รายงานฉบับสมบูรณ์ทุนอุดหนุนงานวิจัย
งบประมาณแผ่นดินปี 2540

เรื่อง

ผลทางอัลลีโลพาธิกของวัชพืชธูปฤาษีที่มีต่อการเจริญเติบโตของวัชพืชไมยราบยักษ์

นักวิจัย
ผศ. ทิฆัมพร ยงวณิชย์
ผศ. ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จฬ
วท 15
009620

รายงานฉบับสมบูรณ์

ผลของอัลลีโลพาธิกของวัชพืชธูปฤาษีที่มีต่อการเจริญเติบโตของไมยราบยักษ์

****

แบ่งวัตถุประสงค์และผลงานวิจัยของรายงาน
เป็น 3 หมายเลข

****

1. ผลของสารในวัชพืชธูปฤาษีที่มีต่อการเจริญของไมยราบยักษ์ (เอกสารหมายเลข 1)
2. เปรียบเทียบสารอัลลีโลพาธิกที่มีในส่วนต่าง ๆ ของวัชพืชธูปฤาษี (เอกสารหมายเลข 2)
3. ศักยภาพของวัชพืชธูปฤาษีในการควบคุมไมยราบยักษ์โดยชีววิธีในสภาพแปลงทดลอง (เอกสารหมายเลข 3)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3 ? ต.ค. 2544

I18345170

สรุปผลงานวิจัย

ผลของการศึกษาพบว่า

1. ตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการงอกของเมล็ดไมยราบยักษ์ คือ น้ำ และ 70 % เมธานอล โดยการนำดอกธูปฤาษีแช่ในน้ำและ 70 % เมธานอล เป็นเวลา 5 วันที่อุณหภูมิห้อง กรองผ่านผ้ากรอง จะได้สารสกัดที่ต้องการเพื่อนำมาทดสอบการยับยั้งการงอกของเมล็ดได้ภายในเวลา 2 อาทิตย์ (เอกสารหมายเลข 1)

2. เมื่อนำสารสกัดมาแยกโดยวิธีทางเคมี และทำการทดสอบสารที่แยกได้โดยทางเคมี และสเปกตรัม พบว่า สารสกัดประกอบด้วย แทนนินฟลาโวนอยด์ ชนิด ฟลาโวโนน (เอกสารหมายเลข 1)

เมื่อตรวจปริมาณของฟลาโวนอยด์จากส่วนต่าง ๆ ของธูปฤาษี กล่าวคือ ใบ ลำต้น และดอก พบว่าใบส่วนบนของธูปฤาษีมีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงสุด และรองลงมาคือ ดอก ใบส่วนล่าง และลำต้นตามลำดับ เมื่อนำสารฟลาโวนอยด์ไปทำการทดสอบผลที่มีต่อการเจริญเติบโตของเมล็ดไมยราบยักษ์ พบว่า สารสกัดที่ความเข้มข้น 0.033 กรัม/มล. สามารถยับยั้งการงอกได้อย่างสมบูรณ์ (เอกสารหมายเลข 2)

3. การใช้สารสกัดจากวัชพืชธูปฤาษีในการควบคุมวัชพืชไมยราบยักษ์ในสภาพเรือนทดลองไม่ได้ผลที่น่าพอใจ ทั้งนี้ได้ส่งรายงานความก้าวหน้าเมื่อเดือนมิถุนายน 2540 เกี่ยวกับการทดลองในแปลง และได้ทำการทดลองเพิ่มเติม โดยการเปลี่ยนสภาวะต่าง ๆ และความเข้มข้นของสารสกัด ปรากฏว่า ไม่ได้ผล ทั้งนี้อาจมาจากตัวแปรหลายชนิดในแปลงทดลอง และสภาวะของเมล็ดไมยราบยักษ์ที่นำมาใช้ ฯลฯ จึงเป็นที่น่าสนใจ น่าศึกษาถึงองค์ประกอบเหล่านี้ต่อไป (เอกสารหมายเลข 3)

เลขหมู่ ๗๙
๐๓ 15
เลขทะเบียน 009620
วัน,เดือน,ปี 21 เม.ย 42

เอกสารหมายเลข 1

ผลทางอัลลีโลพาธิกของวัชพืชธูปฤาษี ที่มีต่อการเจริญเติบโตของ เมล็ดไมยราบยักษ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ALLELOPATHIC EFFECT OF *TYPHA AUGUSTIFOLIA* ON THE GROWTH OF *MIMOSA PIGRA*

T. Yongvanich[1], W. Padungkul[1], P. Waithanomsat[1] and W. Chulalaksananukul[2]

[1]*Department of Biochemistry, and* [2]*Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330. Thailand.*

Abstract

The flowers of *Typha augustifolia* were extracted with 70% methanol and distilled water in comparison. When the aqueous extracts obtained from both methanol and distilled water were tested for their effect on germination of the seeds of *Mimosa pigra*, the results showed inhibition by both extracts. Evidences from chemical tests and absorption spectra suggested the presence of condensed tannins in both aqueous extracts. The addition of 10% bovine serum albumin to the aqueous extracts from both water and 70% methanol resulted in light brown precipitates. When the seeds of *Mimosa pigra* were grown in the presence of various concentrations of the light brown precipitates, the results showed complete inhibition by the precipitates obtained from 70% methanol aqueous extracts. On the other hand, precipitates from aqueous water extracts resulted in partial inhibition. The results imply that, condensed tannins in *Typha augustifolia* exerted allelopathic effect on the germination of the seeds of *Mimosa pigra*, and the inhibitory effect was shown to be concentration dependent.

Introduction

The application of chemicals to eliminate the weeds has been widely shown to have negative impact on both the environment and living organisms. As a consequence, the idea of using natural products in place of these hazardous chemicals has become of more interest for modern scientists at present.

Natural substances, possibly existing in plants, may be released into the environment and exert both positive and negative impact on the different or the same types of neighbouring living organisms. This phenomenon is recognized as "Allelopathy" (Rice, 1979; Putnum, 1985).

In agriculture, several various allelopathic effects have been illustrated such as the effect among agricultural plants themselves (Young and Chen, 1989), agricultural plants against weeds (Haward *et al.*, 1986), weed effect on agricultural plants (Ito *et al*, 1985) or even among weeds themselves (Simkin and Doll, 1982). The present research focussed on the last phenomenon since it could simultaneously reduce the number of weeds in nature and the utilization of chemicals for herbicides.

The plants in this research were *Typha augustifolia* and *Mimosa pigra*. Both are considered "weeds" causing severe environmental problems and therefore economically cost the country million dollars annually. Generally, in Thailand, *Mimosa pigra* has been shown to be the weed which can naturally adapt themselves and strongly survive

in any type of soil. The rate of flowering is increased depending on the age resulting in enormous quantities of seed production. As a consequence, the weeds can reproduce at a tremendous rate with high resistance. The stems also contain very sharp thorns resulting in much more difficulties in elimination than the other types of weeds (Lonsdale *et al.*, 1985). Similarly, the weeds, *Typha augustifolia* can also self-reproduce at incredible rate and the pattern of distribution is as densely populated as in a grassfield covering wide areas, severely damaging the environment (Thamasara, 1985).

Interestingly, *Typha augustifolia* has been known to exist in the environment since the dinosaur era until today. In addition,within the neighbourhood of this particular weed, there is no other plant that appears to be able to grow in the vicinity. It is therefore suggested that the flowers of this weed might containe coating substances, "allelochemicals", which can result in a self-defense mechanism protecting them from the surrounding environment. In general, allelopathic substances in plants are mainly found to be second metabolites such as terpenoids, alkaloids, flavonoids, phenolic compounds, small peptides, amino acids, tannins and others (Waller, 1975). There is evidence that the secondary metabolites are often stored in various and intercellular spaces when they are not used and often are released into the environment by means of four ecological processes namely volatilization, leaching, decomposition of plant residues in soil and root exudation. From our observations, the colour of the extracts obtained from both water and methanol were brown similar to that of tannins which are known to be abundant in certain plants. Therefore, the main objective of this study was to investigate the effect of tannins from the extracts of the flowers of *Typha augustifolia*, the abundant weed, an the seed germination of *Mimosa pigra*, another prominent and stronger weed.

Materials and Methods

Sample preparation

The flowers of *Typha augustifolia* were collected, dried in the oven for one day and stored at room temperature until required for used.

Extracts preparation

Dried flowers of *Typha augustifolia* were weighed and immersed in 10 times the volume of water and 70% methanol solution respectively for 5 days at room temperature. The extracted flowers were then filtered and the extracts obtained from water and 70% methanol were used for later experiments.

Separation of tannins from aqueous extracts

The extracts from both 70% methanol and distilled water were added with 10% bovine serum albumin at a ratio of 1 to 1 by volume and centrifuged at 2,000 *g* for 15 minutes. The wet precipitates were later weighed, dissolved in an equal volume of water, added into the petri-dishes covered with Whatman papers and left to dry at room temperature.

Absorption spectrum test

0.1 ml of extract was incubated with 5% HCl and butanol at a ratio of 1 to 3 for 2 hours and absorption spectra were scanned at wavelenght between 440-600 nm.

Chemical qualitative tests

Reaction with acid in butanol: The aqueous extracts were added with 2 M HCl and butanol in the ratio of 1 to 2 to 1 respectively. The mixture was then boiled at 100°C for half an hour, and a crimson red solution was obtained.

Reaction with $FeCl_3$: An equal volume of $FeCl_3$ was added to the aqueous extracts at room temperature and a green solution with the same colour of precipitate was obtained.

Preparation of the seeds of Mimosa pigra

The seeds of *Mimosa pigra* were immersed in the preheated water at 50-60°C for 4 minutes and later changed with the water at room temperature for another day. Only swollen seeds were selected for further experiments.

Effect on the germination of the seeds of Mimosa pigra

Effect of aqueous extracts

The extracts from *Typha augustifolia* were added in amounts equivalent to 0.5, 1.0, 2.0 and 3.0 grams per dish of *Mimosa pigra*. The petri-dishes were then tightly covered and the number of the germinating seeds were later counted in each dish. The physiological differences between seeds in the control and the two experimental extracts were continuously observed. Experiments were conducted in triplicate for each concentration of each extract. The controls with 70% methanol and distilled water were then left to dry at room temperature.

Effect of tannin precipitates from both aqueous extracts

Plates were covered with Whatman papers containing brown condensed tannin precipitates at various concentrations obtained from 3. Then 15 ml of distilled water was added and 20-30 selected swollen seeds of *Mimosa pigra* were grown in these plates. The growth of the seeds was observed for 10 consecutive days.

The results of the experiment were then calculated as the percentage of the inhibition as follows;

$$\% \text{ inhibition of the germination} = \frac{C - T}{C} \times 100$$

where C = number of seeds of *Mimosa pigra* germinating in controls
T = number of seeds of *Mimosa pigra* germinating in the presence of experimental extracts or tannin precipitates.

Results and Discussions

Fig.1 shows the results obtained from the aqueous extracts from both distilled water and 70% methanol of *Typha augustifolia*. It could be seen that both aqueous extracts exhibited inhibitory effect on the germination of the seeds of *Mimosa pigra*. When the seeds were grown in the presence of 0.5 g to 3 g of aqueous extracts from both water and methanol, the inhibition was shown to be concentration dependent. Moreover, complete inhibition was obtained when the concentrations of aqueous extracts reached 2.0 and 3.0 g per dish . This result suggested that *Typha augustifolia* contain certain substances which can act in a self-defence manner and simultaneously inhibit the growth of *Mimosa pigra*. When these two extracts were precipitated by the addition of 10% bovine serum albumin, brown precipitates were obtained suggesting the presence of tannins, one of the allelochemicals found in plants. Chemical tests with acid in butanol and reaction with $FeCl_3$ gave the positive confirmation that tannins were one of the components in both the water and 70% methanol extracts . In addition, the absorption spectrum of the precipitates obtained showed maximum wavelength at 540 nm which coincides with that of the tannins (545 nm for cyanidin, one of the condensed tannins).

When the germination of *Mimosa pigra* was examined in the presence of suspected tannins, obtained by precipitation with BSA, inhibition was obtained with

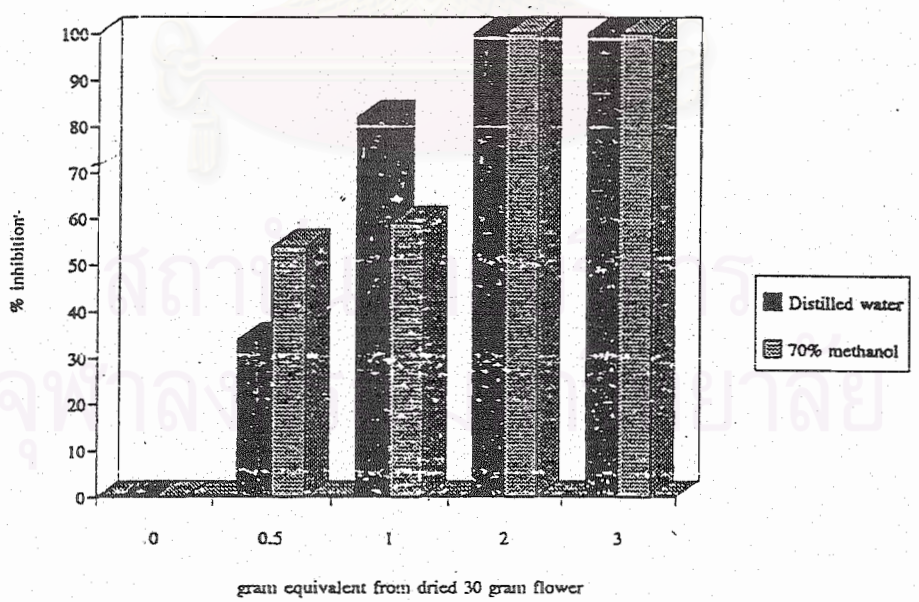


Figure 1. Effect of various concentrations of water and 70% methanol extracts of *Typha augustifolia* flowers on the germination of *Mimosa pigra* seeds. 30 selected swollen seeds of *Mimosa pigra* were grown in the presence of 0.5-3 gram equivalents of water and 70% methanol extracts from 30 grams of dried *Typha augustifolia* flowers. The controls were grown in the presence of water or 70% methanol. The period of the experiment was 2 weeks.

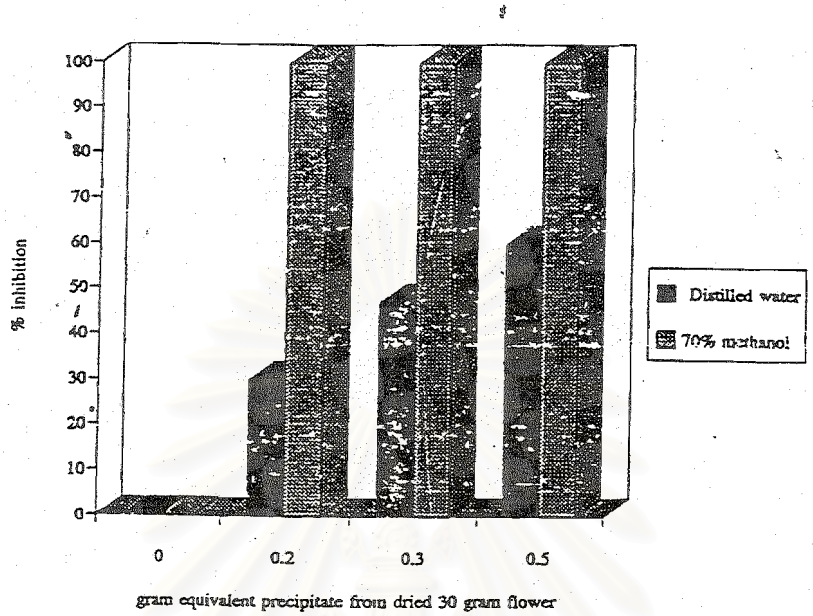


Figure 2. Effect of various concentrations of the brown tannin precipitates from the water and 70% methanol extracts of *Typha augustifolia* flowers on the germination of *Mimosa pigra* seeds. 30 selected swollen seeds of *Mimosa pigra* were grown in the presence of 0.2 - 0.5 gram equivalent of precipitates obtained from water and 70% methanol extracts of 30 grams of dried *Typha augustifolia* flowers. Controls were grown in the presence of water, 70% methanol and bovine serum albumin.

both precipitates. However, tannins from 70% methanol extracts resulted in higher percentage of inhibition than tannis from water extracts when equal volumes of the two extracts were precipitated with bovine serum albumin (Fig.2).

Inhibition was complete when the seeds were grown in the presence of 0.3 and 0.5 gram equivalents of tannins from 30 grams of dried flowers of *Typha augustifolia* extracted with 70% methanol. On the other hand, the percentage of inhibition was gradually increased with the increasing concentrations of tannins obtained from water extracts. This is consistent with the results from Fig.1 and consistent with the report that allelochemical compounds are mainly natural products and easily degraded by microbes (Chou, C.H and Lin, H.J, 1976). Further investigations on the application of these allelochemicals under natural conditions in the field should be carried out. However, allelopathy alone cannot account for the complicated environmental phenomena. Other forms of plant interference, especially nutrient and water competition must also be examined in the field experiments (Chou, C.H, 1976). Moreover, the effect on the other types of weeds or insects should also be investigated. Finally, to ensure that application in nature will not be hazardous towards the environment and other living organisms, the effect of residual substances should also be throughly studied.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from National Research Council of Thailand.

References

1. Chou, C.H. and Lin, H.J. (1976). Autointoxication mechanism of *Oryza sativa* I phytotoxic effects of decomposing rice recidues in paddysoil. *J. Chem.* 2, 353-367.

2. Chou, C.H. (1989). The role of Allelopathic in Agroecosystem studies from Tropical Taiwan "Agroecology Researching the Ecological Basis for substainable Agriculture" Springer-Verlag, New York, Berlin, Hiedelberg, London, Paris, Tokyo, Hongkong.

3. Haward, F., Harrison Jr. and Petersoon, J.K. (1986). Effect of Sweet Potatoes (*Ipomae batatas)* on Yellow Nutsedge (*Cyperus esculentus)* and alflafa (*medicago sativa). Weed Sci.* 34, 323-327.

4. Ito, M., Kamada, Y. and Ueki, K. (1985). Noncompetative Effects of *Mimosa pigra* L., pp 484-491. In proc 10th Asain-Pacific Weeds Science Society Conference. Chiangmai, Thailand.

5. Lonsdale, W.M., Harley, K.L.S. and Miller, I.L. (1985). The Biology of *Mimosa pigra* L., pp 484-491. In Proc 10th Asian-Pasific Weed Science Society Conference. Chiangmai, Thailand.

6. Putnam, A.R. (1985). *Weeds allelopathy*, pp. 131-155.

7. Rice, E.L. (1979). Allelopathy-an update. *Bot. Rev.* **45**, 15-109.

8. Simkin, G.S. and Doll. J.B. (1982). Effect of annual weed residues on the growth of yellow nutsedge. Possible role of allelopathy in the competition between tomato, *Senecio vulgario* L. and *Chenopodium album* L. *Weed Res.* **29**, 349-356.

9. Thamasara, S. (1985). Weeds problem in Thailand. pp 379-384. In Proc 10th Asain-Pasific Weed Science Society Conference. Chiangmai, Thailand.

10. Waller, G.R. and Nowaeki, E.K. (1975). "Alkaloid Biology and metabolism in Plants Press, New York and London.

11. Waller, G.R. (Ed.) (1987). "Allelochemicals Role in Agriculture and forestry "ACS Symposium Series 330, American Chemical Society Washington, D.C. pp. 660.

12. Young, C.C. and Chen, S.H. (1989). Continuous Cultivation of Asparagus and the Allelopahtic Effect. Technical Buletin no. 116. Food and Fertilizer Technology Center. pp. 9.

13. Zungsonthiporn, S. (1992). Allelopathic Effect of *Eupatorium adenophorum Spreng.* on the Growth of Some Crops and Weeds. M.Sc. Thesis, Kasetsart University, Thailand.

เอกสารหมายเลข 2

ผลทางอัลลีโลพาธิกของสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของวัชพืชฐูปฤาษีต่อการเจริญเติบโตของเมล็ดไมยราบยักษ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อัลลิโลพาธี เป็นปรากฏการณ์ที่พืชชนิดหนึ่งปล่อยสารประกอบทางเคมี ซึ่งมีผลเร่งหรือยับยั้งการเจริญของพืชชนิดอื่น ๆ ในบริเวณใกล้เคียง ได้มีการศึกษาถึงผลทางอัลลิโลพาธิก เพื่อนำมาใช้กำจัดวัชพืชโดยวิธีทางชีวภาพแทนการใช้สารเคมี ซึ่งมีผลให้เกิดสารตกค้างขึ้นในธรรมชาติ

จากผลการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า สารสกัดจากดอกธูปฤาษีที่ได้จากน้ำและเมทานอลมีผลยับยั้งการงอกของเมล็ดไมยราบยักษ์ได้ เมื่อทำการแยกสารสกัดดังกล่าว พบว่า ประกอบด้วยสารอัลลิโลเคมิคัลอย่างน้อย 1 ชนิด คือ แทนนินซึ่งสามารถยับยั้งการงอกของไมยราบยักษ์ ผู้วิจัยจึงสนใจถึงสารอัลลิโลเคมิคัลอีกชนิดหนึ่งคือ ฟลาโวนอยด์ เนื่องจากมีผู้รายงานไว้ว่า ฟลาโวนอยด์หลายชนิดสามารถยับยั้งการงอกของเมล็ดได้ (Rice et al, 1974)

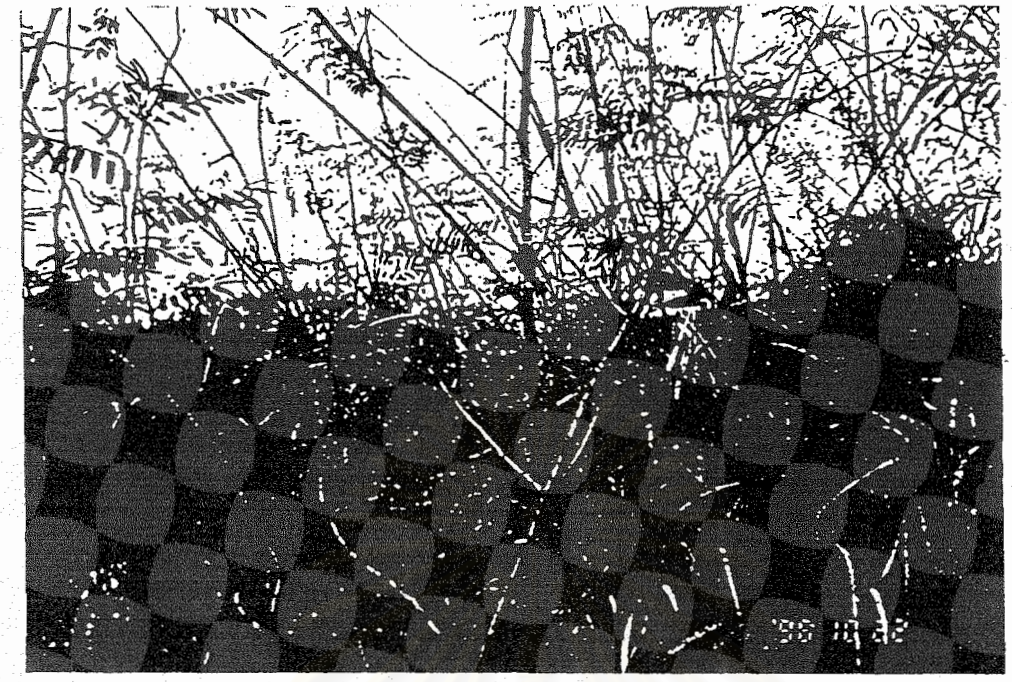
ดังนั้น โครงการนี้จึงต้องการศึกษาผลของฟลาโวนอยด์จากส่วนต่าง ๆ ของธูปฤาษีต่อการเจริญของเมล็ดไมยราบยักษ์ จากผลการทดลอง เมื่อนำสารตัวอย่างที่แยกได้จากสารสกัดมาทดสอบโดยวิธีทางเคมีของชิโนดะ (1928) พบว่า ได้ผลบวก และโดยวิธีของพิว (1948) พบว่าได้ผลลบ นอกจากนี้เมื่อศึกษาสเปกตรัม พบว่า สารสกัดดังกล่าวสามารถดูดกลืนแสงได้มากที่สุด ที่ความยาวคลื่น 275 และ 310 นาโนเมตร จึงอาจสรุปได้ว่า สารที่สกัดได้เป็นฟลาโวนอยด์ชนิดฟลาวาโนน เมื่อนำมาทดสอบผลต่อการเจริญของเมล็ดไมยราบยักษ์ พบว่า ฟลาวาโนนจากส่วนต่าง ๆ ของธูปฤาษี สามารถชะลอการเจริญของเมล็ดไมยราบยักษ์ได้ อีกทั้งยังแปรตามปริมาณของฟลาวาโนน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ไมยราบยักษ์ส่วนใหญ่มิได้เกิดขึ้นในพื้นที่ทำการเกษตรของเกษตรกรโดยตรง แต่เกิดขึ้นในพื้นที่ซึ่งเป็นแหล่งเก็บน้ำเพื่อการชลประทาน ทำให้อ่างเก็บน้ำตื้นเขิน และมีผลต่อการไฟฟ้าพลังน้ำ ทำให้หน่วยราชการต้องใช้จ่ายงบประมาณเพื่อการกำจัดไมยราบยักษ์ โดยวิธีตัดฟันในแต่ละปีเป็นจำนวนมาก ไมยราบยักษ์เป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของโรคแมลงและศัตรูพืชรวมทั้งพาหะนำโรคต่าง ๆ ในระหว่านอกฤดูกาลเพาะปลูก ฉะนั้นปัญหาเรื่องไมยราบยักษ์จึงควรแก้ไขโดยด่วน วิธีที่นิยมใช้กำจัดคือการใช้สารเคมีพวก เบนทาซอน (Bentazon), ไกลโฟเสท (Glyphosate) ปรากฏการณ์อัลลีโลพาธีที่กล่าวมาจะเห็นว่ามีประโยชน์ที่จะใช้ในการกำจัดวัชพืชไมยราบยักษ์ พืชที่สนใจนำมาในการใช้กำจัดไมยราบยักษ์คือธูปฤาษี

ธูปฤาษี (*Typha angustifolia L.*) มีชื่อสามัญคือ narrow- leaved cattail อยู่ในวงศ์ Typhaceae หรือรู้จักในชื่อ กกช้าง เป็นวัชพืชที่พบทั่วไปตามแหล่งน้ำธรรมชาติ การเจริญเติบโตคล้ายถอหญ้าขึ้นแน่นหนาทึบ และไม่พบพืชชนิดอื่น ๆ ในบริเวณนั้น ขยายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว มีลำต้นใต้ดินหรือที่เรียกว่า ไหล (Rhizome) ช่วยในการขยายพันธุ์ให้เร็วขึ้น (กองวัชพืช กรมชลประทาน) นอกจากนั้นละอองเกสรทำให้เกิดอาการโรคภูมิแพ้

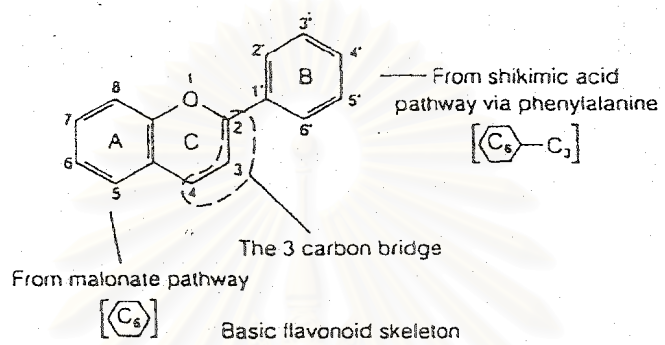
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1 ไมยราบยักษ์

รูปที่ 2 ธูปฤาษี

จากการศึกษาวิจัยของเราที่ผ่านมา พบว่า สารสกัดจากดอกธูปฤาษีในน้ำและเมธานอล สามารถยับยั้งการเจริญของเมล็ดไมยราบยักษ์ได้ ต่อมาพบว่า แทนนินเป็นสารอัลลิโลเคมิคัลในสารสกัดดังกล่าว จึงสนใจถึงสารอัลลิโลเคมิคัลชนิดอื่น ๆ คือ ฟลาโวนอยด์ ซึ่งมีผู้รายงานถึงผลทางอัลลิโลพาธิกไว้



รูปที่ 3 สูตรโครงสร้างฟลาโวนอยด์

ฟลาโวนอยด์เป็นสารพวกโพลีฟีนอลประกอบด้วยคาร์บอน 15 อะตอม มีวงฟลาแวนเป็นโครงสร้างหลักมีวงเบนซีน 2 วงจับกันด้วยคาร์บอน 3 อะตอม เรียงกันแบบ C_6 -C_3 -C_6

โครงการนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบผลของฟลาโวนอยด์จากส่วนต่าง ๆ คือ ดอก ต้น และใบของธูปฤาษีต่อการเจริญของเมล็ดไมยราบยักษ์ หากผลการทดลองเป็นไปตามสมมติฐานเราจะสามารถนำสารสกัดจากธูปฤาษีไปควบคุมปริมาณของวัชพืชไมยราบยักษ์แทนการใช้สารเคมีที่มีผลตกค้างในธรรมชาติ มากกว่านั้นยังเป็นการลดปริมาณของวัชพืชทั้งสองชนิดให้น้อยลงด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบปริมาณของฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้จากส่วนต่าง ๆ ของธูปฤาษี

2. ศึกษาผลของฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้ต่อการเจริญเติบโตของไมยราบยักษ์

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

1. บีกเกอร์
2. ผ้ากลอส
3. ตู้อบ
4. ขวดก้นกลม 500 มิลลิลิตร
5. เตาไฟฟ้า
6. กระบอกตวง
7. วาสลีน
8. มีดและเขียง
9. เครื่องปั่น
10. เครื่องระเหยลดความดัน
11. กรวยแยก
12. กะละมัง
13. เครื่องชั่งไฟฟ้า
14. หลอดทดลองขนาด 16 x 100
15. หลอดหยดสาร
16. ปิเปต
17. สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Beckman) DU 650

18. คิวเวต

19. กระดาษกรองวัดแมนหมายเลข 42

20. จานแก้ว

สารเคมี

1. เมทานอล
2. น้ำกลั่น
3. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น
4. ออกทานอล
5. วงแหวนแมกนีเซียม
6. ผงสังกะสี

พืช

1. ดอก ต้นและใบธูปฤาษี
2. เมล็ดไมยราบยักษ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขั้นตอนหลักในการทดลอง

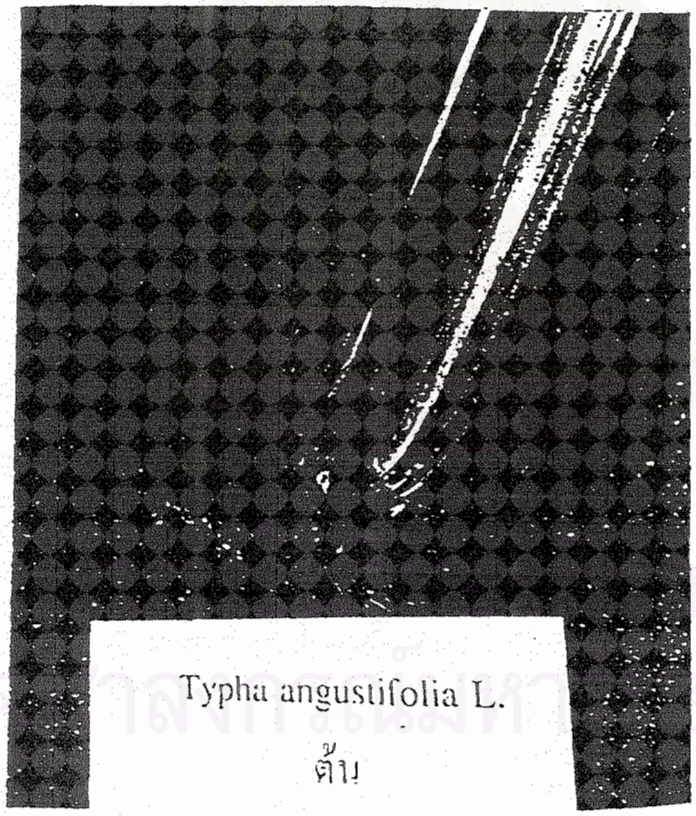
1. การสกัดฟลาโวนอยด์จากดอก ต้นและใบธูปฤาษี
2. การตรวจชนิดของฟลาโวนอยด์
3. การศึกษาผลของฟลาโวนอยด์จากดอก ต้นและใบธูปฤาษีต่อการเจริญของเมล็ดไมยราบยักษ์

1. การสกัดฟลาโวนอยด์จากดอก ต้นและใบธูปฤาษี

1.1 การเตรียมส่วนต่างๆของพืชเพื่อสกัดฟลาโวนอยด์

ส่วนดอก - แกะดอกออกจากฐานรองดอก

ส่วนต้น - นำต้นใต้ดิน(Rhizome)มาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น



รูปที่ 4 ลำต้นใต้ดิน (Rhizome)

ส่วนใบ - แบ่งเป็น 2 ส่วน

- ใบส่วนบน คือ ส่วนปลายใบที่มีคลอโรฟิลล์จำนวนมาก

- ใบส่วนล่าง คือ ส่วนโคนใบที่มีคลอโรฟิลล์จำนวนน้อย

ทุกส่วนนำมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ และบดในเครื่องปั่นเช่นกันแต่ละส่วนของธูปฤาษีเมื่อบดละเอียดแล้วให้นำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะใช้

1.2 การสกัดฟลาโวนอยด์จากดอก ต้น ใบธูปฤาษี (Markham K.R., 1982)

1.2.1 ชั่งน้ำหนักดอก ต้น ใบธูปฤาษีที่อบแห้งส่วนละ 30 กรัม

1.2.2 นำแต่ละส่วนมาสกัดด้วยเมทานอลต่อน้ำ 9:1 โดยปริมาตร

ปริมาตร 10 เท่าของน้ำหนัก

↓ ตั้งทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง

กรองแล้วเก็บสารสกัดครั้งที่ 1

↓

กากที่เหลือ

↓

สกัดด้วยเมทานอลต่อน้ำ 1:1 โดยปริมาตร

ปริมาตร 10 เท่าของน้ำหนัก

↓ ตั้งทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง

กรองเก็บสารละลายครั้งที่ 2

↓

นำสารสกัดครั้งที่ 1 และ 2 มารวมกัน (บันทึกปริมาตร = V_1)

↓

ระเหยเมทานอลออกโดยเครื่องระเหยลดความดันที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส

↓

สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 1:1 โดยปริมาตร 3 ครั้ง

↓

ระเหยบนเตาไฟฟ้าให้ปริมาตรเหลือ 1 ใน 3 หรือเมื่อสังเกตเห็นตะกอนลอยที่ผิวของสารสกัด

↓

สารสกัดฟลาโวนอยด์ (บันทึกปริมาตร = V_2)

1.3 การหาปริมาณฟลาโวนอยด์

1.3.1 ชั่งน้ำหนักกระดาษกรองหมายเลข 42 ที่อบแห้ง

1.3.2 ปิเปตสารสกัดจากแต่ละส่วน 1 มิลลิลิตรลงในกระดาษกรอง

1.3.3 อบกระดาษกรองที่มีสารสกัดให้แห้ง

1.3.4 ชั่งน้ำหนักกระดาษกรองที่มีสารสกัด

1.3.5 คำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์ใน 1 มิลลิลิตรของสารสกัดและคำนวณค่ากรัมเปอร์เซนต์

ตัวอย่างการคำนวณ

ดอก 30 กรัม

สารสกัด 1 มิลลิลิตรมีฟลาโวนอยด์ 0.01 กรัม (จากการชั่งบนกระดาษกรอง)

ปริมาณสารที่สกัดได้ (V_2) = 199 มิลลิลิตร

จึงมีฟลาโวนอยด์ = 199 x 0.01 กรัม = 1.99 กรัม

ปริมาณสารสกัดจากครั้งแรก (V_1) = 439 มิลลิลิตร

จึงมีฟลาโวนอยด์ = 1.99 กรัม

ฉะนั้นใน 1 มิลลิลิตรของสารสกัดครั้งแรกจึงมีปริมาณฟลาโวนอยด์

$$= \frac{1.99}{439} = 0.00404 \text{ กรัม}$$

คิดเป็นค่ากรัมเปอร์เซนต์เท่ากับ $\frac{30 \times 0.99}{100} = 6.63$

2. การตรวจสอบชนิดของฟลาโวนอยด์

2.1 ทดสอบโดยปฏิกิริยาเคมี

2.1.1 วิธีทดสอบของชิโนดะ (ชิโนดะ. 1928)(Cyanidin reaction)

นำสารสกัดที่ได้ 1 มิลลิลิตรมาระเหยให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จากนั้นละลายด้วยเมทานอล 1 มิลลิลิตร จากนั้นใส่วงแหวนแมกนีเซียม 3-4 อัน (0.1 กรัม) เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 10 หยด สังเกตุสีส้มหรือสีแดงที่เกิดขึ้น จากนั้นทำให้หลอดเย็น เจือจางด้วยน้ำปริมาตร 1 เท่าตัว แล้วเติมออกทานอล 1 มิลลิลิตร เขย่าแล้วทิ้งให้แยกชั้น สังเกตุสี benzopyrone nucleus พวก dihydroflavonol และ flavanone ให้สีแดงถึงม่วงแดง ส่วน flavone , chalcone , aurone ให้สีส้ม

2.1.2 วิธีทดสอบของพิว (พิว,1948)

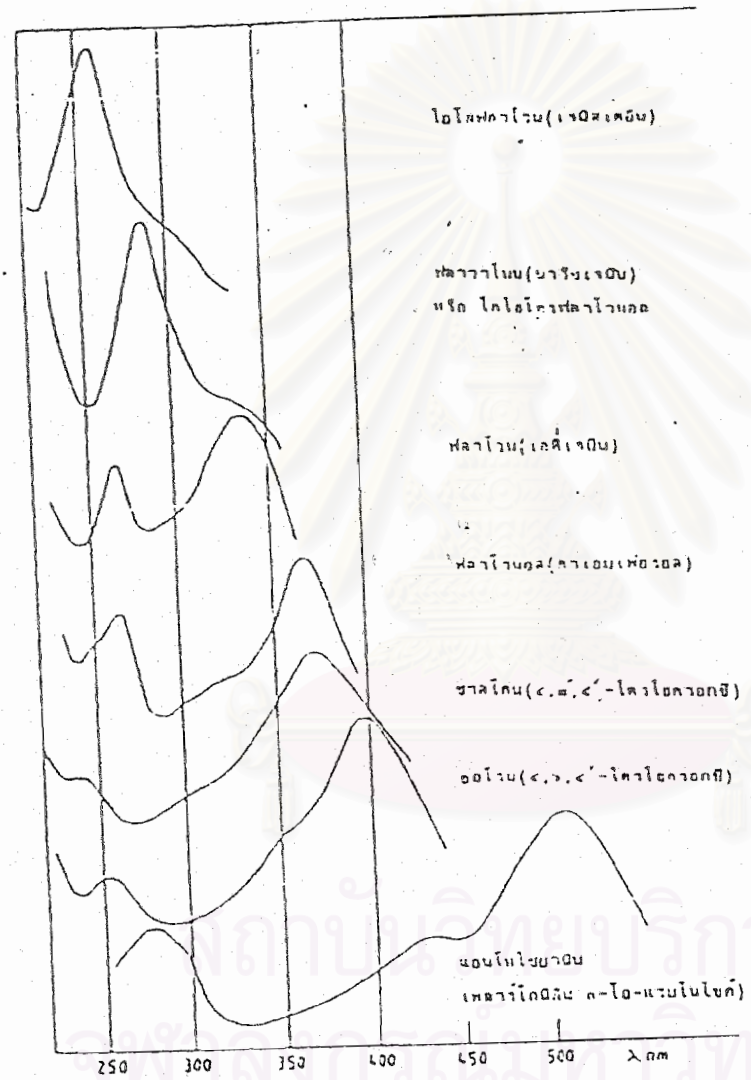
นำสารสกัด 1 มิลลิลิตร มาระเหยให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ละลายด้วยเมทานอล 1 มิลลิลิตร เติมผงสังกะสี 0.5 กรัม และ 2 N กรดไฮโดรคลอริก 2 หยด เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที เติมกรดไฮโดรคลอริกข้มข้น 10 หยด สังเกตุสีแดงเข้มภายใน 2-5 นาที flavanone และ flavonoid กลุ่มอื่นๆ ให้สีชมพูอ่อนหรือไม่เกิดสี

2.2 การวัดสเปกตรัมของสารสกัด

เทคนิคนี้มีประโยชน์ในการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของฟลาโวนอยด์มาก ใช้บอกกลุ่มของฟลาโวนอยด์และบอกด้วยว่าสารนั้นมีกลุ่มไฮดรอกซิลหรือเมทอกซิล จับอยู่กับคาร์บอนใด ซึ่งมีขั้นตอนการทำคือ

นำสารสกัดมา 1 มิลลิลิตร ระเหยให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 70 องศาเซียส ละลายด้วยเมทานอล 1 มิลลิลิตร แล้วนำมาวัดสเปกตรัมของสารสกัดโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์(Beckman)DU 650 จากนั้นนำ

ผลมาเทียบกับสเปกตรัมของฟลาโวนอยด์แต่ละกลุ่ม



รูปที่ 5 ลักษณะของสเปกตรัมจากฟลาโวนอยด์ชนิดต่าง ๆ (สุรัตนา อำนวยผล, 2531)

3. การศึกษาผลของฟลาโวนอยด์จากส่วนต่างๆ ต่อการเจริญของเมล็ดไมยราบยักษ์

3.1 การเตรียมเมล็ดไมยราบยักษ์

แช่เมล็ดไมยราบยักษ์ในน้ำอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที จากนั้นนำมาแช่น้ำที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน จากนั้นคัดเลือกเฉพาะเมล็ดที่พองไปใช้

3.2 การทดสอบผลของสารสกัดต่อการเจริญของเมล็ดไมยราบยักษ์

นำจานแก้วและกระดาษกรองที่ตัดพอดีกับจานแก้วไปอบฆ่าเชื้อ จากนั้นนำกระดาษกรองวางบนจานแก้ว แล้วปิเปตสารฟลาโวนอยด์ในปริมาณที่ต้องการดังตารางที่ 1 โดยในการทดสอบจะใช้ 3 ความเข้มข้นในแต่ละส่วนของธูปฤาษี

ตารางที่ 1 ปริมาณฟลาโวนอยด์ที่ต้องการนำมาทดสอบการยับยั้ง

จานแก้ว	สารฟลาโวนอยด์(กรัม)	ความเข้มข้น(กรัม/มล.)
1	-	0
2	0.1	6.6×10^{-3}
3	0.5	33.3×10^{-3}
4	1.0	66.6×10^{-3}

หมายเหตุ

จานที่ 1 (ควบคุม) ใส่น้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร

จานที่ 2-4 (ใส่สารสกัด) ใส่สารสกัดตามตาราง ระเหยให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วเติมน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร

วิธีคำนวนเพื่อเตรียมความเข้มข้น

คำนวนโดยใช้ค่าปริมาณฟลาโวนอยด์ ต่อ 1 มิลลิลิตร ที่ได้จากวิธีข้อ 1.3.5

สารสกัดดอก 1 มิลลิลิตร มีฟลาโวนอยด์ = 0.01 กรัม

ต้องใช้สารสกัด X มิลลิลิตรที่มีฟลาโวนอยด์ = 0.1 กรัม

ฉะนั้นจะได้ค่า X = 10 จึงต้องใส่สารสกัดฟลาโวนอยด์ 10 มิลลิลิตร แล้วนำไประเหยดังที่ได้กล่าวไว้แล้ว

เมื่อเตรียมได้ความเข้มข้นที่ต้องการแล้ว ใส่เมล็ด ไมยราบยักษ์ที่พอง 20 เมล็ดต่อ 1 จานแก้ว ติดตามผลการงอกทุกวัน นับจำนวนเมล็ดที่งอก แล้ววัดความยาวของลำต้น บันทึกผลเพื่อคำนวนเปอร์เซนต์การยับยั้งการงอก

3.3 การคำนวนเปอร์เซนต์การยับยั้งการงอก

ใช้สูตร เปอร์เซนต์การงอก = $\frac{C-T}{C} \times 100$

โดย C = จำนวนเมล็ดที่งอกในจานควบคุม

T = จำนวนเมล็ดที่งอกในจานที่มีสารสกัด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการทดลอง

1. ปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้

ตารางที่ 2 ปริมาณฟลาโวนอยด์ในส่วนต่างๆของธูปฤาษี

ส่วนต่างๆของธูปฤาษี	กรัมเปอร์เซนต์
ดอก	6.63
ใบส่วนบน	7.75
ใบส่วนล่าง	6.15
ต้น	5.50

2. การตรวจสอบชนิดของฟลาโวนอยด์

2.1 การทดสอบด้วยปฏิกิริยาเคมี

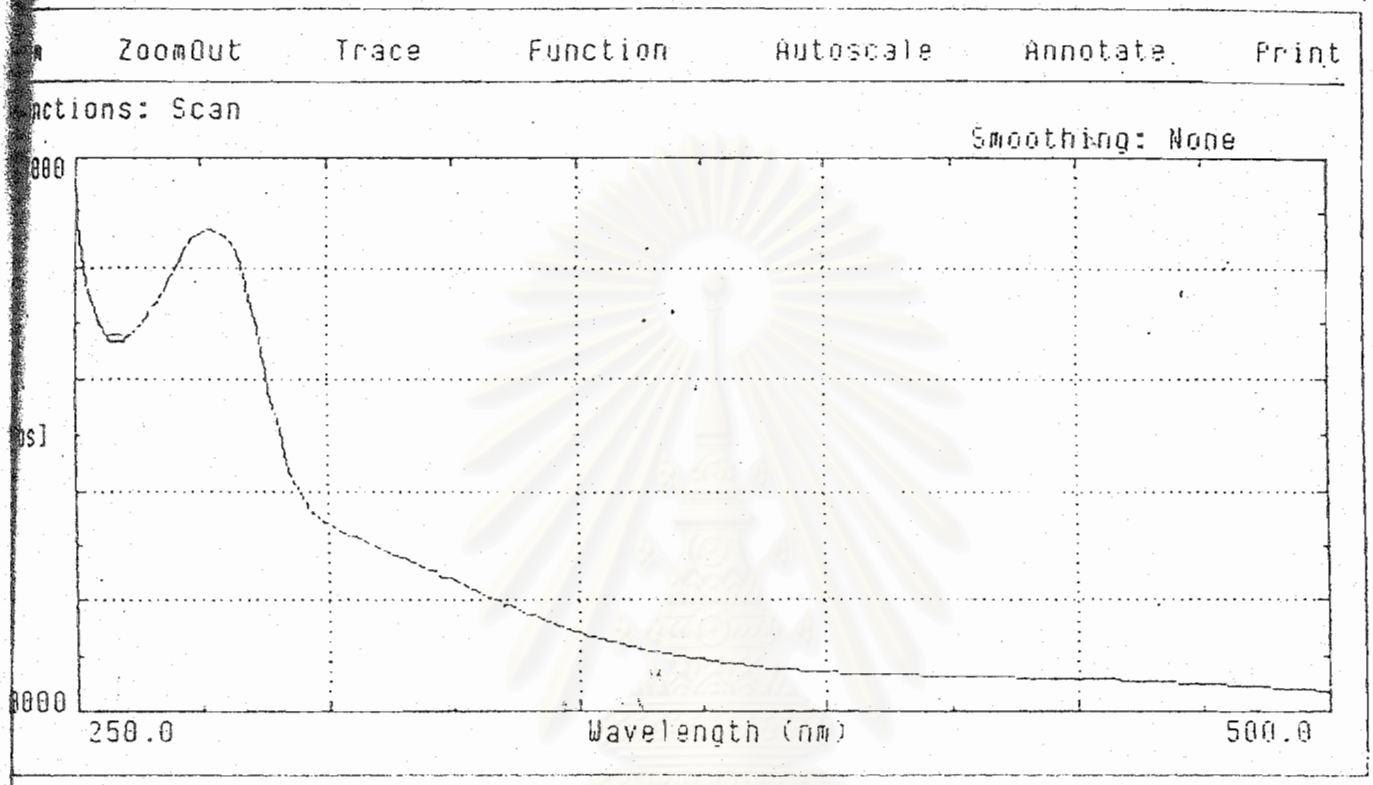
ตารางที่ 3 ผลการทดสอบโดยปฏิกิริยาเคมีของสารสกัดจากดอก ใบส่วนบน ใบส่วนล่าง และต้นของธูปฤาษี

วิธีทดสอบ	ผลที่สังเกตุได้	แสดงว่า
ชิโนดะ	(+)สีแดง	มีสารพวก dihydroflavonol หรือ flavanone
พิว	(-)สีชมพูอ่อนและสีอื่นๆ	มีสารพวก flavanone และกลุ่มอื่นๆ

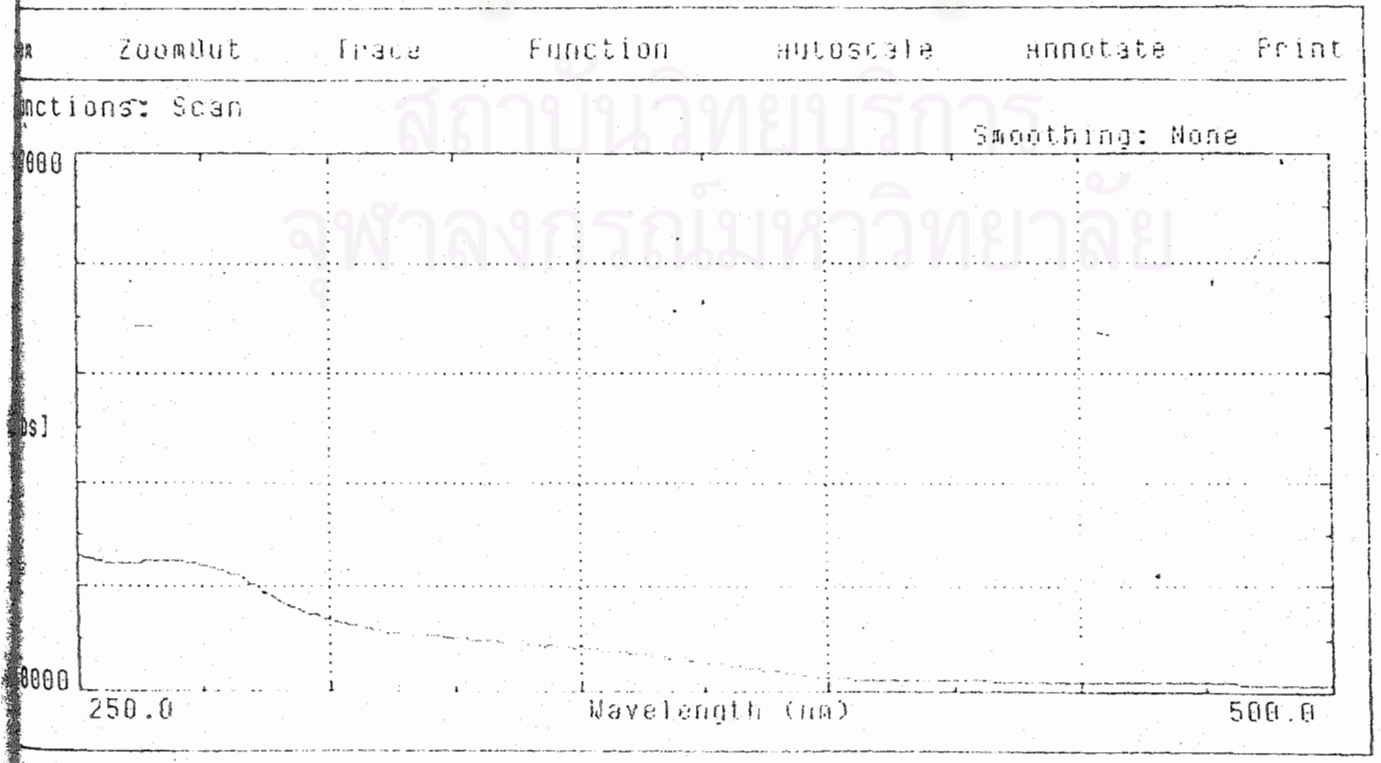
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 การทดสอบด้วยสเปกตรัม

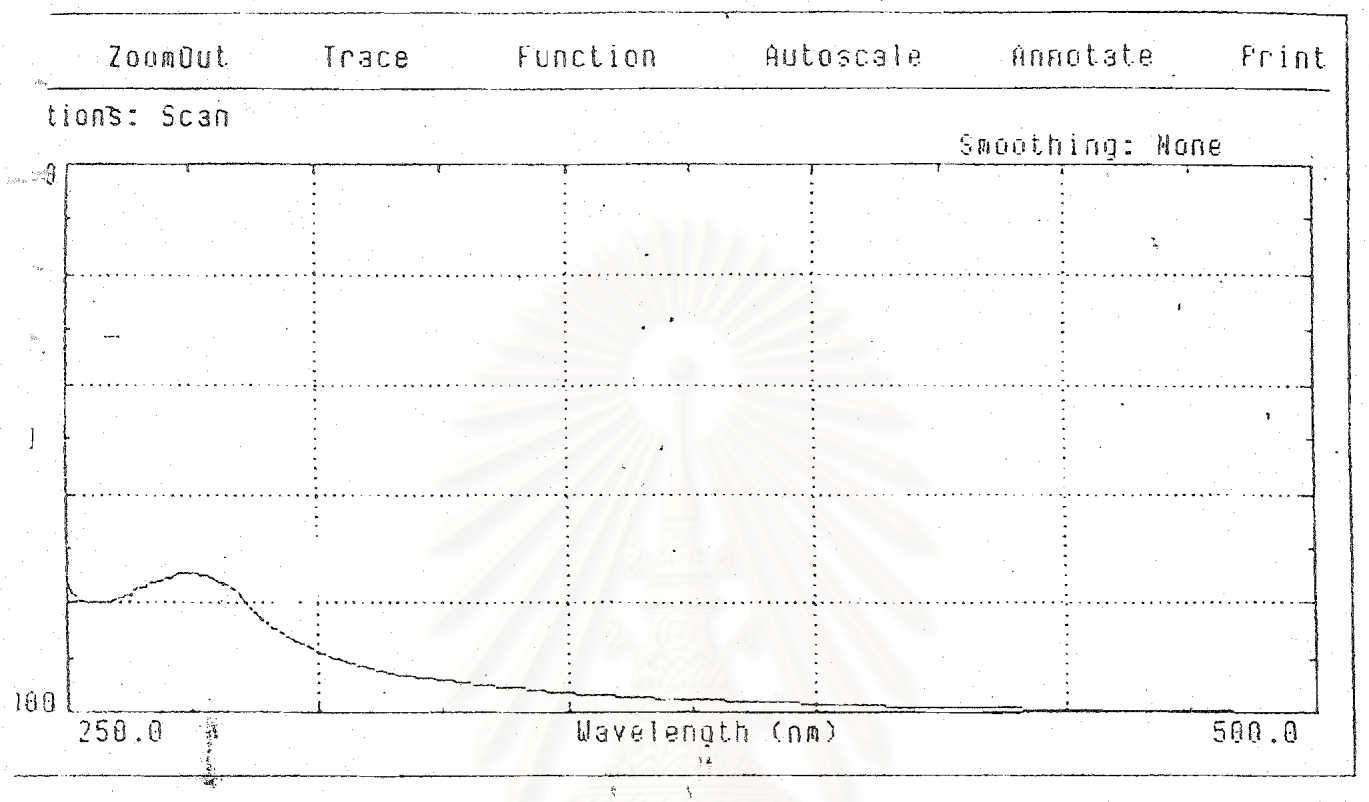
รูปที่ 7 ลักษณะสเปกตรัมของฟลาโวนอยด์จากดอกธูปฤาษี



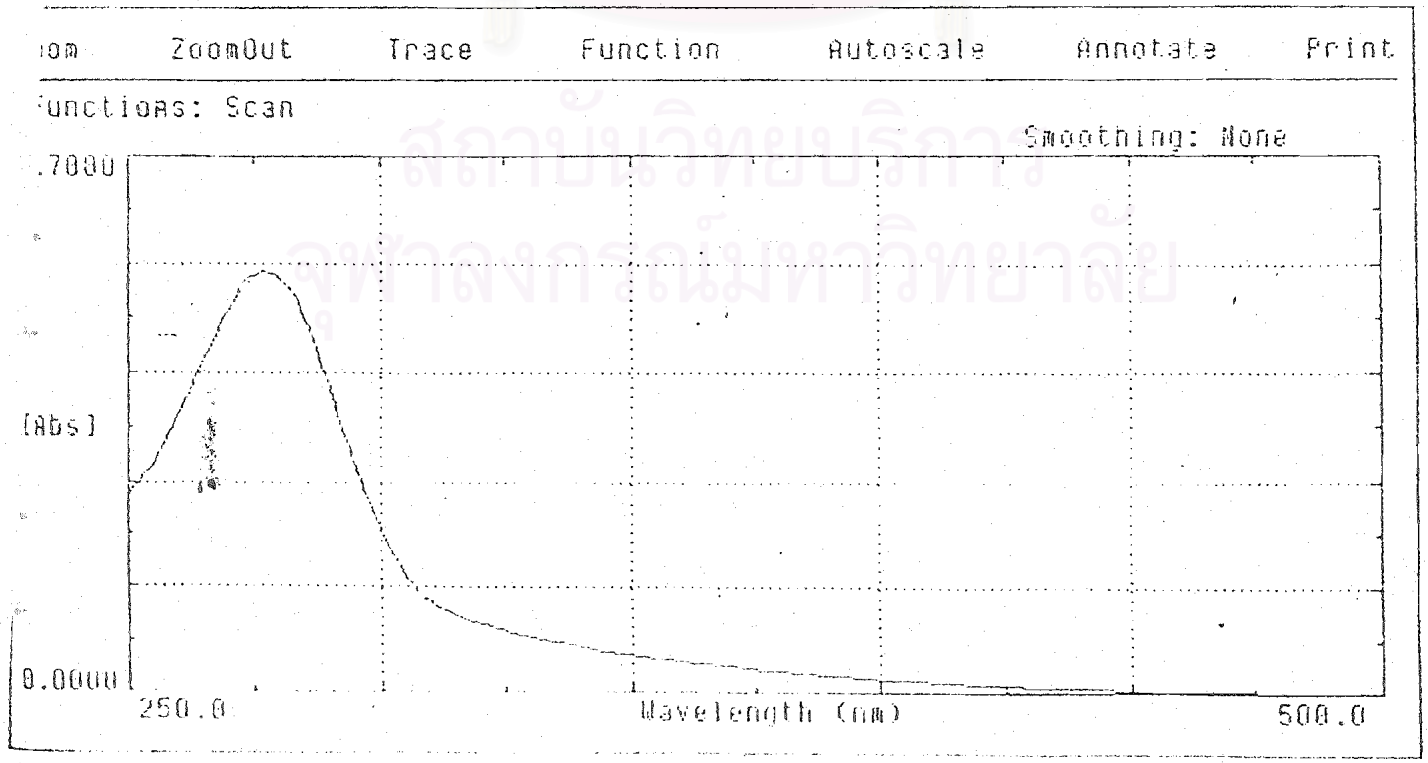
รูปที่ 8 ลักษณะสเปกตรัมของฟลาโวนอยด์จากใบส่วนบนธูปฤาษี



รูปที่ 9 ลักษณะสเปกตรัมของฟลาโวนอยด์จากใบส่วนล่างธูปฤาษี



รูปที่ 10 ลักษณะสเปกตรัมของฟลาโวนอยด์จากต้นธูปฤาษี



จากลักษณะสเปกตรัมของทุกๆส่วนของธูปฤาษี พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 275 และ 310 นาโนเมตร เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับรูปที่ 5 พบว่าตรงกับช่วงการดูดกลืนแสงของฟลาวาโนน ดังนั้นอาจสรุปได้ว่าสารสกัดเป็นฟลาโวนอยด์ชนิดฟลาวาโนน

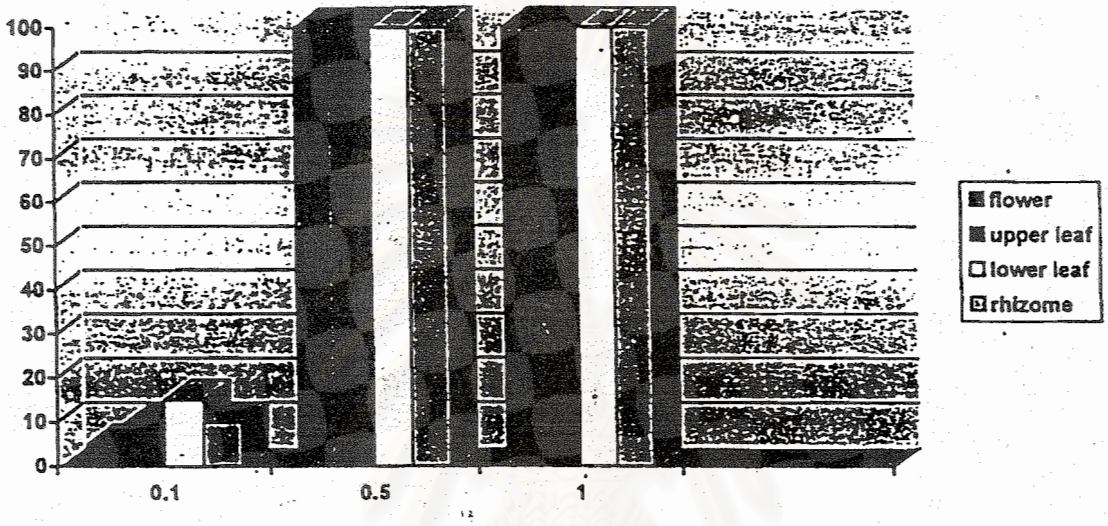
3. การศึกษาผลของฟลาโวนอยด์ต่อการงอกของเมล็ดไมยราบยักษ์

ตารางที่ 4 ผลของฟลาโวนอยด์ต่อการงอกของเมล็ดไมยราบยักษ์ ในเวลา 5 วัน

ปริมาณฟลาโวนอยด์ (กรัม)	ส่วนของธูปฤาษี	จำนวนเมล็ดที่งอก	ความยาวลำต้นเฉลี่ย (ซม.)	เปอร์เซนต์ยับยั้งการงอก
CONTROL	-	20	2.56	0
0.1	ดอก	19	1.37	5.0
	ใบส่วนบน	18	1.11	10.0
	ใบส่วนล่าง	17	1.58	15.0
	ต้น	18	0.86	10.0
0.5	ดอก	0	0	100
	ใบส่วนบน	0	0	100
	ใบส่วนล่าง	0	0	100
	ต้น	0	0	100
1.0	ดอก	0	0	100
	ใบส่วนบน	0	0	100
	ใบส่วนล่าง	0	0	100
	ต้น	0	0	100

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลของความเข้มข้นของฟลาโวนอยด์จากดอก ใบส่วนบน ใบส่วนล่าง และต้นของธูปฤาษี ต่อการเจริญของเมล็ดไมยราบยักษ์เมื่อทำการทดลองได้ 5 วัน

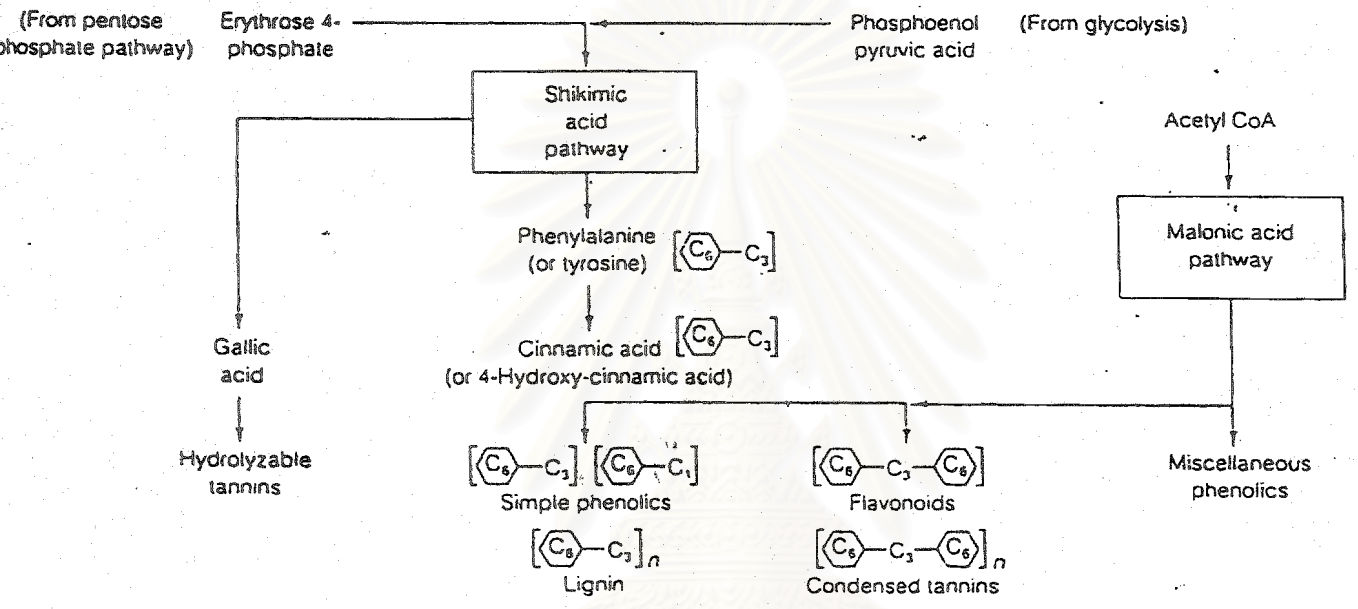


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

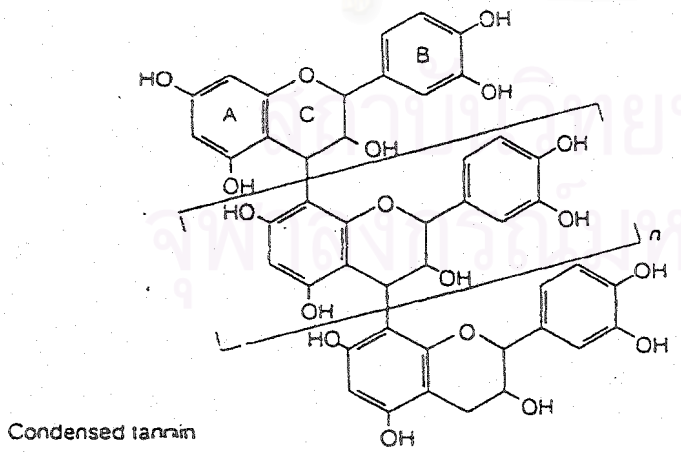
วิจารณ์ผลการทดลอง

1. การหาปริมาณฟลาโวนอยด์

ผลการสกัดได้ปริมาณน้อยทั้งนี้อาจเพราะสูญเสียไปกับผ้ากลอสที่ใช้กรอง ฉะนั้นน่าจะปรับปรุงมาใช้วิธี Suction แทน อีกสาเหตุหนึ่งอาจเป็นเพราะสารฟลาโวนอยด์ได้เปลี่ยนแปลงไปเป็น condensed tannin ในพืช ดังภาพ



รูปที่ 11 การสังเคราะห์ condensed tannins ในพืช



รูปที่ 12 โครงสร้าง condensed tannins ซึ่งเกิดขึ้นจากหน่วยย่อยคือฟลาโวนอยด์ (Frank B. Salibuty, Cleon W.Ross)

2. การตรวจสอบชนิดของสารสกัดฟลาโวนอยด์

2.1 การใช้ปฏิกิริยาเคมี โดยวิธีของชิโนดะพบว่าได้ผลบวก กล่าวคือสังเกตเห็นสารละลายสีแดงเข้มในสารสกัดจากทุกส่วนของธูปฤาษี แสดงว่ามีสารฟลาโวนอยด์ชนิดฟลาวาโนน และไดไฮโดรฟลาโวนอล และเมื่อทดสอบโดยวิธีของพิวซึ่งใช้ทดสอบไดไฮโดรฟลาโวนอล ซึ่งให้สีแดงเข้ม พบว่าสารสกัดจากทุกส่วนของธูปฤาษีให้ผลลบ คือสังเกตเห็นสีชมพูอ่อนและสีอื่น ๆ ฉะนั้นจากผลการทดสอบโดยปฏิกิริยาเคมีนั้นอาจสรุปได้ว่าในสารสกัดจากดอก ใบส่วนบน ใบส่วนล่าง ต้นมีฟลาโวนอยด์อย่างน้อย 1 ชนิดคือ ฟลาโวโนน

2.2 การวัดสเปกตรัม

เมื่อนำสารสกัดจากทุกส่วนไปวัดค่าดูดกลืนแสงเพื่อตรวจสอบสเปกตรัมพบว่าสารสกัดจากทุกส่วนมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 275 และ 310 นาโนเมตร เมื่อเทียบกับเอกสารอ้างอิงแล้ว พบว่ามีช่วงเดียวกันกับฟลาวาโนนหรือไดไฮโดรฟลาโวนอล แต่จากปฏิกิริยาเคมีที่กล่าวมาพบว่า ในสารสกัดจากทุกส่วนไม่มีไดไฮโดรฟลาโวนอล

ดังนั้นจากปฏิกิริยาเคมีและลักษณะสเปกตรัมของสารสกัดทำให้สามารถสรุปได้ว่าสารสกัดจากดอก ใบส่วนบน ใบส่วนล่าง และต้นของธูปฤาษี น่าจะมีสารฟลาโวนอยด์อย่างน้อย 1 ชนิด คือฟลาวาโนน

อนึ่งในการทดสอบชนิดของฟลาโวนอยด์ได้อย่างแม่นยำขึ้นอาจใช้วิธีการอื่นเช่น นิวเคลียร์แมกเนติก เรโซแนนซ์ สเปกตรัม (NMR) (สุรัตนา, 2531)

3. ผลของความเข้มข้นต่อการเจริญของเมล็ดไมยราบยักษ์

ความเข้มข้นที่จะใช้ในแต่ละส่วนของสารสกัดจากธูปฤาษีคือ 0.0066, 0.033, 0.066 กรัมต่อมิลลิลิตร จากผลการทดลองเมื่อครบ 5 วัน พบว่า ฟลาโวนอยด์จากดอก ใบส่วนบน ใบส่วนล่างและต้นของธูปฤาษี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สามารถยับยั้งการงอกของเมล็ดไมยราบยักษ์ได้ ประสิทธิภาพการยับยั้งขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัด กล่าวคือ สารสกัดที่ความเข้มข้น 0.033 กรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งการงอกได้อย่างสมบูรณ์ สาเหตุของการยับยั้งนี้อาจเป็นผลมาจากฟลาโวนอยด์ออกฤทธิ์มีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ IAA-oxidase (Rice, 1974) ซึ่งมีฤทธิ์ทำลาย IAA หรือที่รู้จักในนามออกซิน ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่จำเป็นต่อพืช มีผลช่วยในการยืดตัวของลำต้น และยอดอ่อน และผลของออกซินจะขึ้นกับความเข้มข้นด้วย (Frank B. Salibury, Cleon W.Ross) นอกจากนี้ยังมีรายงานอีกว่าฟลาโวนอยด์สามารถยับยั้งการขนส่งออกซินได้ โดยการทำงานร่วมกับตัวยับยั้ง

ดังจะเห็นจากการทดลอง ในความเข้มข้นต่ำ ๆ เมล็ดสามารถงอกได้แต่ต้นจะหงิกงอและสั้นกว่าเมล็ดที่งอกในสภาวะควบคุม ซึ่งลำต้นจะตรงและมีความยาวมากกว่า

จากการศึกษาครั้งนี้ จึงสามารถนำสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ คือดอก ใบและต้นของธูปฤาษีไปกำจัดวัชพืชไมยราบยักษ์ได้แทนการใช้สารเคมีซึ่งอันตราย และมีผลตกค้างในธรรมชาติ นอกจากนั้นยังเป็นการลดปริมาณของวัชพืชธูปฤาษีอีกด้วย

สรุปผลการทดลอง

1. การหาปริมาณฟลาโวนอยด์

ใบส่วนบนของธูปฤาษีมีปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุด รองลงมาคือ ดอก ใบส่วนล่าง และลำต้นตามลำดับ

2. การตรวจสอบชนิดของฟลาโวนอยด์

ฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้อย่างน้อย 1 ชนิดคือฟลาวาโนน

3. การทดสอบผลของฟลาโวนอยด์ต่อการเจริญของเมล็ดไมยราบยักษ์

สารสกัดฟลาโวนอยด์มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเมล็ดไมยราบยักษ์ ประสิทธิภาพของการยับยั้งขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัด กล่าวคือ สารสกัดเท่ากับ 0.033 กรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการงอกได้อย่างสมบูรณ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารหมายเลข 3

ผลทางอัลลีโลพาธิก ของวัชพืชธูปฤาษีต่อการเจริญของ วัชพืชไมยราบยักษ์ ในแปลงทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มูลเหตุจูงใจ

ไมยราบยักษ์เป็นวัชพืชที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในเขตร้อนของทวีปอเมริกา อาฟริกา และเอเชียบางส่วน เช่น ชวาตะวันตก (Backer and Bakhuizen, 1963) มีการนำเข้ามาสู่ประเทศไทยในปี พ.ศ. 2495 เพื่อใช้เป็นพืชคลุมดินและบำรุงดินในแปลงเพาะกล้ายาสูบในจังหวัดเชียงใหม่ นอกจากนี้อาจมีความประสงค์เพื่อใช้เป็นไม้ยึดฝัง ป้องกันการพังทลายของตลิ่ง (ไพฑูรย์, 2521 : จำรัส, 2520) เนื่องจากไมยราบยักษ์เป็นวัชพืชที่สามารถผลิตเมล็ดที่ทนต่อสภาพแวดล้อมเป็นจำนวนมาก และมีความทนต่อสภาพแวดล้อมอย่างมาก ทำให้มีการแพร่ระบาดอย่างมากทางภาคเหนือ และอีกหลาย ๆ จังหวัด สามารถเจริญเติบโตได้ดีในบริเวณริมน้ำ และในแหล่งน้ำต่าง ๆ ซึ่งเป็นผลทำให้เกิดปัญหามากมาย เช่น กีดขวางการไหลของน้ำจากเขื่อน และแหล่งน้ำตามธรรมชาติไปยังบริเวณที่มีการทำกสิกรรม กีดขวางการคมนาคมทางน้ำ และยังเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของแมลงศัตรูพืชอื่น ๆ ส่วนฐูปฤาษีเป็นวัชพืชที่สามารถขยายพันธุ์ได้รวดเร็วเช่นเดียวกัน ละอองเกสรสามารถทำให้เกิดอาการภูมิแพ้ได้ การเจริญเติบโตคล้ายต้นหญ้าหนาทึบ ไม่พบวัชพืชอื่นบริเวณนั้นอาจมีการยับยั้งการเจริญของพืชอื่นได้ ดังนั้นการนำสารสกัดจากฐูปฤาษีมายับยั้งการเจริญของเมล็ดไมยราบยักษ์ ก็อาจเป็นแนวทางที่จะเป็นการควบคุมวัชพืชทั้งสองชนิดทำให้มีการลดลงได้ รวมถึงเป็นการลดการใช้สารเคมีปราบวัชพืชซึ่งจะส่งผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมได้อีกด้วย

Molisch (1927) อาจถือได้ว่าเป็นคนแรกที่ให้ความหมายของอัลลีโลพาธี ต่อจากนั้นมาได้มีการศึกษาเกี่ยวกับเรื่องนี้อย่างมากมาย จนถึงปี ค.ศ. 1979, Rice ได้รายงานว่ามีการศึกษาด้านนี้มากกว่า 400 เรื่องแล้ว ดังนั้นเราอาจนำปรากฏการณ์นี้มาช่วยในการควบคุมการแพร่ระบาดวัชพืช ซึ่งจะนำไปสู่การลดการใช้สารเคมีปราบวัชพืชได้ อาจนับได้ว่าเป็นแนวทางการลดสารตกค้างในสิ่งแวดล้อมได้อีกทางหนึ่ง

ไมยราบยักษ์ มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Mimosa pigra* Linn. ชื่อสามัญคือ Giant Mimosa หรือที่ชาวไทยรู้จักในนาม ไมยราบหลวง หรือกระถินน้ำ เป็นไม้พุ่มยืนต้นขนาดกลางในพืชตระกูลถั่วชนิดหนึ่ง มีความสูงประมาณ 1 - 5 เมตร ลักษณะลำต้น ใบ ดอกคล้ายกระถิน แตกต่างที่ไมยราบยักษ์มีดอกสีชมพูปนม่วง และมีหนามคมทั้งที่ใบ และลำต้น เมล็ดอยู่ในฝักสีเขียวปนน้ำตาลเมื่อแก่จัด ใบมีความไวต่อการสัมผัสน้อยกว่าไมยราบเถา (*Mimossa invisa* Mart.) ไมยราบยักษ์สามารถปรับตัวดำรงชีวิตได้ดีในดินแทบทุกชนิด และยังสามารถดำรงชีวิตได้ในสภาพน้ำท่วมขังได้อีกด้วย จัดว่าเป็นพืชที่ทนต่อสภาพแวดล้อมเป็นอย่างมาก และยากต่อการทำลาย ด้วยสาเหตุเหล่านี้ไมยราบยักษ์จึงมีการแพร่ระบาดในแทบทุกภาคของประเทศไทย โดยเฉพาะทางภาคเหนือแถบจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง มีพื้นที่ระบาดมากกว่า 3 แสนไร่ทั้งทางบกและทางน้ำ ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาต่าง ๆ มากมาย เช่น กีดขวางการไหลของน้ำจากเขื่อน กีดขวางการคมนาคมทางน้ำ เป็นวัชพืชคอยแย่งแสงแดดและอาหารจากพืชที่ปลูก และยังเป็นแหล่งอาศัยของแมลงศัตรูพืชอื่น ๆ อีกด้วยทำให้เกษตรกรต้องเสียค่าใช้จ่ายในการกำจัดวัชพืชนี้ สำหรับแนวทางกำจัดที่มีผู้ศึกษาแล้วพบว่าวิธีที่ได้ผลดี คือ การป้องกันและกำจัดโดยใช้สารเคมี เช่น แอมโมเนียม ซัลฟาเมต (Ammonuim sulfamate), ฟอสซามีน (Fosamine), โบรมาซิล (Bromacil) เป็นต้น ซึ่งสารเคมีเหล่านี้แม้จะมีผลต่อคนและสัตว์ต่ำ แต่จะมีผลต่อพืชชนิดอื่นบริเวณข้างเคียง ต้องใช้อย่างระมัดระวัง (ดร. ไพฑูรย์ กิตติพงษ์)

ความสำคัญ และความเป็นมาของโครงการ

อัลลีโลพาธี (Allelopathy) เป็นคำมาจากภาษากรีก แปลว่าความเป็นพิษหรือผลเสียซึ่งกันและกัน (Mutual harm) คือ ปรากฏการณ์ที่พืชชนิดหนึ่งปล่อยสารประกอบทางเคมีออกสู่สิ่งแวดล้อม ซึ่งมีผลในการยับยั้ง หรือเร่งการเจริญเติบโตของพืชอื่น (Rice, 1984 : Whittaker, 1970 : Turkry, 1969) ซึ่งอาจเป็นพืชคนละชนิด (Interspecies toxicity) หรือพืชชนิดเดียวกัน (Intraspecies toxicity / Autotoxicity) (Putuam and Tang, 1986) ปรากฏการณ์นี้เกิดขึ้นทั่วไป เช่น ระบบนิเวศการเกษตร ทุ่งหญ้า ในน้ำทะเล หรือระบบนิเวศป่าไม้ (Rice, 1984) สารประกอบทางเคมีที่พืชปล่อยออกมานั้น เรียกว่า สารอัลลีโลเคมิค (Allelochemical) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมของพืช และมีคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของพืช แต่ในระดับปริมาณต่ำสามารถกระตุ้น และเร่งการเจริญเติบโตของพืช (Rice, 1984) โดยจะมีบทบาทต่อกระบวนการหายใจ การสังเคราะห์โปรตีน การสังเคราะห์แสงของพืช และกระบวนการสำคัญอื่น ๆ ซึ่งสามารถแบ่งวิธีการปล่อยสารเคมีออกสู่สิ่งแวดล้อมของพืชออกเป็น 4 วิธี คือ

1. การระเหย (Volatilization)
2. การชะล้างโดยฝน (Leaching)
3. การปลดปล่อยออกทางราก (Root exudation)
4. การย่อยสลายซาก (Decomposition)

สารอัลลีโลเคมิค (Allelochemical) ที่มีการพิสูจน์ทราบนั้น Rice (1984) และ Putnum (1986) แบ่งออกเป็นกลุ่มต่าง ๆ ได้แก่ ก๊าซพิษ, กรดอินทรีย์และอัลดีไฮด์, กรดอะโรมาติก, น้ำตาลแลคโตนไม่อิ่มตัว, คูมาริน, ควิโนน, ฟลาโวนอยด์, แทนนิน, อัลคาลอยด์, เทอร์พีนอยด์ และสเตอรอยด์ เป็นต้น

นอกจากนี้ยังไม่มีการรายงานว่าสารเคมีเหล่านี้สามารถกำจัดเมล็ดไมยราบยักษ์ที่เป็นสาเหตุหลักของการระบาดได้

นักวิจัยกองวัชพืช กรมชลประทาน พบว่าสารสกัดจากธูปฤาษี (*Typha angustifolia* Linn.) หรือมีอีกชื่อหนึ่งว่า กกช้าง จัดว่าเป็นวัชพืชที่มีการแพร่ระบาดมากเช่นเดียวกับไมยราบยักษ์ พบทั่วไปตามที่ที่มีน้ำขัง คล้ายกอหญ้าหนาทึบ สูงประมาณ 1 - 2 เมตร มีลำต้นใต้ดิน หรือที่เรียกว่า ไหล (Rhizome) ช่วยให้การขยายพันธุ์เร็วขึ้น (กองวัชพืช ชลประทาน) ใบมีลักษณะนูนยาวมากกว่า 1 เมตร กว้างประมาณ 5 - 8 มิลลิเมตร มีส่วนดอกที่คล้ายธูป ภายในเต็มไปด้วยเมล็ดเล็ก ๆ ที่สามารถเจริญได้ดีในที่ที่มีความชื้นพอเหมาะ และยังก่อให้เกิดอาการภูมิแพ้ได้อีกด้วย มีสารอัลลีโลเคมิคที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเมล็ดพืชบางชนิดได้ ดังนั้นจึงมีความคิดที่จะนำสารสกัดจากธูปฤาษีมายับยั้งการเจริญของเมล็ดไมยราบยักษ์ไปสู่แปลงทดลอง พบว่าผลการทดลองไม่สอดคล้องกับผลการทดลองในห้องปฏิบัติการ

ดังนั้น จึงทำการเปลี่ยนแปลงปัจจัยสภาวะต่าง ๆ เพื่อทำการศึกษาต่อไป ดังตารางที่ 1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 การเปลี่ยนแปลงปัจจัยบางอย่างที่อาจมีผลต่อการทดลอง

ปัจจัยที่มีผล	ปัญหาที่เกิดขึ้น	ที่สภาวะเดิม	ที่สภาวะใหม่
1. ช่วงความเข้มข้นของสารสกัด	ความเข้มข้นต่ำเกิดไป	0.0094 - 0.0950 กรัมของดอกฐูปฤาษีต่อมิลลิลิตร	เพิ่มช่วงความเข้มข้นเป็น 0.025, 0.050, 0.075, 0.100, 0.200 และ 0.300 กรัมของดอกฐูปฤาษีต่อมิลลิลิตร
2. ดินที่ใช้ในการทดลอง	มีความชื้นไม่เพียงพอทำให้ดินแตก	หลังให้ราดสกัดแล้วคลุมด้วยแผ่นพลาสติกหลาย ๆ กระบะ	คลุมกระบะด้วยแผ่นพลาสติกแต่ละกระบะและปิดแผ่นพลาสติกให้น้ำระเหยออกไปน้อยที่สุด
		ราดสารสกัดเพียง 1000 มิลลิลิตร ต่อดิน 35 กิโลกรัมต่อกระบะ	ราดสารสกัด 1500 มิลลิลิตร ต่อดิน 10 กิโลกกรัมต่อกระบะ
	อาจมีธาตุอาหารหรือปัจจัยจากสิ่งเจือปนอื่น ๆ	ใช้ดินจากบริเวณแปลงที่ทำการทดลอง	ใช้ดินที่มีสภาพร่วนซุย มีธาตุอาหารเหมาะต่อการเจริญของเมล็ดจากดินสำเร็จรูป
3. การเตรียมเมล็ดไมยราบยักษ์ก่อนการนำไปทดลอง	แปลงควบคุมมีเมล็ดงอกเพียงประมาณ 50 - 60 %	นำเมล็ดไมยราบยักษ์ไปแช่น้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที	นำเมล็ดไมยราบยักษ์ไปแช่น้ำที่ 80 °C เป็นเวลา 3 นาที

ปัจจัยที่มีผล	ปัญหาที่เกิดขึ้น	ที่สภาวะเดิม	ที่สภาวะใหม่
3. การเตรียมเมล็ดไมยราบยักษ์ก่อนการนำไปทดลอง (ต่อ)	แปลงควบคุมมีเมล็ดงอกเพียงประมาณ 50 - 60 %	หลังจากนั้นนำไปแช่สารสกัดความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง	หลังจากนั้นนำไปแช่สารสกัดความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 1 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สังเกตุได้ว่าการขยายการศึกษาออกไปสู่แปลงทดลอง มีผลกระทบจากสิ่งแวดล้อม (Environment effect) เกิดขึ้นมากมายที่ต้องมีการควบคุม นอกจากนี้ยังมีความตรงภายใน และความตรงภายนอกที่มีผลกระทบต่อการทดลอง ความตรงภายใน คือ คุณลักษณะที่สามารถสรุปได้ว่าผลการทดลองเกิดจากสิ่งแวดล้อม ไม่ได้เกิดจากปัจจัยอื่นร่วมด้วย ความตรงภายนอก คือ คุณลักษณะที่สามารถขยายการสรุปผลการทดลองออกไปครอบคลุมในกลุ่มประชากรที่ใหญ่กว่าได้ ซึ่งคาดว่าคาดหวังว่าผลการทดลองที่ได้จะมีความตรงภายนอก และความตรงภายในสูง เนื่องจากมีการควบคุมปัจจัยต่าง ๆ มากพอสมควร กอปรกับการใช้การออกแบบแปลงทดลองเป็นแบบสุ่มที่เรียกว่า Randomized Complete Block (RCB) Design ซึ่งจะเป็นการลดการซ้ำของกระบะทดลองที่อยู่ติดกันได้ และมีการใช้ค่าทางสถิติเพื่อพิจารณาข้อมูลอีกด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุดประสงค์ของโครงการ

เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากธูปฤาษีต่อการเจริญของเมล็ดไมยราบยักษ์ในแปลงทดลอง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถลดจำนวนวัชพืชทั้งสองชนิดได้ โดยทางชีวภาพ
2. ลดการใช้สารเคมีปราบวัชพืช ทำให้สารตกค้างในดินลดลง

อุปกรณ์และสารเคมี

1. กระบะไม้ขนาด 50 × 50 เซนติเมตร จำนวน 21 กระบะ
2. ถังน้ำ
3. บัวรดน้ำ
4. แผ่นพลาสติก สำหรับคลุมกระบะด้านบน และรองก้นกระบะ
5. กระบอกตวง
6. ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ
7. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
8. ดอกธูปฤาษี
9. เมล็ดไมยราบยักษ์
10. น้ำกลั่น
11. ดินผสมสำเร็จรูป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขั้นตอนในการดำเนินการทดลอง

1. การเตรียมแปลงทดลอง

เตรียมกระบะไม้ขนาด 50 × 50 เซนติเมตร ที่รองก้นกระบะด้วยแผ่นพลาสติกจำนวน 21 กระบะ ใส่ดินผสมสำเร็จรูปซึ่งมีสภาพดินและธาตุอาหารเหมาะสมสำหรับการงอกของเมล็ด น้ำหนัก 10 กิโลกรัมต่อกระบะ

2. การเก็บตัวอย่าง

ดอกของฐูปฤาษีที่ได้จากแปลงทดลองบริเวณกรมชลประทาน จังหวัดนนทบุรี มาแกะส่วนแกนกลางออก นำส่วนของดอกที่แกะได้มาอบให้แห้งที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะใช้ในการทดลองต่อไป

3. การสกัดสารจากดอกฐูปฤาษี

นำส่วนดอกที่ได้จากการอบแห้งแล้ว มาชั่งน้ำหนักที่แน่นอนตามความเข้มข้นของสารสกัดที่ออกแบบไว้ตามตารางที่ 2 นำมาแช่ในน้ำกลั่นที่มีปริมาตรเป็น 10 เท่าของน้ำหนักของดอกฐูปฤาษีที่ชั่งไว้ ซึ่งเป็นปริมาตรที่สามารถท่วมดอกฐูปฤาษีได้พอดี ปิดฝาเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน กรองเอาส่วนกากออก ปรับความเข้มข้นให้เท่ากับค่าตามต้องการโดยการปรับปริมาตรให้เท่ากัน คือ 1500 มิลลิลิตร สารสกัดที่ความเข้มข้นสูง ๆ (200 และ 300 มิลลิกรัมของดอกฐูปฤาษีต่อมิลลิลิตร)

ตารางที่ 2 การเตรียมความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดจากดอกฐูปฤาษี

ความเข้มข้นของสารสกัด (กรัม / มล.)	0.025	0.050	0.075	0.100	0.200	0.300
ความเข้มข้นของสารสกัด (มก. / มล.)	25	50	75	100	200	300
น้ำหนักดอกฐูปฤาษี (กรัม)	37.5	75.0	112.5	150.0	300.0	450.0
สกัดด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 10 เท่า (มล.)	375	750	1125	1500	3000	4500
ปริมาตรสุดท้าย (มล.)	1500	1500	1500	1500	1500	1500

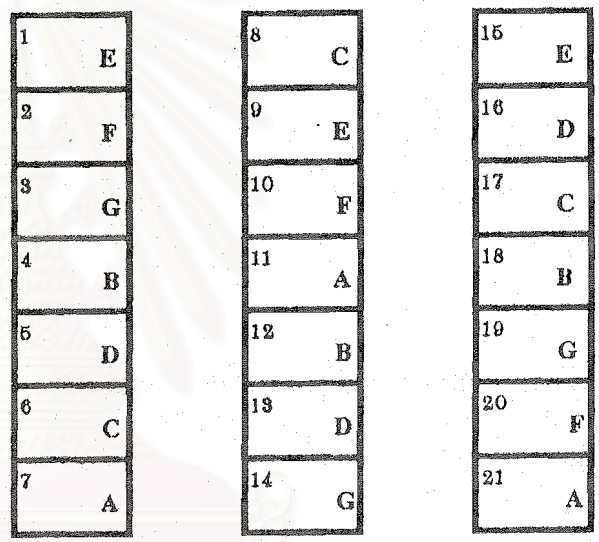
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นำไปลดปริมาตรสารสกัดโดยการระเหยในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส ส่วนสารสกัดที่เหลือทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่น จนได้ปริมาตรตามต้องการเช่นกัน

สำหรับการทดลองนี้จะทำการทดลองทั้งหมด 6 ความเข้มข้นของสารสกัด และอีกหนึ่งการทดลองควบคุม (น้ำกลั่น) โดยแต่ละความเข้มข้นจะทำการทดลองซ้ำ 3 ชุดการทดลอง นั่นคือจะมีชุดทดลองทั้งหมดเท่ากับ 21 ชุดการทดลอง การเติมสารสกัดความเข้มข้นต่าง ๆ ในแต่ละกระบะจะใช้แผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block (RCB) Design ซึ่งเป็นการสุ่มเติมสารสกัดโดยไม่เรียงตามความเข้มข้น แบ่งเป็น 3 Block เท่ากับจำนวนชุดการทดลองในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัด ดังแสดงในแผนภาพที่ 1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ความเข้มข้นของสารสกัด (มก. / มล.)	แบบจำลองในแปลงทดลอง
Control	A
25	B
50	C
75	D
100	E
200	F
300	G



หมายเหตุ

X = เลขที่กระบะในแปลงทดลอง

Y = ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ทำการทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. การเตรียมเมล็ดไมยราบยักษ์

เมล็ดไมยราบยักษ์เก็บจากบริเวณแปลงทดลอง กรมชลประทาน จังหวัดนนทบุรี นำไปแช่น้ำร้อนอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที (ใช้เมล็ดไมยราบยักษ์จำนวน 100 เมล็ดต่อกระบะ) ซึ่งช่วยให้เมล็ดมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูง (O.Wara - Aswapati and W.Watanadajsaree, 1985) หลังจากนั้นนำเมล็ดมาแช่สารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 1 คืน ก่อนทำการทดลอง เพื่อให้เมล็ดโดนสารสกัดอย่างเต็มที่ ส่วนชุดควบคุมนำไปแช่ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 1 วันก่อนทำการทดลองเช่นกัน

5. การเติมสารสกัด

นำเมล็ดที่ได้จากการแช่สารสกัดแล้ว มาปลูกในแต่ละกระบะที่เตรียมไว้ โดยการวางเมล็ดอย่างสุ่ม ๆ จำนวน 100 เมล็ด จากนั้นจึงเติมสารสกัดที่เตรียมไว้โดยใช้บัวรดน้ำเพื่อให้สารสกัดกระจายอยู่ดินทั้งกระบะ หลังจากนั้นคลุมกระบะด้วยแผ่นพลาสติกที่เตรียมไว้ เพื่อควบคุมปริมาณความชื้นในดินให้คงที่

6. การติดตามผลของสารสกัด

ติดตามผลทุก 7 วัน โดยการนับจำนวนเมล็ดไมยราบยักษ์ที่งอกทั้งหมดในแต่ละกระบะ และการสุ่มวัดความยาวของต้นแต่ละกระบะ ๆ ละ 10 ต้น นำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยของทั้ง 3 กระบะที่ความเข้มข้นเดียวกัน เมื่อครบ 3 สัปดาห์ให้ชั่งน้ำหนักแห้ง

คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสารสกัด

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอก} = \frac{C - T}{C}$$

เมื่อ C คือ จำนวนเมล็ดไมยราบยักษ์ที่งอกในสภาวะควบคุม

T คือ จำนวนเมล็ดไมยราบยักษ์ในสภาวะที่มีสารสกัด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการทดลอง

ตารางแสดงผลการทดลอง หลังปลูกเมล็ดไมยราบยักษ์พร้อมราดสารสกัดจากดอกวัชพืชธูปฤาษี 1 อาทิตย์

ความเข้มข้น(มก./มล.)	เปอร์เซ็นต์การงอก
Control	2.67
25	5.00
50	5.33
75	2.67
100	2.67
200	4.00
300	8.33

หมายเหตุ

ค่าเปอร์เซ็นต์การงอกเฉลี่ย หาได้จากการหาค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การงอกของการทดลองที่ความเข้มข้นเดียวกัน 3 กระบะ

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากค่าเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดไมยราบยักษ์ สังเกตได้ว่าทุกการทดลองมีปัญหาที่การงอกของเมล็ดไม่ดีเลย ซึ่งสันนิษฐานว่าอาจเกิดจากขั้นตอนการเตรียมเมล็ดไมยราบยักษ์ ซึ่งต้องนำมาแช่น้ำที่อุณหภูมิ 80 °C นาน 3 นาที อาจทำให้เมล็ดถูกทำลายจนไม่สามารถงอกได้ ซึ่งขั้นตอนนี้ต่อไปจะมีการปรับปรุงให้การงอกเพิ่มสูงขึ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปผลการทดลอง

การใช้สารสกัดจากวัชพืชธูปฤาษีในการยับยั้งการเจริญเติบโตของไมยราบยักษ์ในแปลงทดลอง ได้ผลที่ไม่สามารถสรุปได้ ผู้วิจัยมีความเห็นว่าการทดลองในแปลงอาจต้องการการควบคุมปัจจัยอื่น ๆ ที่น่าสนใจสำหรับการศึกษาในอนาคต เพื่อควบคุมการระบาดของวัชพืชไมยราบยักษ์ที่ระบาดโดยวิธีการทางชีววิธีต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หนังสืออ้างอิง

1. Frank B. Salibury, Cleon W.Ross. Plant Physiology 4 th editon
2. Rice, E.L. (1974). Allelopathy
3. Japan International Cooperation Agency . Major Weeds in Thailand
4. Applied Biochemist INC. (1979). How to Identify and Control Water Weeds and Algae 2nd Edition
5. ดร. ไพฑูรย์ กิตติพงษ์. ไมยราบยักษ์และการควบคุม. กองวิชาการ กรมวิชาการเกษตร
6. งานทดลองกำจัดวัชพืช กรมชลประทาน (2524). ไมยราบยักษ์
7. สมาคมวิทยาการวัชพืชแห่งประเทศไทย (2527). วิทยาการวัชพืช
8. ธวัชชัย วรพงศธร. หลักการวิจัยทางสาธารณสุขศาสตร์
9. ศิริพร ซึงสนธิพร (2535). วิทยานิพนธ์เรื่องผลทางอัลลิโลพาธิคของวัชพืชสาบหมาต่อการเจริญเติบโตของพืชปลูกและวัชพืชบางชนิด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย