเขียวปลี			
		คลอโรฟิลล์ เอ	คลอโรฟิลล์ บี	คลอโรฟิลล์ทั้งหมด	แคโรทีนอยด์	คลอโรฟิลล์ เอ	คลอโรฟิลล์ บี	คลอโรฟิลล์ทั้งหมด	แคโรทีนอยด์	คลอโรฟิลล์ เอ	คลอโรฟิลล์ บี	คลอโรฟิลล์ทั้งหมด	แคโรทีนอยด์
Solvent (S)	1	26.885 *	18.638 *	90.240 *	0.365 *	1.183 *	0.490 ns	4.185 *	0.116 *	2.302 *	0.541 *	5.808 *	0.006 ns
Concentration (C)	4	2.214 *	1.059 *	6.309 *	0.077 *	0.701 *	0.722 *	2.821 *	0.016 *	0.230 *	0.094 *	0.444 *	0.020 *
S x C	4	1.002 ns	0.391 ns	2.592 ns	0.020 *	1.581 *	1.209 *	5.544 *	0.047 *	0.080 ns	0.052 ns	0.270 ns	0.006 ns
Error	20	0.644	0.437	2.125	0.003	0.208	0.238	0.887	0.010	0.055	0.033	0.164	0.004
CV(%)		16.2	18.0	16.9	8.8	5.5	6.9	6.1	28.6	7.7	7.8	7.5	13.0

ns, * ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ และมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางผนวกที่ 8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ต่อปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืชชนิดต่างๆ (ต่อ)

Source of Variation	DF	Mean Square											
		ปริมาณรงควัตถุ (มิลลิกรัมต่อลิตร											
		ถั่วเหลือง				หญ้ารังนก				ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105			
		คลอโรฟิลล์ เอ	คลอโรฟิลล์ บี	คลอโรฟิลล์ทั้งหมด	แคโรทีนอยด์	คลอโรฟิลล์ เอ	คลอโรฟิลล์ บี	คลอโรฟิลล์ทั้งหมด	แคโรทีนอยด์	คลอโรฟิลล์ เอ	คลอโรฟิลล์ บี	คลอโรฟิลล์ทั้งหมด	แคโรทีนอยด์
Solvent (S)	1	1.248 ns	2.826 *	7.825 *	0.286 *	0.00727 ns	0.00891 ns	0.03226 ns	0.00602 ns	1.014 ns	1.510 *	4.996 *	0.501 *
Concentration (C)	4	0.312 ns	0.423 ns	1.412 ns	0.031 *	0.17467 ns	0.49005 ns	0.82752 ns	0.08635 *	0.057 ns	0.110 ns	0.308 ns	0.005 ns
S x C	4	0.402 ns	0.359 ns	1.441 ns	0.013 ns	0.01938 ns	0.03051 ns	0.04915 ns	0.00305 ns	0.499 ns	0.423 *	1.807 ns	0.038 ns
Error	20	0.302	0.303	1.203	0.008	0.17991	0.21728	0.78375	0.00401	0.262	0.104	0.646	0.016
CV(%)		8.1	10.1	8.9	10.3	5.4	8.0	6.5	8.5	23.1	24.7	22.8	28.5

ns, * ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ และมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางผนวกที่ 9 ผลของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ต่อปริมาณแอมโมเนียของพืชชนิดต่างๆ

	ปริมาณแอมโมเนีย (พีพีเอ็ม)											
	ไมยราบยักษ์		หญ้ายาง		ผักกาดเขียวปลี		ถั่วเหลือง		หญ้ารังนก		ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105	
	ลำต้น	ราก	ลำต้น	ราก	ลำต้น	ราก	ลำต้น	ราก	ลำต้น	ราก	ลำต้น	ราก
น้ำกลั่น	1.336	4.230	3.562	1.026	0.000	0.000	0.000	0.000	1.336	2.596	10.393	9.057
เมทานอล	0.000	10.987	0.000	0.000	1.336	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	5.273	8.496
F-test	*	*	*	*	*	ns	ns	ns	*	*	ns	ns
0 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	3.341	6.888
25 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร	0.000	3.712	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	5.568	7.424
50 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร	0.000	5.197	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	8.909	8.909
75 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร	1.113	10.026	0.000	1.102	1.670	0.000	0.000	0.000	0.000	2.273	7.614	8.909
100 กรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อลิตร	2.226	19.109	8.905	1.464	1.670	0.000	0.000	0.000	3.341	4.281	13.734	11.754
F-test	*	*	*	*	*	ns	ns	ns	*	*	*	*
$LSD_{0.05}$	0.001	4.151	6.112	0.519	0.637	0.000	0.000	0.000	0.848	1.029	8.156	3.663

ns, * ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ และมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางผนวกที่ 10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสารสกัดจาก *H. fontinalis* ที่มีตัวทำละลายและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ต่อปริมาณแอมโมเนียของพืชชนิดต่างๆ

Source of Variation	DF	Mean Square											
		ปริมาณแอมโมเนีย (พีพีเอ็ม)											
		ไมยราบยักษ์		หญ้ายาง		ผักกาดเขียวปลี		ถั่วเหลือง		หญ้ารังนก		ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105	
		ลำต้น	ราก	ลำต้น	ราก	ลำต้น	ราก	ลำต้น	ราก	ลำต้น	ราก	ลำต้น	ราก
Solvent (S)	1	13.382	342.472	95.155	7.907	13.382	0.000	0.000	0.000	13.393	50.555	196.648	2.360
		*	*	*	*	*	ns	ns	ns	*	*	ns	ns
Concentration ©	4	5.947	325.473	95.155	3.061	5.0118	0.000	0.000	0.000	13.393	21.797	92.009	21.450
		*	*	*	*	*	ns	ns	ns	*	*	*	*
S x C	4	5.947	66.675	95.155	3.061	5.018	0.000	0.000	0.000	13.393	21.797	49.444	5.008
		*	*	*	*	*	ns	ns	ns	*	*	*	*
Error	20	$9.14x10^{-7}$	11.712	25.584	0.184	0.276	0.000	0.000	0.000	0.496	0.730	45.556	9.249
CV(%)		0.2	46.3	276.8	81.6	110.0	0.0	0.0	0.0	105.4	65.8	85.3	34.7

ns, * ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ และมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	อินทิรา ขูดแก้ว
วัน เดือน ปี ที่เกิด	21 ตุลาคม 2525
สถานที่เกิด	จังหวัดชลบุรี
ประวัติการศึกษา	มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนพนัสพิทยาคาร จ.ชลบุรี วท.บ.(ชีววิทยา) เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนโครงการพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความรู้ความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.)