



ใบรับรองวิทยานิพนธ์  
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พืชไร่)

ปริญญา

พืชไร่

พืชไร่นา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การโคลนบางส่วนของยีน *Alcohol Dehydrogenase* และยีน *Pyruvate Decarboxylase* ใน  
สบู่ดำภายใต้สภาพน้ำท่วม

Partial cloning of *Alcohol Dehydrogenase* and *Pyruvate Decarboxylase* in Physic nut  
under Waterlogging

นามผู้วิจัย นางสาวนัญญา รุ่งวิมล

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

( อาจารย์นงลักษณ์ เทียนเสรี, Ph.D. )

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

( รองศาสตราจารย์สนธิชัย จันทน์เปรม, Ph.D. )

หัวหน้าภาควิชา

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชเนษฎ์ ม้าคำพอง, Ph.D. )

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

( รองศาสตราจารย์กัญจนา วีระกุล, D.Agr. )

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. ....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การโคลนบางส่วนของยีน *Alcohol Dehydrogenase*  
และยีน *Pyruvate Decarboxylase* ในสับดูดำภายใต้สภาพน้ำท่วม

Partial cloning of *Alcohol Dehydrogenase*  
and *Pyruvate Decarboxylase* in Physic nut under Waterlogging

โดย

นางสาวนัญญา รุ่งทิวผล

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์  
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชไร่)

พ.ศ. 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วณัญญา ฐิติพล 2557: การโคลนบางส่วนของยีน *Alcohol Dehydrogenase* และยีน *Pyruvate Decarboxylase* ในสับปะรดภายใต้สภาวะน้ำท่วม ปรินญาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย (พืชไร่) สาขาพืชไร่ ภาควิชาพืชไร่ มหาวิทยาลัยปทุมธานีพนธ์หลัก: อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์นงลักษณ์ เทียนเสรี, Ph.D. 78 หน้า

ศึกษาการตอบสนองของสับปะรดพันธุ์ชัยนาทในระยะต้นกล้าอายุ 2 เดือน ภายใต้สภาวะน้ำท่วม เพื่อทดสอบวิธีการจำลองสภาวะน้ำท่วมและพารามิเตอร์ที่ใช้ยืนยันสภาพเครียดที่เกิดกับต้นกล้าสับปะรด ได้แก่ ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบ ( $\Psi_t$ ) ค่าประสิทธิภาพการให้แสงสูงสุด ( $\Phi_{dark}$ ) และการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐาน โดยนำต้นกล้าสับปะรดลงแช่น้ำที่ระดับความลึก 30 เซนติเมตร เป็นระยะเวลา 15 วัน พบว่า เมื่อได้รับสภาวะน้ำท่วมยาวนานขึ้น ค่า  $\Psi_t$  และ  $\Phi_{dark}$  ปรับลดลง และเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานชัดเจน ได้แก่ ใบเปลี่ยนสีจากสีเขียวเข้มเป็นสีเหลือง และสีน้ำตาล บริเวณโคนลำต้น พบอาการบวมพองและแตก ส่วนรากเปลี่ยนสีจากสีขาวเป็นสีน้ำตาลและเริ่มเน่าเป็นสีดำ

บ่งชี้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ *Alcohol Dehydrogenase (ADH)* และ *Pyruvate Decarboxylase (PDC)* โดยออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะกับยีนดังกล่าว เมื่อทำปฏิกิริยา PCR กับ first strand cDNA ที่ได้จากใบสับปะรดที่ได้รับสภาวะน้ำท่วม เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 286 และ 337 คู่เบส ตามลำดับ เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI พบว่า ลำดับเอ็นเอที่ได้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนยีน *ADH* ใน *Paeonia delavayi* (94%) *Pyrus ussuriensis* (92%) และ *Gossypium costulatum* (91%) และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนยีน *PDC* ใน *Diospyros kaki* (92%) และ *Cucumis melo* (91%)

ศึกษาระดับการแสดงออกของยีนที่คาดว่าจะเป็นยีน *ADH* และ *PDC* โดยใช้เทคนิค real-time PCR ในใบและรากของต้นสับปะรดพันธุ์ชัยนาทที่ได้รับสภาวะน้ำท่วมเป็นระยะเวลา 6 12 24 48 96 และ 192 ชั่วโมง พบว่า ยีน *ADH* มีการแสดงออกสูงสุดในใบที่ได้รับสภาวะน้ำท่วมเป็นเวลา 12 ชั่วโมง และในรากที่ได้รับสภาวะน้ำท่วมเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ในส่วนของยีน *PDC* พบว่า มีการแสดงออกสูงสุดในใบที่ได้รับสภาวะน้ำท่วมเป็นเวลา 12 ชั่วโมง และในรากที่ได้รับสภาวะน้ำท่วมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Vanunya Rutavepol 2014: Partial cloning of *Alcohol Dehydrogenase* and *Pyruvate Decarboxylase* in Physic nut under Waterlogging. Master of Science (Agronomy), Major Field: Agronomy, Department of Agronomy. Thesis Advisor: Mrs. Nonglak Tienseree, Ph.D. 78 pages.

The physic nut water logging stress responses were investigated to evaluate methodologies and parameters suitable for water logging stress indicators. The twomonths old physic nut seedlings , 'Chai-nat', were submerged under 30 cm depth for 15 days. Changes in the total leaf water potential ( $\Psi_t$ ), the maximum quantum yield ( $\Phi_{dark}$ ) and morphological traits were monitored during the experiment. The results show that the total leaf water potential and the maximum quantum yield were decreased along with the water logging duration. The levels of leaf chlorosis, stem cracking and root rot were increased according with the increment of stress duration.

Primers specific to conserve region of *Alcohol Dehydrogenase (ADH)* and *Pyruvate Decarboxylase (PDC)* were designed and used for PCR with first stranded cDNA template. It yielded the 286 and 337 bp of PCR product, respectively. Nucleotide sequences were analyzed and compared to the NCBI database. It was found that they were similar to *ADH* gene of *Paeonia delavayi* (94%), *Pyrus ussuriensis* (92%) and *Gossypium costulatum* (91%) and similar to *PDC* gene of *Diospyros kaki* (92%) and *Cucumis melo* (91%).

Real-time PCR was performed to determine the expression levels of putative *ADH* and *PDC* genes in leaves and roots of waterlogged physic nut for 6 12 24 48 96 and 192 hr. It was indicated that the highest expression of *ADH* gene was found in leaves and roots of waterlogged physic nut for 12 hr and 6 hr, respectively. For the expression of *PDC* gene, the results revealed that the leaves and roots of waterlogged physic nut for 12 hr and 24 hr showed the highest expression of *PDC* gene.

---

Student's signature

---

Thesis Advisor's signature

## กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. นงลักษณ์ เทียนเสรี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก รองศาสตราจารย์ ดร. สนธิชัย จันทร์เปรม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้ คำปรึกษา และคำแนะนำในการวางแผนการทดลองรวมทั้งการเรียบเรียงตลอดจนตรวจแก้ไข วิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร.อนุรักษ์ อรัญนาค ประธานในการ สอบปากเปล่าขั้นสุดท้าย และอาจารย์ ดร.พินิตา คงสวัสดิ์วรกุล ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่กรุณาให้ คำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ คุณชนากานต์ ลักษณะ ที่ให้คำแนะนำและช่วยแก้ไขปัญหาในการทำการ ทดลองของวิทยานิพนธ์นี้เสมอมา ขอขอบคุณ คุณศกุนรัตน์ สุวรรณโณ และ คุณบุศรินทร์ อิ่มอินทร์ ที่ ช่วยเหลือให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี และขอขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ใน ห้องปฏิบัติการชีววิทยาโมเลกุล ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้ คำปรึกษา และเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์เสมอมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และน้องสาว รวมทั้งทุกคนในครอบครัว ที่คอยเป็นกำลังใจ ให้คำปรึกษา ให้การส่งเสริมในด้านการศึกษา และการทำวิทยานิพนธ์แก่ข้าพเจ้า ด้วยดีเสมอมา

วันัญญา ฐูทวีผล

กรกฎาคม 2557

## สารบัญ

### หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	25
อุปกรณ์	25
วิธีการ	28
ผลและวิจารณ์	35
สรุป	60
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	61
ภาคผนวก	76
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	78

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน <i>ADH</i> และ <i>PDC</i>	31
2 ปริมาณสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR	33
3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์สำหรับ real-time PCR ที่จำเพาะกับยีน <i>ADH</i> <i>PDC</i> และ <i>Actin</i>	34
4 ผลของสภาพน้ำท่วมต่อการเปลี่ยนแปลงค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบ และประสิทธิภาพการใช้แสงสูงสุดในใบสนุ่นดำที่ได้รับสภาพน้ำท่วมเป็นระยะเวลา 15 วัน	45
5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอคู่สมที่เกิดจากไพรเมอร์ของยีน <i>ADH</i> และ <i>PDC</i> ในสนุ่นดำ	49
6 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอคู่สมที่สังเคราะห์ได้จากไพรเมอร์ของยีน <i>ADH</i> ในสนุ่นดำกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ <i>ADH</i> ในฐานข้อมูล Genbank	51
7 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอคู่สมที่สังเคราะห์ได้จากไพรเมอร์ของยีน <i>PDC</i> ในสนุ่นดำกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ <i>PDC</i> ในฐานข้อมูล Genbank	52

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	กระบวนการสร้าง lactate และ ethanol ในสภาพออกซิเจนต่ำ	23
2	ลักษณะพื้นฐานที่เปลี่ยนแปลงไปของต้นสบูดำที่ได้รับสภาวะน้ำท่วมในช่วงระยะเวลา 5 วัน 10 วัน และ 15 วัน เมื่อเทียบกับต้นปกติ	38
3	การเปลี่ยนแปลงค่าประสิทธิภาพการใช้แสงสูงสุด (maximum quantum yield, $\Phi_{dark}$ ) ในใบตัด และ ใบตามของสบูดำภายใต้สภาวะน้ำท่วม	41
4	ผลของสภาพน้ำท่วมต่อค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบสบูดำที่ได้รับสภาวะน้ำท่วม เป็นเวลา 15 วัน	44
5	แถบอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากใบและรากของสบูดำ	47
6	ระดับการแสดงออกของยีน <i>ADH</i> ในใบของสบูดำที่ได้รับสภาวะน้ำท่วมเป็นระยะเวลา 6-192 ชั่วโมง	56
7	ระดับการแสดงออกของยีน <i>ADH</i> ในรากของสบูดำที่ได้รับสภาวะน้ำท่วมเป็นระยะเวลา 6-48 ชั่วโมง	56
8	ระดับการแสดงออกของยีน <i>PDC</i> ในใบของสบูดำที่ได้รับสภาวะน้ำท่วมเป็นระยะเวลา 6-192 ชั่วโมง	59
9	ระดับการแสดงออกของยีน <i>PDC</i> ในรากของสบูดำที่ได้รับสภาวะน้ำท่วมเป็นระยะเวลา 6-48 ชั่วโมง	59
<b>ภาพผนวกที่</b>		
1	ภาพจำลองสภาพน้ำท่วม น้ำสูงจากพื้นกระเบะ 30 เซนติเมตร ระดับน้ำสูงจากผิววัสดุปลูกในแต่ละกระถาง 15 เซนติเมตร	77
2	ระดับน้ำในกระเบะที่มีความจุ 80 ลิตร	77

การโคลนบางส่วนของยีน *Alcohol Dehydrogenase*  
และยีน *Pyruvate Decarboxylase* ในสับุดำภายใต้สภาพน้ำท่วม

**Partial Cloning of *Alcohol Dehydrogenase* and  
*Pyruvate Decarboxylase* in Physic nut under Waterlogging**

คำนำ

สับุดำเป็นพืชพลังงานทดแทนที่มีศักยภาพใช้เพื่อผลิตเป็นไบโอดีเซล สับุดำมีชื่อคืออยู่หลายประการที่ควรได้รับการพิจารณา คือ เป็นพืชที่นำเข้ามาปลูกในประเทศไทยนานกว่า 200 ปี (ระพีพันธ์ และสุขสันต์, 2524ก, 2524ข) เป็นที่คุ้นเคยของเกษตรกรในท้องถิ่น และสามารถปลูกได้ในทุกสภาพพื้นที่ ทนต่อสภาพดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ พื้นที่แล้ง พื้นที่ดินเค็ม เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตาม ปัญหาของการเพาะปลูกสับุดำมีหลายประการ เช่น การให้ผลผลิตต่ำ การทะยอยออกดอกและสุกแก่ของผล และการไม่ทนต่อสภาพน้ำท่วม น้ำท่วมเป็นภัยธรรมชาติอย่างหนึ่งที่สามารถเกิดขึ้นได้ แล้วก่อให้เกิดความเสียหายทั้งทางตรงและทางอ้อม ทางตรงได้แก่ ความเสียหายทางการเกษตรและเศรษฐกิจ และทางอ้อมได้แก่ แหล่งเชื้อพันธุกรรมที่เสียหาย (กวิศร์, 2540) โดยเฉพาะในเขตที่ราบลุ่มภาคกลาง สถานะน้ำท่วมขังในเขตพื้นที่ราบลุ่มนั้นยังมีโอกาสเกิดขึ้นอยู่เสมอในอนาคต แม้มีฝนตกหนักในพื้นที่เพียงครั้งเดียว (รวี, 2540)

ลักษณะไม่ทนต่อสภาพน้ำท่วมของสับุดำ พบว่า สับุดำที่ถูกน้ำท่วมนานเพียง 3-4 วัน จะเริ่มทิ้งใบ หยุดการเจริญเติบโต และตายในที่สุด (Gimenoa *et al.*, 2012) ในขณะที่ปัญหาการเกิดน้ำท่วมอันเนื่องมาจากภาวะโลกร้อนกลับมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น เพื่อเป็นการเตรียมความพร้อมรับมือกับสภาพดังกล่าว รวมถึงการหาแหล่งพลังงานทดแทนที่ยั่งยืน และเป็นมิตรกับสภาพแวดล้อม การปรับปรุงพันธุ์สับุดำให้ทนต่อสภาพน้ำท่วม จึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับการสร้างแหล่งพลังงานทดแทนในอนาคตของประเทศ แต่การจะปรับปรุงพันธุ์สับุดำให้ทนน้ำท่วมได้นั้น จำเป็นต้องเข้าใจรูปแบบการแสดงออก และการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องและควบคุมลักษณะที่ช่วยทำให้สับุดำสามารถอยู่รอดได้ภายใต้สภาวะดังกล่าว เช่น ยีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมัก ที่สำคัญมี 2 ยีนคือ ยีน *Pyruvate Decarboxylase (PDC)* และ ยีน *Alcohol Dehydrogenase (ADH)* ข้อมูลที่ได้จะใช้เป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์สับุดำให้ทนทานต่อสภาพน้ำท่วม เช่น การนำข้อมูลลำดับ

นิเวศลิโอไทด์ของยีนมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับลักษณะที่ต้องการหรือการเปลี่ยนแปลงยีนหรือควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องให้เป็นไปในทิศทางที่ต้องการได้ในที่สุด



## วัตถุประสงค์

ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน และการแสดงออกของยีนในกลุ่มกระบวนการหมักได้แก่ ยีน *Alcohol Dehydrogenase* และ *Pyruvate Decarboxylase* ในสบูดำภายใต้สภาพน้ำท่วม



## การตรวจเอกสาร

### สบู่ดำ

สบู่ดำมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Jatropha curcas* L. อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae สบู่ดำเป็นพืช น้ำมันชนิดหนึ่งที่พบได้ทั่วไปในทุกภูมิภาคของประเทศไทย มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปอเมริกากลาง ชาวโปรตุเกสได้นำพันธุ์สบู่ดำจากอเมริกาเข้าสู่แอฟริกาและเอเชียจนไปเจริญเติบโตได้ในท้องถิ่นนั้น ๆ Padua *et al.* (1999) รายงานว่าสบู่ดำทั่วโลกมีประมาณ 175 ชนิด พบตั้งแต่ทางตอนเหนือของอเมริกาไปจนถึงตอนกลางของอเมริกา แถบทางตะวันตกของอินเดีย ในพื้นที่แห้งแล้งของอเมริกาใต้ รวมถึงพื้นที่แห้งแล้งแถบแอฟริกาและแอฟริกาใต้ และได้แพร่กระจายเข้ามาในฟิลิปปินส์ก่อน ค.ศ. 1750 ในปัจจุบันสบู่ดำมีชื่อท้องถิ่นมากกว่า 200 ชื่อทั่วโลก ในภาษาอังกฤษมีชื่อสามัญว่า physic nut หรือ purging nut และแพร่กระจายเข้ามาในประเทศไทยช่วงปลายสมัยกรุงศรีอยุธยา สบู่ดำเจริญเติบโตได้ดีในทุกภาคของประเทศไทยและมีชื่อเรียกแตกต่างกันไปในแต่ละภาค เช่น ภาคกลางเรียก สบู่ดำ ภาคเหนือเรียกว่า มะหุ้งฮั่ว ภาคใต้เรียก ระหงเทศ พืชในสกุล *Jatropha* spp. ขึ้นกระจายทั่วไปในเขตร้อนและกึ่งร้อน (Jones and Miller, 1991)

### ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

สบู่ดำ เป็นไม้พุ่มยืนต้นขนาดกลางเจริญเติบโตได้สูงประมาณ 6 เมตร เป็นไม้ยืนต้นมีอายุ ไม่น้อยกว่า 20 ปี ทรงพุ่มมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 เมตร ยอดและใบอ่อนมีสีม่วงแกมเขียว ลำต้นส่วนที่มีอายุน้อยจะมีสีเขียว ผิวเรียบ อวบน้ำ เปราะหักได้เพราะเป็นไม้เนื้ออ่อน ไม่มีแก่น เมื่อสบู่ดำมีอายุมากขึ้น โคนต้นมีสีน้ำตาลอมเทา และเริ่มแตกทรงพุ่มเมื่อลำต้นมีความสูงจากระดับพื้นดินประมาณ 12 เซนติเมตร โดยมีกิ่งแขนงเจริญออกทางด้านข้าง เป็นพืชที่ทนต่อความแห้งแล้งได้ดีขึ้นได้ในที่ดอนและดินลูกรังแต่ไม่ทนสภาพน้ำท่วมขัง (ชานาญ, 2549)

ระพีพันธ์ และสุขสันต์ (2524 ก.); นรินทร์ (2526); ทวีศักดิ์ (2548); Heller (1996); Solomon *et al.* (2002) และ Spichiger *et al.* (2004) รายงานลักษณะทางพฤกษศาสตร์สบู่ดำไว้ดังนี้

ใบ (leaf) ใบเดี่ยวรูปร่างคล้ายใบฝ้าย หลังใบมีสารคิวตินซึ่งทำหน้าที่เคลือบผิวใบ ส่วนท้องใบมีสารพวกไขเคลือบ ขอบใบมีรอยหยักตื้น ๆ ประมาณ 3-5 หยัก ฐานใบเป็นรูปหัวใจ

ปลายใบแหลม การเรียงตัวของเส้นใบเป็นแบบนิ้วมือ การจัดเรียงใบแบบสลับมักจะทิ้งใบในช่วงฤดูแล้ง หากแล้งจัดก็จะทิ้งใบหมดทั้งต้น และใบสมุนไพร flavonoids, apigenin, glycosides vitexin และ isovitexin เป็นจำนวนมาก (Staubmaun *et al.*, 1999)

ช่อดอก (flower) สมุนไพรช่อดอกชนิดช่อกระจุกซ้อน (compound dicasia) เป็นดอกไม้สมบูรณ์เพศ ดอกเพศผู้และดอกเพศเมียอยู่ในช่อดอกเดียวกัน (monoecious plant) โดยทั่วไปดอกเพศเมียจะสร้างอยู่ที่กึ่งกลางของช่อดอกย่อยและล้อมรอบด้วยดอกเพศผู้ แต่ในบางครั้งตำแหน่งของดอกเพศเมียอาจเกิดดอกเพศผู้แทนและทั้งช่อดอกอาจจะมีเฉพาะดอกเพศผู้ได้

ผล (fruit) ผลค่อนข้างป้อมหรือเป็นรูปกระสวย กว้าง 2-3 เซนติเมตร ยาว 2.5 - 3.5 เซนติเมตร ลักษณะเป็นแบบเปลือกแข็ง (nut) มี 3 พู (lobes) ผลอ่อนสีเขียว ผลสุกจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและเมื่อแก่จัดเปลือกนอกที่เป็นสีเหลืองจะเปลี่ยนเป็นสีดำ ผลแห้งที่ยังติดอยู่บนต้นจะไม่แตกออก แต่เมื่อผลร่วงลงสู่พื้นดินอาจแตกได้ ผลสดหนึ่งผลมีน้ำหนักประมาณ 15 กรัม ผลแห้งน้ำหนักจะลดลงเหลือ 2.6 กรัม ผลเมื่อแกะผนังด้านนอก (exocarp) และผนังชั้นกลาง (mesocarp) ออกจะพบผนังชั้นใน (endocarp) สานกันเป็นชั้นหุ้มเมล็ดไว้ภายใน หนึ่งผลมีจำนวนเมล็ด 2-3 เมล็ด แต่ส่วนมากพบว่าจำนวน 3 เมล็ด

เมล็ด (seed) จากผลแก่มีสีดำผิวเรียบเป็นมัน แต่เมื่อเมล็ดแห้งผิวจะหยาบไม่เรียบ มีขนาดประมาณ  $1.0 \times 2.0$  เซนติเมตร เปลือกสีดำ แข็งหนาหุ้ม เมื่อกะเทาะเปลือกออกจะพบเนื้อในสีขาว (kernel) ซึ่งเป็นส่วนที่จะนำไปสกัดน้ำมัน โดยมีน้ำมันเป็นส่วนประกอบประมาณ 33 - 60 เปอร์เซ็นต์ ต่อน้ำหนักเมล็ดแห้ง โดยในเมล็ดมีสารพิษหลายชนิด เช่น เคอร์ซิน (curcin) กรดไซยานิก (cyanic acid) และ โฟโบเอสเตอร์ (phorbol ester)

ราก (root) สมุนไพรมีระบบรากแบบรากแก้ว (tap root system) ซึ่งเกิดหลังจากการเพาะเมล็ด 7 - 10 วัน รากมีสีขาว อวบน้ำ ปลายรากสีเหลืองอ่อน และมีรากแขนงแผ่กระจายไปตามแนวรัศมีทรงพุ่มและตามแนวตั้งจำนวนมาก

## การจำแนกสบู่ดำ

ในประเทศไทยมีรายงานการพบพืชในสกุล *Jatropha* spp. 5 ชนิด คือ *J. gossypifolia* L. (สบู่แดง) *J. multifida* L. (ฝิ่นคั่น) *J. podagrica* Hook. (หนูมานั่งแท่น) *J. integerrima* Jacq. (ปัดตาเวีย) และ *J. curcas* L. (สบู่ดำ) (Peter and Chayamarit, 2007) นอกจากนี้ บุญอุ้ม (2532) รายงานว่า สามารถจำแนกสบู่ดำที่พบในประเทศไทยตามลักษณะของผลได้ 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 เป็นสบู่ดำที่มีผลทรงกลม ขนาดของผลปานกลาง มีเปลือกหนานปานกลาง พบทั่วไปทางภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้ กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มสบู่ดำที่มีผลทรงกลมหรือรูปทรงของผลยาวกว่ากลุ่มที่ 1 เล็กน้อย ผลมีขนาดใกล้เคียงกันแต่มีเปลือกหนากว่า พบมากในภาคเหนือที่ระดับความสูง 800-1,100 เมตร จากระดับน้ำทะเลปานกลาง และกลุ่มที่ 3 เป็นสบู่ดำที่มีผลทรงกลมแต่มีขนาดของผลเล็กกว่า 2 กลุ่มข้างต้น และมีการบันทึกแหล่งกำเนิดทางพันธุกรรมและสายพันธุ์ของสบู่ดำเอาไว้ 4 แหล่ง โดยเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรม (germplasm) ไว้ที่หน่วยงาน 3 แห่ง คือ 1) CentroAgronomico Tropical de Investigacion y Ensenanza (CATIE) ใน Costa Rica 2) Centre National de Semences Forestieres (CNSF) ใน Burkina Faso และ 3) Instituto Nacional de Investigacao de Desenvolvimento Agrario (INIDA) ใน Cape Verde (Padua *et al.*, 1999)

## การใช้ประโยชน์จากสบู่ดำในด้านต่าง ๆ

สบู่ดำมีประโยชน์ในด้านต่าง ๆ หลายประการ โดยเกือบทุกส่วนของสบู่ดำสามารถนำมาใช้ประโยชน์ต่าง ๆ ได้ (ระพีพันธ์ และ สุขสันต์, 2524ข.; ทวีศักดิ์, 2548; Heller, 1996; Reinhard, 2005) ตัวอย่างประโยชน์จากสบู่ดำ เช่น

การใช้เป็นยาสมุนไพรในการรักษาโรคต่าง ๆ ใบและรากใช้รักษาโรคเกี่ยวกับทางเดินปัสสาวะ ลดอาการไอ และใช้เป็นยาขับน้ำนม เมื่อสับใบให้ละเอียดใช้ทาผิวหนังลดอาการคันจากโรคเรื้อน โรคที่เกี่ยวกับการติดเชื้อทางผิวหนังและโรครูมาติก ในส่วนของเปลือกมีแทนนิน (tannin) สโปนิน (sponins) เรซิน (resin) และไข (wax) ส่วนเปลือกนำมาบดให้ละเอียดใช้ใส่แผลแก้พิษงูและสัตว์มีพิษได้ หรือใช้พอกตามข้อเพื่อช่วยลดการอักเสบของกระดูกและช่วยรักษาโรครูมาติก ส่วนของลำต้นสดคั้นเปลือกทูปให้บวมใช้แปรงฟันช่วยรักษาแผลในปาก น้ำยางของต้นสบู่ดำมีลักษณะเหนียวใส มีกลิ่นแรง ในยางมีสารที่ใช้รักษาแผลสดมีคุณสมบัติในการห้ามเลือด เนื่องจากมีสารพวกเรซินประมาณ 14.6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีคุณสมบัติจับตัวเป็นก้อน แต่ไม่มีสารพวก

ยาง (rubber) เมื่อน้ำยางแห้งจะแข็งแต่เปราะ แดงง่าย มีสีแดงแกมน้ำตาล นอกจากนั้นยังมีการนำไปใช้รักษาโรคผิวหนังที่ป่วยเรื้อรังและพุพอง

การใช้ประโยชน์จากสารสกัด ธรรมชาติพล (2541) รายงานว่า เมื่อนำเปลือกและเมล็ดของสับดูดำหมักในน้ำสามารถใช้เป็นสารฆ่าแมลงปีกแข็งบางชนิดได้ น้ำยางมีสารที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของไวรัสที่ทำให้ใบของแตงโมค้างเหลือง และยังมีคุณสมบัติในการเบื่อปลา และใช้เป็นยาฆ่าหอย

การใช้เป็นอาหารคนและอาหารสัตว์ โดยนำใบอ่อนหรือยอดอ่อนมารับประทานได้ นำใบไปนึ่งเพื่อทำลายกรดไฮโดรไซยานิกซึ่งเป็นสารพิษ Jones and Miller (1991) รายงานว่าเมล็ดสับดูดำสามารถนำมาต้มและคั่วด้วยความร้อนเพื่อนำมารับประทานได้ นอกจากนี้กากของสับดูดำที่เหลือจากการสกัดน้ำมันซึ่งมีคุณค่าทางอาหารสูงจะใช้เป็นอาหารสัตว์ได้ การใช้เป็นอาหารสัตว์ได้นั้นจำเป็นต้องนำกากสับดูดำผ่านความร้อนร่วมกับการสกัดด้วยสารเคมี หรือการหมักกากสับดูดำด้วยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* เพื่อทำลายพิษของสับดูดำก่อนนำไปผสมเป็นอาหารสัตว์เนื่องจากกากสับดูดำประกอบด้วยสารพิษมากมาย เช่น เคอร์ซิน (curcin) โฟโบเอสเตอร์ (phorbolic ester) แซฟโฟนิน (saponin) โปทิเอส (protease) และไฟเตท (phytates)

การใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทน น้ำมันจากสับดูดำมีคุณสมบัติทั้งทางกายภาพและทางเคมีที่มีคุณสมบัติสำคัญคล้ายกับปิโตรเลียม สับดูดำใช้ทดแทนน้ำมันดีเซลและมีแนวทางที่จะพัฒนาให้น้ำมันสับดูดำเป็นน้ำมันที่มีคุณภาพสูงต่อไป ในน้ำมันมีกรดไขมันพวกลีโนเลอิกและกรดโอเลอิก ซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว แฉงตัวที่อุณหภูมิ -7 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำมันและองค์ประกอบของกรดไขมันจะเปลี่ยนแปลงไปตามสภาวะการเจริญเติบโตซึ่งจะส่งผลต่อการอิ่มตัวของน้ำมัน โดยในอากาศอบอุ่นจะส่งผลให้น้ำมันมีความอิ่มตัวสูง การสกัดน้ำมันโดยการทำให้แห้งอย่างช้า ๆ ทำให้ได้น้ำมันไม่มีกลิ่นและสีจะซีดจางลง ระพีพันธุ์ และ สุขสันต์ (2524ก.) รายงานว่าเมื่อนำน้ำมันจากเมล็ดสับดูดำมาทดแทนน้ำมันดีเซลจะไม่พบก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์จากไอเสียของเครื่องยนต์ และส่วนของน้ำมันไม่มียางเหนียว (gum deposit) จับในปั๊มหัวฉีดและกระบอกสูบ ต่างจากน้ำมันอื่นๆ เช่น น้ำมันทานตะวัน น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันมะพร้าวและน้ำมันปาล์ม ที่ทำให้มีน้ำยางเหนียวจับในปั๊มหัวฉีดและกระบอกสูบ การใช้น้ำมันจากเมล็ดสับดูดำทดแทนในเครื่องยนต์โดยตรงเป็นเวลานานยังไม่มีทดสอบว่ามีผลข้างเคียงหรือไม่ แต่ในยุโรปมีการปรับปรุงคุณภาพน้ำมันสับดูดำโดยวิธี tran-esterised ด้วยการเติมแอลกอฮอล์ และ ไฮดรอกไซด์ (hydroxide) ในน้ำมันสับดูดำเพื่อปรับปรุงคุณสมบัติให้มีความคล้ายกับน้ำมันดีเซลมากที่สุด

การใช้เป็นปุ๋ยอินทรีย์ ส่วนต่างๆ ของสับดูสามารถนำมาเป็นปุ๋ยพืชสดได้ กากของสับดูมีอินทรีย์วัตถุสูงกว่าปุ๋ยชนิดอื่นๆ เช่น มูลกระบือ มูลไก่ ปุ๋ยหมักจากฟางข้าว โดยมีธาตุไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและโพแทสเซียม 4.44 เปอร์เซ็นต์ 2.09 เปอร์เซ็นต์ และ 1.68 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สามารถใช้ทำปุ๋ยชีวภาพได้และไม่ก่อให้เกิดปัญหาหยาบและมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมการใช้ประโยชน์ทางด้านอื่นๆ น้ำมันสับดูสามารถนำมาใช้ทำเทียนไข และนิยมนำมาทำสบู่ โดยนำไปผสมกับน้ำมันปาล์มจะได้สบู่ที่มีคุณภาพดีมีฟองมาก ในประเทศจีนใช้น้ำมันจากเมล็ดสับดูผสมกับไอออนออกไซด์ (iron oxide) ได้เป็นน้ำมันเคลือบเงาเฟอร์นิเจอร์ที่สวยงาม

**การขยายพันธุ์ของสับดู** สามารถแบ่งออกเป็น 3 วิธีดังนี้ (ทวิศักดิ์, 2548; สมบัติ, 2548)

การเพาะเมล็ด การขยายพันธุ์โดยการเพาะเมล็ดสามารถทำได้โดย เลือกเมล็ดจากฝักที่มีสีเหลืองแก่แก่มน้ำตาล ซึ่งเป็นระยะแก่เต็มที่ ไม่มีระยะพักตัว จึงงอกได้ทันทีภายใน 10 วัน หลังจากเพาะในดิน ทั้งนี้ เมล็ดสับดูที่แก่เต็มที่หรืออยู่ในสภาพเมล็ดแห้งจะพ้นจากระยะพักตัวในช่วงผลสุกจึงสามารถนำไปปลูกได้ทันที การงอกจะมีส่วนของใบเลี้ยงคู่ 2 ใบ โผล่พ้นดินโดยการยืดตัวของส่วน ใต้ข้อใบเลี้ยง หลังจากนั้น ต้นกล้าจะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ซึ่งควรอนุบาลต้นกล้าให้มีอายุประมาณ 2-3 เดือน หรือมีความสูงประมาณ 30-40 เซนติเมตร ก่อนนำไปปลูกในแปลง เพราะช่วยให้ต้นกล้าสามารถปรับตัวกับสภาพแปลงได้ดีและเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งเริ่มให้ผลผลิตประมาณ 8-10 เดือนหลังปลูก สำหรับถั่วเพาะหรือกระบะทราย ใช้อัตราส่วน ดิน:ทราย:แกลบ:ปุ๋ยคอก เท่ากับ 3:3:3:1

การปักชำ ควรใช้ท่อนพันธุ์ที่มีสีเขียวปนน้ำตาลเล็กน้อย ซึ่งเป็นกิ่งที่ไม่อ่อนและแก่เกินไป ทำให้สามารถแตกรากได้ง่าย สำหรับความยาวกิ่งปักชำที่เหมาะสม คือ ประมาณ 30 เซนติเมตร โดยปักลงในถั่วเพาะหรือกระบะทรายอัตราส่วนเช่นเดียวกับดินผสมเพาะเมล็ด และใช้เวลาปักชำประมาณ 2 เดือน จึงสามารถนำไปปลูกและให้ผลผลิตหลังปลูกประมาณ 6-8 เดือน

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สามารถเลือกได้จากส่วนของยอดอ่อน ใบ และก้านใบของต้นสับดู นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตรที่เหมาะสม เพื่อชักนำให้ได้ต้นอ่อนจำนวนหลาย ๆ ต้น จึงทำให้สามารถขยายพันธุ์ได้จำนวนมาก

### การตอบสนองต่อสภาวะน้ำท่วมของพืช

สภาพน้ำท่วม คือ สภาวะที่ดินมีน้ำมากจนเกินไป หรือมีน้ำท่วมขัง จะเกิดขึ้นได้เมื่อสภาพของน้ำในดินที่มีอยู่ในระดับชั้นของรากพืชมากกว่าระดับของ field capacity และในบางครั้งน้ำอาจยังขังอยู่ในแปลงเป็นเวลา 2-3 วัน หรืออาจจะมีการซึมหรือไหลผ่านออกไป แต่ก็ยังมีความชื้นเหลืออยู่ในปริมาณที่ยังมากกว่าระดับของ field capacity อยู่จึงทำให้พืชเกิดความเครียดขึ้น เนื่องจากดินจะขาดก๊าซออกซิเจนและมีปริมาณของก๊าซคาร์บอน ไดออกไซด์สูง ตลอดจนมีปริมาณของก๊าซเอธิลีนมากขึ้นด้วย โดยทั่วไปแล้วช่องว่างของดินจะเต็มไปด้วยก๊าซออกซิเจน แต่เมื่อดินมีน้ำท่วมขังช่องว่างนี้จะเต็มไปด้วยน้ำ จึงมีผลทำให้ปริมาณก๊าซออกซิเจนลดต่ำลง พืชอาจจะสามารถอยู่ได้ในช่วงระยะเวลาหนึ่งในสภาพดินที่มีออกซิเจนต่ำประมาณ 0.5เปอร์เซ็นต์ แต่รากนั้นจะมีความต้องการออกซิเจนในปริมาณมากถึง 2-8เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้สำหรับการเจริญเติบโต (จักรี, 2539) เมื่อดินเกิดสภาวะน้ำท่วมขัง ปฏิกิริยาของ anaerobiosis จะเกิดขึ้นภายในระยะเวลา 2-3 ชั่วโมง ซึ่งกระบวนการนี้จะมีผลที่ทำให้ดินมี redox potential ลดลงไป เกิดการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดเป็นด่างของดิน (pH) และทำให้ดินมีปริมาณของโลหะหนักที่เป็นพิษละลายออกมามากขึ้น นอกจากนี้สภาพของน้ำท่วมขังยังจะมีผลต่อการเกิดกระบวนการ denitrification โดยที่ธาตุไนโตรเจนซึ่งมีอยู่ในดินจะมีการสลายตัวแบบ anerobic ซึ่งพวกจุลินทรีย์บางชนิดสามารถที่จะใช้ก๊าซออกซิเจน จากไนเตรตหรือไนไตรท์ได้ และจะปล่อยก๊าซ  $N_2$  และไนตรัสออกไซด์ออกมา ซึ่งมีผลทำให้ดินขาดธาตุไนโตรเจน ในสภาพที่ขาดออกซิเจนนั้นมีศัพท์เฉพาะที่เรียกว่า “anoxia” ซึ่งในสภาพเช่นนี้ กระบวนการการหายใจจะมีการเปลี่ยนแปลงจาก aerobic ไปเป็น anaerobic ตามธรรมชาตินั้น ส่วนต่างๆ ของพืชที่อยู่เหนือผิวดินจะไม่ได้รับผลกระทบจากการขาดก๊าซออกซิเจน จะมีเพียงส่วนที่อยู่ใต้ดินเช่น ราก เท่านั้นที่ได้รับผลกระทบจากการขาดออกซิเจนที่โดนน้ำท่วมขัง (Krizek, 1982)

## การตอบสนองทางสัณฐานวิทยา (Morphological responses)

น้ำท่วมขังมีผลทำให้พืชขาดออกซิเจน ส่งผลให้พืชมีการเปลี่ยนแปลงทางด้านสัณฐานวิทยาในใบและรากดังนี้

### อาการใบเหลือง (chlorosis)

เมื่อพืชเผชิญกับสภาวะน้ำท่วมขังนั้นจะทำให้การเจริญเติบโตหยุดชะงักและใบจะมีสีเหลืองซีด อาการอาจไม่เด่นชัดในช่วงแรกที่ได้รับสภาพเครียด แต่จะเกิดชัดเจนมากขึ้นในวันต่อมา อาการดังกล่าวมักเกิดขึ้นในใบที่มีอายุมากกว่าหรือใบที่อยู่ทางส่วน โคนกิ่งในแต่ละกิ่งย่อย และจะมีสีเหลืองเข้มมากขึ้น อาการใบเหลืองที่เกิดขึ้นนั้นอาจเกิดจากหลายสาเหตุ สาเหตุแรกคือ การมีปริมาณ ethylene ที่เพิ่มมากขึ้นในต้นพืช ethylene จะเป็นตัวการในการสลาย chlorophyll จึงทำให้ใบนั้นเกิดเป็นสีเหลือง (Kawase, 1974) และอีกสาเหตุหนึ่งมาจากรากไม่สามารถดูดน้ำหรือธาตุอาหารได้ปกติ จึงทำให้ธาตุ Magnesium ซึ่งเป็นองค์ประกอบของ chlorophyll ลดลง พืชจึงไม่สามารถจะสร้าง chlorophyll ได้ (Kepka and Morris, 1967) จากการศึกษาของ Wample and Reid (1975) พบว่าต้นทานตะวันที่ถูกน้ำท่วมขังจะมีลำต้นเตี้ย และ ใบเหลือง เช่นเดียวกับงานทดลองของ Hasnian and Sheikh (1976) พบว่า ในสภาวะน้ำท่วมขังจะทำให้การเจริญเติบโตของต้นพริกลดน้อยลง ใบจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

### อาการใบลู่หรือห้อยลง (epinasty)

อาการใบลู่เป็นผลมาจากการที่เซลล์บริเวณ โกล์แกนด้าน ใบถูกกระตุ้นการเจริญเติบโตไม่เท่ากัน ส่งผลให้เกิดการโค้งงอของใบ ฮอว์โมน ethylene เป็นฮอว์โมนที่มีส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดอาการใบลู่ แต่ฮอว์โมน auxin ก็อาจมีส่วนร่วมในการกระตุ้นให้เกิดอาการนี้ได้ด้วยเช่นกัน (นวรรตน์, 2541) Ishak (1992) ทำการศึกษาในขมุนและจำปาตะเมื่อได้รับสภาวะน้ำท่วมเป็นระยะเวลาต่างๆ พบว่า จำปาตะเกิดอาการใบลู่ อย่างรวดเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับขมุน ซึ่งคาดว่าเป็นผลมาจากปริมาณ ethylene ที่เกิดขึ้นในจำปาตะที่สูงกว่าขมุน

### อาการทิ้งใบ ดอก และผล (abscission)

เมื่อรากไม่สามารถทำงานได้เนื่องจากภาวะขาดออกซิเจนอันเนื่องมาจากต้องจมน้ำอยู่เป็นเวลานาน รากไม่สามารถดูดสารอาหารมาให้แก่ยอดพืชได้ โดยเฉพาะไนโตรเจนที่จำเป็นต่อการสร้างโปรตีน เช่น เอนไซม์ต่างๆ เนื่องจากไนโตรเจนถูกเปลี่ยนเป็นก๊าซด้วยกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน (denitrification) โดยแบคทีเรียที่อยู่ในดินและในน้ำในภาชนะน้ำท่วมนั้น ใบพืชอ่อนจะทิ้งไนโตรเจนออกจากใบพืชแก่ แต่ก็จะทำให้ใบที่มีอายุมากมีอายุสั้นลง เกิดการทิ้งใบ ดอก และ ผล ตามลำดับ (Jackson and Colmer, 2005)

### การสร้างช่องเปิดถาวร (lenticel formation)

การสร้างช่องเปิดถาวรคือ ช่องเปิดที่สามารถพบได้บริเวณลำต้นหรือกิ่ง จะเห็นเป็นรอยแผลแตกเป็นทางยาวตามขวางหรือตามยาวของลำต้น มีขนาดตั้งแต่ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า จนถึงขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร พืชบางชนิดเมื่อมีอายุมากขึ้น ขนาดของช่องเปิดก็จะมีขนาดใหญ่ขึ้นตามไปด้วย ซึ่ง lenticel อาจเกิดขึ้นเดี่ยวๆ หรือเกิดเป็นแถวเรียงกันก็ได้ เนื่องจากเนื้อเยื่อบริเวณ lenticels จะแตกต่างจากเนื้อเยื่ออื่นๆ โดยเซลล์จะเรียงตัวอยู่หลวมๆ มีช่องว่างระหว่างเซลล์มากและเซลล์มีผนังบาง จึงสามารถทำหน้าที่แลกเปลี่ยนแก๊สกับภายนอกได้อย่างสะดวกเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการหายใจของพืช (เทียมใจ, 2539) รายงานวิจัยของ Hook *et al.* (1970) กล่าวว่า เมื่อพืชเผชิญกับสภาวะน้ำท่วมพบว่าจะมีการสร้าง lenticel ขึ้น โดย lenticel อาจเกิดขึ้นในช่วงแรกตั้งแต่เมื่อลำต้นหยุดการเจริญ โดยเซลล์พarenchyma (parenchyma) ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีผนังบางจะแบ่งตัวในแนวต่างๆ ทั้งในแนวตั้งและแนวนอน เซลล์จะเรียงตัวกันอย่างหลวมๆ และขยายตัวจนไปดันเซลล์ที่อยู่ติดกับเซลล์ในชั้นคอร์เทกซ์ และดันเซลล์ที่อยู่ในชั้นเอพิเดอร์มิสให้แตกออกจนกลายเป็นรอยแตก โดยพบว่าการเกิด lenticel หรือรอยแตกบริเวณลำต้นเป็นอิทธิพลของออกซิเจนและเอทิลินที่เพิ่มขึ้น (McNamara and Mitchell, 1991) มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับ lenticel โดย Armstrong (1968) ได้กล่าวว่าเมื่อพืชเผชิญกับภาวะน้ำท่วมพืชจะมีการสร้าง lenticels ขึ้นและจะเกิดขึ้นในช่วงแรกจากการแพร่ของก๊าซออกซิเจนเข้าสู่ rhizosphere และ Hook *et al.* (1970) ได้ศึกษาในต้นหลิว พบว่าสารพวก ethylalcohol, acetaldehyde และ ethylene จะแพร่ออกจาก lenticels บนรากปักชำของต้นหลิว และก๊าซออกซิเจนนั้นมีการแพร่เข้าทาง lenticels จึงทำให้พืชได้รับออกซิเจนแม้เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะน้ำท่วมได้

### การเกิดรากพิเศษ (adventitious root)

การเกิดรากพิเศษ ส่วนใหญ่เกิดที่บริเวณ โคนต้นในสภาพน้ำท่วม เป็นการปรับตัวของพืชให้ทนต่อสภาพน้ำท่วมแบบหนึ่ง (Bardford and Yang, 1981) โดยเป็นลักษณะที่พบได้ทั้งในพันธุ์ที่ทนและไม่ทนต่อสภาพน้ำท่วม แต่ส่วนมากจะเกิดในพันธุ์พืชที่ทนต่อสภาพน้ำท่วม (Kozlowski and Pallardy, 1982; Kozlowski, 1984) ณัฐวุฒิ (2549) เปรียบเทียบการตอบสนองต่อสภาพน้ำท่วมขังในพืชตระกูลแดง 4 ชนิด คือ แดงกวา พักทอง น้ำเต้าและบวบ พบว่า บวบนั้นสามารถทนน้ำท่วมได้ดีที่สุดนานถึง 25 วันและพบว่ามีการสร้างรากพิเศษเกิดขึ้นเมื่อต้นบวบเผชิญกับสภาพน้ำท่วมขัง ต้นบวบนั้นสร้างรากพิเศษได้ช้ากว่าพืชตระกูลแดงชนิดอื่นๆ แต่เกิดรากพิเศษได้มากที่สุด และ เกษม (2544) พบว่าพันธุ์ฝรั่งแดงมีการสร้างรากที่เร็ว โดยใช้ระยะเวลาเพียง 14 วันหลังจากถูกน้ำขังก็สามารถสร้างรากได้ สันนิษฐานว่า รากใหม่นี้จะมีส่วนช่วยรับก๊าซออกซิเจนมาใช้ในกระบวนการหายใจ (McNamara and Mitchell, 1991)

### การยืดตัวทางลำต้น (shoot elongation)

ในพืชที่ต้องเผชิญกับภาวะน้ำท่วมอยู่เป็นระยะเวลานาน จะมีวิวัฒนาการเพื่อปรับตัวเพื่อให้ส่วนยอดโผล่พ้นน้ำให้ได้ โดยการยืดลำต้นขึ้นเพื่อให้พ้นน้ำโดยเร็ว และมักจะเป็นการตอบสนองที่ค่อนข้างเร็ว ไม่เกินสองชั่วโมงหลังจากจมอยู่ใต้น้ำ พืชบางชนิดก็จะยืดลำต้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะทำให้ส่วนยอดได้ออกซิเจนมากขึ้น เพราะบริเวณใกล้ผิวน้ำมีออกซิเจนละลายในน้ำมากกว่า และมีแสงสำหรับการสังเคราะห์แสงมากกว่าด้วย การตอบสนองแบบนี้ในพืชบางชนิดไม่ต้องคอยให้น้ำท่วมทั้งต้น แค่ท่วมถึงส่วนฐานของส่วนยอด พืชเช่น ข้าวโพดก็เริ่มยืดตัวเตรียมไว้ก่อน (Jackson and colmer, 2005) Hofman-Benning and Kende (1992) พบว่า การชักนำให้เกิดการยืดตัวของข้าวในระหว่างน้ำท่วมได้รับอิทธิพลจากความสัมพันธ์ของเอธิลีน และ GA และในข้าวน้ำลึก การยืดตัวของข้อปล้องระหว่างน้ำท่วมถูกควบคุมโดยอัตราส่วนของ gibberellins และ ABA จากการศึกษาพบว่า เอธิลีนเป็นตัวสนับสนุนกิจกรรมของ gibberellin ซึ่งสภาพน้ำท่วมจะชักนำให้เกิดการสะสมของเอธิลีน ทำให้เกิดการลดระดับของ ABA ภายในเซลล์เป็นผลให้เกิดการยืดตัวของข้อปล้องของข้าวต่อ gibberellin (Jackson, 1982)

### การตอบสนองระดับกายวิภาค (Anatomical responses)

การเปลี่ยนแปลงในระดับกายวิภาคต่อสภาพน้ำท่วมขังตรวจพบได้ในพืชหลายชนิดที่เด่นชัดได้แก่ การสร้างโพรงอากาศ (aerenchyma) ในรากที่ถูกน้ำท่วม โพรงอากาศในรากมีส่วนช่วยลำเลียงออกซิเจนจากภายนอกเข้าสู่ต้นพืช ขณะที่รากพิเศษที่เกิดขึ้นช่วยทำหน้าที่ทดแทนรากเดิมในต้นที่เสียหายเนื่องจากขาดออกซิเจน (รวี, 2540) การตอบสนองดังกล่าวมีส่วนช่วยให้พืชสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในสภาพน้ำท่วมขัง (Bradford and Yang, 1981) McPherson (1939) ได้อธิบายไว้ว่า การเกิด aerenchyma นี้เกิดจากการตายของเซลล์ที่ตายเนื่องจากขาดอากาศ โดย Kawase (1976) คาดว่าปริมาณเอทิลีนที่เพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อน้ำท่วมหรือขาดอากาศจะเป็นตัวกระตุ้นการสร้างและเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ซึ่งจะมีส่วนในการเกิด aerenchyma Kawase (1981) รายงานว่า ภายใน 2 วัน หลังจากต้นทานตะวัน ได้รับสภาพน้ำท่วม พบว่า มี aerenchyma เกิดขึ้น คาดว่าจะทำหน้าที่เป็นทางถ่ายเทอากาศซึ่งทำให้พืชสามารถต้านทานต่อสภาพที่น้ำท่วมหรือดินแฉะได้ He *et al.* (1994) แสดงให้เห็นถึงผลของสภาพออกซิเจนต่ำ และภาวะที่มีความเข้มข้นของเอทิลีนสูง สามารถกระตุ้นให้มีกิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ในรากสูงขึ้นได้ ซึ่งส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อผนังเซลล์ ซึ่งจัดเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิด aerenchyma

การเกิด aerenchyma อธิบายได้เป็น 5 ขั้นตอน ขั้นแรกเกิดเมื่อรากรับสัญญาณของการเกิดสภาพออกซิเจนต่ำ และกระตุ้นให้เริ่มมีการสังเคราะห์ ethylene ขึ้น ในขั้นที่สอง เซลล์ในชั้น mid cortex ในราก รับสัญญาณของระดับ ethylene ที่เพิ่มขึ้นได้ จากนั้นขั้นที่สาม เป็นขั้นเริ่มต้นของการเกิดการตายของเซลล์ เนื่องจากการสูญเสียไอออนจากเซลล์ และเกิดการม้วนพับของ plasma membrane (plasma membrane invagination) ซึ่งในขั้นนี้สามารถตรวจพบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผนังเซลล์ได้ คือการเกิด apoptotic bodies ซึ่งเป็นลักษณะเริ่มต้นของ cell death process ขั้นที่สี่ โครมาตินเกิดการขมวดม้วนตัวแน่นขึ้น และมีการเพิ่มขึ้นของ hydrolytic enzyme อย่างชัดเจน ขั้นสุดท้าย เป็นขั้นตอนที่ผนังเซลล์ถูกทำลาย และเกิดการตายของเซลล์ ซึ่งทำให้เกิดเป็นช่องว่างขึ้นมาในที่สุด (Schussler and Longstreth, 2000; Evan, 2003)

### การเกิดรากอากาศ (pneumatophores)

รากอากาศ (pneumatophores) สามารถเรียกอีกชื่อหนึ่งได้ว่า รากหายใจ เป็นการปรับตัวของพืชที่เจริญเติบโตในสภาพพื้นที่ที่มีน้ำท่วมถึงเป็นประจำ เช่น ป่าชายเลน ป่าพรุ โดยปกติแล้วในป่าชายเลนจะมีน้ำจะท่วมขังอยู่เสมอเนื่องจากอิทธิพลของน้ำขึ้นน้ำลง ดังนั้นดินในป่าชายเลนจึง

มีน้ำท่วมขังอยู่เป็นประจำ ทำให้ออกซิเจนในอากาศไม่สามารถแพร่กระจายลงสู่ดินได้ ไร่ก็ ตามรากของพืชป่าชายเลนต้องการออกซิเจนเพื่อใช้ในการดำรงชีวิตและการเจริญเติบโต ดังนั้น พืช จึงต้องมีการพัฒนาลักษณะรากอากาศขึ้นมา เพื่อให้รากของพืชนั้น ได้รับออกซิเจนมากยิ่งขึ้น โดย pneumatophores จะโผล่พ้นเหนือดิน ส่งผลให้ออกซิเจนสามารถผ่านลงทางรากอากาศสู่รากที่อยู่ใต้ ดินได้ รูปทรงของรากอากาศมีตั้งแต่ผอมบางคล้ายแท่งดินสอ เช่น รากของต้นแสม หรือมีรูปทรง อ้วนป้อม ซึ่งพบในต้นลำแพน และต้นตะบูนดำ นอกจากนี้ยังพบว่า พืชป่าชายเลนบางชนิดจะมีรู เล็กๆ จำนวนมากที่บริเวณลำต้นและรากที่โผล่ออกมา รูลำต้นจะนำอากาศเข้าสู่ต้นพืช และภายใน พืชจะมีเนื้อเยื่อฟองน้ำนำออกซิเจนสู่รากเช่นกัน (นิรนาม, ม.ป.ป.)

งานทดลองของ Scholander *et al.* (1955) ช่วยยืนยันหน้าที่ของรากอากาศ โดยจาก การศึกษาหน้าที่ของรากอากาศในต้น โกงกาง พบว่าการที่ต้น โกงกางสามารถดำรงชีวิตอยู่ในสภาพ น้ำท่วมขังได้ เนื่องจากการมีอยู่ของรากอากาศบนต้น โกงกางนั้น ที่ช่วยทำให้ต้น โกงกาง ได้รับ ออกซิเจน

## การตอบสนองในระดับสรีรวิทยาและชีวเคมี

### การดึงดูดธาตุอาหารในสภาพน้ำท่วม

การที่ธาตุอาหารจะเคลื่อนที่เข้าใกล้รากนั้นอาจเกิดขึ้นได้หลายทางคือ การแลกเปลี่ยน ระหว่าง ion บนผิวรากและ ion บนผิวของอนุภาคดิน การแลกเปลี่ยนระหว่าง ion ในดินกับ ไฮโดรเจนใน mucigel ของราก การแพร่ของ ion เข้าใกล้ราก เนื่องมาจาก chemical gradient mass flow ของ ion เข้าใกล้รากเนื่องมาจาก moisture gradient และการยึดตัวของรากไปสู่แหล่งที่มี ion (นวรรตน์, 2541) แต่เมื่อพืชเผชิญกับสภาวะน้ำท่วม รากเป็นส่วนแรกที่ได้รับผลกระทบจากภาวะน้ำท่วมขัง โดยที่การกระจายของระบบรากและความหนาแน่นรากลดลง ทำให้การดูดน้ำและธาตุอาหาร และการเคลื่อนย้ายสารอาหารต่าง ๆ ถูกยับยั้ง เนื่องจากรากมีพลังงานไม่เพียงพอที่จะรักษา ระดับของแรงดึงธาตุอาหารไว้ได้ ทำให้พืชขาดน้ำและธาตุอาหารที่สำคัญ เช่น ไนโตรเจน แมกนีเซียม เหล็ก และแมงกานีส จึงส่งผลกระทบต่อส่วนของพืชที่อยู่เหนือดิน การเคลื่อนย้ายน้ำ และอาหารจากรากไปสู่ส่วนของพืชที่อยู่เหนือดินลดลง เกิดการเปลี่ยนแปลงของธาตุอาหารที่สำคัญ อัตราของการดูดซึมของไอออนเข้าสู่รากจะต่ำลง และมีผลทำให้ไอออนของแร่ธาตุอาหาร บางตัวมีการละลายออกมามากขึ้น และเป็นพิษมากขึ้น ธาตุอาหารบางตัวจะอยู่ในรูปที่พืชนำไปใช้ ประโยชน์ไม่ได้ ทำให้เกิดการภาวะพร่องคลอโรฟิลล์ แล้วส่งผลให้น้ำหนักแห้งส่วนต่าง ๆ ลดลง

นอกจากนี้ยังมีการเปลี่ยนแปลงการเคลื่อนย้ายปริมาณคาร์โบไฮเดรต และสร้างสารยับยั้งการเจริญเติบโตอีกด้วย (Kozlowski and Pallardy, 1982: สุภาพรรณ, 2555)

ผลกระทบของภาชนะน้ำท่วมขังต่อส่วนของพืชที่อยู่เหนือดิน โดยเฉพาะการเจริญเติบโตของลำต้น ใบ และขนาดของพื้นที่ใบ มีรายงานในหญ้าอาหารสัตว์ โดยแสดงลักษณะอาการผิดปกติที่สังเกตได้ เช่น อาการเหี่ยว ปลายใบม้วนงอ ลักษณะอาการใบเหลือง และมีขนาดของพื้นที่ใบลดลง ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการแบ่งเซลล์และการขยายตัวของเซลล์ นอกจากนี้ ยังพบว่าปริมาณหน่อต่อพื้นที่ลดลง และจำนวนต้นตายเพิ่มขึ้น (Costa, 2004; Rodrigues *et al.*, 2010)

#### การเปิดปิดปากใบและการคายน้ำ (transpiration)

การคายน้ำ เป็นการสูญเสียน้ำของพืชในรูปของไอน้ำโดยวิธีการแพร่ ร้อยละ 95 ของน้ำที่พืชดูดเข้ามาจะสูญเสียไปโดยการคายน้ำ การคายน้ำส่วนใหญ่แล้วจะเกิดผ่านปากใบ ดังนั้นเมื่อปากใบปิด การคายน้ำจะเกิดขึ้นน้อยมาก และเมื่อพืชเกิดการสูญเสียน้ำมากจะทำให้ปากใบนั้นปิดแคบมากเช่นเดียวกัน ปัจจัยที่สำคัญ คือ แสงและระดับความชื้นในพืช ส่วนใหญ่แล้วแสงจะเป็นตัวกระตุ้นให้ปากใบเปิด ถ้าพืชมีระดับความชื้นในใบต่ำก็จะทำให้ปากใบนั้นสูญเสียความเต่งส่งผลให้ปากใบปิด สภาวะน้ำท่วมเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้พืชนั้นปิดปากใบและลดการคายน้ำอย่างรวดเร็ว เนื่องจากระบบรากมีอาการขาดออกซิเจนค่อนข้างรุนแรงหรือกระทั่ง รากไม่สามารถหายใจได้จึงดูดน้ำและแร่ธาตุส่งไปเลี้ยงส่วนใบได้จำกัด เมื่อใบได้รับน้ำน้อยลง การที่ใบจะยังรักษาสภาพให้คงอยู่ได้นั้นจำเป็นต้องลดการคายน้ำลงเพื่อไม่ให้ใบเหี่ยวตายได้ กลไกดังกล่าวจึงอยู่ที่ส่วนของเซลล์ปากใบที่จะทำหน้าที่นี้โดยวิธีการลดขนาดของปากใบลงหรือการปิดส่วนปากใบนี้ทำให้การคายน้ำลดลง (รวิ, ม.ป.ป. ; นวรัตน์, 2541)

งานวิจัยของ Pereira and Kozlowski (1977) รายงานว่า เมื่อไม่ยี่นต้นเผชิญกับสภาวะน้ำท่วมขังนั้น การตอบสนองอันดับแรก คือ การปิดของปากใบ อาการเหี่ยวที่เกิดขึ้นในพืชที่อยู่ในสภาวะน้ำท่วมขังนั้นมีสาเหตุมาจากการขาดน้ำ เนื่องจากรากพืชไม่สามารถดูดน้ำไปใช้ได้ และ Szlovak (1975) พบว่า ข้าวโพดที่ถูกน้ำท่วมขังนั้นมีการคายน้ำในอัตราต่ำลง เนื่องจากรากเน่าและใบเหี่ยว

### การแลกเปลี่ยนก๊าซ (gas exchange)

เมื่อเกิดสภาวะน้ำท่วม พืชจะได้รับก๊าซ CO<sub>2</sub> และแสงสำหรับใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสงลดลง ซึ่งเป็นผลเนื่องจากการปิดแฉกของปากใบ มีรายงานว่า บลูเบอร์รี่ที่ได้รับสภาวะน้ำท่วมมีการปิดแฉกของปากใบ ทำให้ไม่เกิดกระบวนการสังเคราะห์แสง (Davies and Flore 1986 a.) ในหลายงานวิจัยจึงใช้การวัดการแลกเปลี่ยนก๊าซเป็นพารามิเตอร์หนึ่งในการศึกษาถึงประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงของพืชระหว่างที่พืชเผชิญกับสภาวะน้ำท่วมขัง (Sena Gomes and Kozlowski, 1980; Topa and Cheeseman, 1992) โดยในสภาวะน้ำท่วมนั้น ประสิทธิภาพการแลกเปลี่ยนก๊าซในใบพืชลดต่ำลง โดยเฉพาะในพืชที่ไม่ทนทานต่อสภาวะน้ำท่วม เช่น ฝ้าย ส้ม และมะเขือเทศ เป็นต้น (Liao and Lin, 1999) มีการศึกษาในพืชตระกูลถั่ว พบว่า เมื่อได้รับสภาวะน้ำท่วม จะมีการสะสม ABA ในใบเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้เกิดการปิดแฉกของปากใบ ( ; Zhang and Davies, 1987) แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาในมะระ พบว่าการลดลงของค่าการนำไหลของปากใบนั้นมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบพืชในสภาวะน้ำท่วม (Liao and Lin, 1994) โดยการปิดปากใบนั้นส่งผลให้ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบพืชเพิ่มขึ้น จึงสันนิษฐานได้ว่าการปิดปากใบนั้นจะทำให้อัตราการคายน้ำลดต่ำลง เพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำของใบพืช (Bradford and Hsiao, 1982)

### การเคลื่อนย้ายคาร์โบไฮเดรต

ในการเจริญเติบโตและพัฒนาของพืชนั้น สารต่าง ๆ จะเคลื่อนที่จาก source ไปยัง sink การขนส่งระหว่างอวัยวะต่าง ๆ ภายในต้นพืชจะผ่านระบบท่อลำเลียง คือท่อลำเลียงน้ำ และท่อลำเลียงอาหาร โดยการเคลื่อนย้ายในท่อลำเลียงน้ำจะเป็นไปในทิศทางเดียว คือขึ้นจากรากสู่ใบ แต่ในการเคลื่อนย้ายสารในท่อลำเลียงอาหารจะเคลื่อนที่ไปในสองทิศทางคือ จากรากสู่ใบ หรือใบสู่ราก สารที่มีการเคลื่อนย้ายผ่านท่อลำเลียงอาหารส่วนใหญ่แล้วจะเป็นคาร์โบไฮเดรตและน้ำตาล โดยเฉพาะอย่างยิ่งซูโครส นอกจากนี้ยังมีพวกกรดอะมิโนด้วยแต่มีในปริมาณน้อย (นวรรตน์, 2541)

เมื่อพืชเผชิญกับสภาวะน้ำท่วมขัง มีรายงานในพืชตระกูลถั่ว พบว่า การเคลื่อนย้ายคาร์โบไฮเดรตลดต่ำลง ส่งผลให้เกิดการขาดแคลนน้ำตาลในราก (Topa and Cheesemann, 1992) อย่างไรก็ตามระดับน้ำตาลในรากพืชที่เผชิญกับสภาวะน้ำท่วมจะมีปริมาณสูงกว่าในพืชปกติ ซึ่งพบได้ในพืชบางชนิด เช่น มะระ เมื่อได้รับสภาวะน้ำท่วม จะมีระดับน้ำตาลในรากสูงกว่าในต้นปกติที่ไม่ได้รับสภาวะน้ำท่วม (Su and Lin, 1998) และในช่วงแรกของพืชที่ได้รับสภาวะน้ำท่วม พบว่าระดับของแป้งจะลดน้อยลง และระดับของน้ำตาลจะเพิ่มมากขึ้น เช่น น้ำตาลซูโครส น้ำตาลเฮกโซส

เป็นต้น (Perata *et al.*, 1992) ในแอปเปิ้ลนั้น พบว่า มีปริมาณรวมของไนโตรเจนในใบต่ำ เมื่อได้รับสภาพน้ำท่วมเป็นเวลา 35 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับต้นปกติที่ไม่ได้รับสภาพน้ำท่วม ในขณะที่ปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวมทั้งหมดก็ลดน้อยลงเช่นเดียวกัน รวมไปถึงอัตราส่วนของปริมาณไนโตรเจนต่อคาร์โบไฮเดรตก็ลดต่ำลง (Hsu *et al.*, 1999) และ Aschi-smiti *et al.* (2004) ได้ศึกษาในพืช *Trifolium subterraneum* ที่มีอายุ 1 เดือน ภายใต้สภาวะน้ำท่วมเป็นเวลา 15 วัน พบว่า มีกิจกรรมของเอนไซม์ sucrose synthase , fructose kinase และ lactate dehydrogenase เพิ่มขึ้น

#### การสังเคราะห์แสง (photosynthesis)

การสังเคราะห์ด้วยแสงเป็นการใช้พลังงานแสงในการสังเคราะห์สารโดยพลังงานแสงที่พืชได้รับจะถูกสะสมอยู่ในรูปของ ATP และ NADPH ผลผลิตของพืชนั้นจึงขึ้นอยู่กับอัตราการสังเคราะห์แสง (นารัตน์, 2541) แต่ในสภาวะน้ำท่วมพบว่า พืชนั้นจะมีอัตราการสังเคราะห์แสงลดน้อยลง เช่น ในพืชตระกูลสนเมื่ออยู่ในสภาวะน้ำท่วม 4-5 ชั่วโมง (Zaerr, 1983) และใน ต้นเมเปิ้ล อัตราการสังเคราะห์แสงของต้นเมเปิ้ลลดลงตั้งแต่ช่วงแรกที่ได้รับสภาพเครียด โดยลดลงประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับต้นควบคุม หลังจากนั้นอีก 10 วันของการถูกน้ำท่วม พบว่า อัตราการสังเคราะห์แสงลดลงอีก 25 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับต้นควบคุม และ Phung and Knipling (1976) ได้ศึกษาในพืชตระกูลส้มพบว่า เมื่อต้นส้มได้รับสภาพน้ำท่วมเป็นเวลา 1 วัน อัตราการสังเคราะห์แสงลดลง 80 เปอร์เซ็นต์ และมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อถูกน้ำท่วมในวันที่ 10 นอกจากนี้ มีการวิจัยในถั่วเขียว โดย Ahmed *et al.* (2006) ที่ศึกษาอัตราการสังเคราะห์แสงของถั่วเขียวเมื่อได้รับสภาพน้ำท่วม โดยเปรียบเทียบระหว่างช่วงเวลาที่ได้รับสภาพน้ำท่วมเป็นเวลา 1-8 วัน ที่ระดับความลึก 2 เซนติเมตร โดยวัดจากผิวดินในกระถาง กับช่วงหลังน้ำลด พบว่า เมื่อถั่วเขียวได้รับสภาพน้ำท่วม อัตราการสังเคราะห์แสงนั้นลดน้อยลง ถึง 25-30 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับต้นปกติ และมีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ จนถึงวันที่ 8 แต่เมื่อหลังน้ำลด พบว่า อัตราการสังเคราะห์แสงเพิ่มขึ้นถึง 71 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับการได้รับสภาพน้ำท่วมเป็นระยะเวลา 8 วัน (Sipp and Bell, 1974)

### การหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic respiration)

ในสภาวะน้ำท่วมขังนั้น รากพืชจะเผชิญกับภาวะออกซิเจนต่ำ หรือภาวะขาดออกซิเจน เนื่องจากช่องว่างภายในดินถูกแทนที่ด้วยน้ำ และออกซิเจนที่อาจยังเหลือในดินจะถูกนำไปใช้อย่างรวดเร็วจากการหายใจของรากพืช และจุลินทรีย์ในดิน พืชจึงมีกลไกเปลี่ยนระบบหายใจเป็นแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic respiration) หรือเรียกว่า กระบวนการหมัก (fermentation) ขึ้นแทน ทั้งนี้เป็นเพราะว่าออกซิเจนซึ่งเป็นสารรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในระบบถ่ายทอดอิเล็กตรอนซึ่งเกิดขึ้นที่เมมเบรนชั้นในของไมโทคอนเดรีย ดังนั้นการถ่ายทอดอิเล็กตรอนจึงหยุดลงในกรณีที่เซลล์ขาดออกซิเจน NADH ที่เกิดขึ้นในไกลโคไลซิสมิไม่สามารถเข้าสู่การถ่ายทอดอิเล็กตรอนได้ เป็นเหตุให้ในไซโทพลาสซึมมี NADH อยู่มากและเพื่อเป็นการรักษาสมดุลของเซลล์จึงมีกระบวนการหมักเกิดขึ้นซึ่งกระบวนการหมักนี้เป็นกระบวนการที่มีการใช้ NADH ได้ผลผลิตคือ เอทานอล (ethanol) หรือ แล็กเตต (lactate) และเกิดการสังเคราะห์พลังงาน ATP ขึ้นมา (ภาคภูมิ, 2550; Thomson and Greenway, 1991) อย่างไรก็ตาม ผลที่ได้ในขั้นตอนสุดท้ายของกระบวนการหมัก คือ การสะสมของเอทานอล เมื่อเนื้อเยื่อพืชได้รับออกซิเจนต่ำเป็นระยะเวลา ยาวนานอาจจะเป็นพิษแก่พืชได้ ส่งผลให้การดูดธาตุอาหารและน้ำลดลง นอกจากนี้การหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจนนั้นได้พลังงานเพียง 2 ATP ดังนั้นรากพืชในสภาวะขาดออกซิเจน จึงมีพลังงานไม่เพียงพอต่อการเติบโต และกระบวนการเมตาบอลิซึมต่าง ๆ ทำให้พืชมีการเจริญเติบโตที่ลดลง (Taiz and Zeiger, 1991)

### ลักษณะทางสรีรวิทยาที่บ่งชี้สภาพเครียดเนื่องจากน้ำท่วมในพืช

เมื่อพืชเผชิญกับสภาพน้ำท่วม ส่งผลให้ระบบรากพืชนั้นเกิดความเสียหาย เนื่องจากระบบรากขาดออกซิเจน ความสามารถในการดูดน้ำจะลดน้อยลง มีผลทำให้การสร้างพลังงาน และการลำเลียงน้ำและธาตุอาหารของพืชลดลงเช่นกัน ได้รวบรวมรายงานเกี่ยวกับพารามิเตอร์ทางสรีรวิทยาที่มีการใช้เพื่อบ่งชี้ผลกระทบของสภาพน้ำท่วมที่มีต่อพืช ดังนี้

#### พลังงานศักย์รวมของน้ำในใบ (Total leaf water potential, $\Psi_t$ )

พลังงานศักย์รวมของน้ำในใบ หรือ Total leaf water potential ( $\Psi_t$ ) เป็นค่าที่บ่งบอกถึงระดับพลังงานเสรี (free energy) ของน้ำ เปรียบเทียบกับระดับพลังงานเสรีของน้ำบริสุทธิ์เป็นหลัก โดยกำหนดให้ค่า water potential ของน้ำบริสุทธิ์ที่ภาวะมาตรฐาน คือ ที่ความดันบรรยากาศมีค่า

เท่ากับศูนย์ 0 Mpa น้ำที่ใดมีพลังงานเสรีน้อยกว่าหรือมากกว่าน้ำบริสุทธิ์จะมีค่า water potential ต่ำกว่าหรือสูงกว่าศูนย์ ความสามารถและทิศทางการเคลื่อนที่ของน้ำที่เกิดจากพลังงานเสรีของน้ำ (osmosis) ขึ้นอยู่กับค่า water potential ของน้ำ กล่าวคือ น้ำจะเคลื่อนที่จากทิศทางที่น้ำมี water potential สูงไปยังที่ๆ มีค่า water potential ต่ำกว่าเสมอ (นวรรค์, 2541) เมื่อพิจารณาในภาพรวม พืชเป็นเส้นทางการไหลของน้ำจากดินสู่อากาศ ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบจึงสะท้อนสภาวะของน้ำในขณะนั้น คือแสดงดุลของอัตราน้ำไหลเข้าและอัตราน้ำไหลออกจากใบ ค่าพลังงานศักย์รวมจึงไม่มีค่าคงที่ และไม่มีระดับที่กล่าวได้ว่าเหมาะสมสำหรับแต่ละเวลาของพืชแต่ละชนิด นิยมวัดค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบของพืชในช่วงเช้าตรู่ก่อนใบสูญเสียน้ำเพิ่มขึ้น เพราะเป็นระดับพลังงานศักย์รวมของน้ำในพืชที่มีค่าสูงที่สุดในสภาพดินและอากาศช่วงนั้น เกิดหลังจากที่พืชได้น้ำซาดเซชเต็มที่ในเวลากลางคืนที่พืชมีการคายน้ำต่ำ ในกรณีที่มีแสงแดดที่ทำให้อากาศร้อนและแห้งขึ้นนั้นพืชจะเริ่มมีการคายน้ำ ทำให้พลังงานศักย์รวมของน้ำในใบพืชส่วนใหญ่จะมีค่าลดน้อยลงเมื่อเทียบกับช่วงเช้าตรู่แสดงให้เห็นว่าใบได้รับน้ำจากรากน้อยลงหรือใบเสียน้ำเพิ่มขึ้น (สุนทร และคณะ, 2543)

ในการศึกษาการตอบสนองของพืชในระดับสรีรวิทยาต่อสภาวะน้ำท่วม จึงพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบพืชภายใต้สภาพน้ำท่วม และเปรียบเทียบกับความสามารถในการรักษาค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบพืชระหว่างพันธุ์ทนและไม่ทนน้ำท่วม ดังเช่น รายงานวิจัยของ Gimenoa *et al.* (2012) ศึกษาเกี่ยวกับพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบสับดูค่าพบว่า มีความเกี่ยวข้องกับการตอบสนองของสับดูค่าในภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง โดยให้สับดูค่าได้รับสภาพน้ำท่วมเป็นระยะเวลา 1 4 7 และ 10 วัน ส่งผลให้ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบนั้นมีค่าลดน้อยลงตามระยะเวลาที่ได้รับสภาพน้ำท่วมยาวนานขึ้น เมื่อเทียบกับต้นปกติ มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ สุทธิพันธ์ (2548) ที่ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาที่เกี่ยวกับพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบของต้นส้มโชกุน 4 สายพันธุ์ ในสภาพน้ำท่วม เพื่อใช้บอกถึงการตอบสนองของส้มโชกุนในสภาวะน้ำท่วม โดยพบว่า เมื่อให้สภาพน้ำท่วมแก่ส้มโชกุน เป็นช่วงเวลาต่าง ๆ ตั้งแต่ 0 ชั่วโมง ถึง 28 วัน พบว่า ส้มโชกุนทั้ง 4 สายพันธุ์ มีค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบลดต่ำลง เมื่อได้รับสภาพน้ำท่วมยาวนานขึ้น เปรียบเทียบกับค่าของต้นปกติ เช่นเดียวกับ Ismail and Davies (1997) ที่เปรียบเทียบค่าพลังงานศักย์ของน้ำในใบพริกที่ได้รับสภาพน้ำท่วม เป็นระยะเวลา 7 วัน กับพริกที่ไม่ได้รับสภาพน้ำท่วม สังเกตเห็นว่าในช่วงแรกที่พริกได้รับสภาพน้ำท่วม ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของค่าพลังงานศักย์ของน้ำในใบ รวมไปถึงการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานของใบ แต่หลังจากวันที่ 4 ที่พริกได้รับสภาพน้ำท่วม พบว่าใบพริกมีลักษณะเหี่ยว และค่าพลังงานศักย์ของน้ำ

ในใบเริ่มลดลงเรื่อย ๆ และลดลงต่ำสุดที่ 6 วันหลังจากได้รับสภาพน้ำท่วม มีซึ่งค่าประมาณ -1.2 Mpa

### ประสิทธิภาพการให้แสงสูงสุด

หลักการของวิธีวัดฟลูออเรสเซนซ์ (Maxwell and Johnson, 2000) เป็นการวัดใบภายใต้สภาพแสงสองสภาพ คือ สภาพที่อยู่ในความมืดมาก่อนระยะหนึ่งที่ระบบปรับแสง PSII ส่งถ่ายอิเล็กตรอนไปจนหมดแล้ว กับในสภาพที่ได้รับแสงธรรมชาติ ในงานวิจัยฉบับนี้จะเน้นการวัดประสิทธิภาพการให้แสงสูงสุดในช่วงเวลากลางคืน ซึ่งก็คือ maximum quantum yield,  $\Delta_{dark}$  กล่าวคือ  $F_0$  เป็นตัวที่กำหนดค่าต่ำสุดของพลังงานแสงที่ถูกถ่ายเทในรูปของฟลูออเรสเซนซ์ส่วน  $F_m$  นั้นกำหนดค่าสูงสุดของรังสีฟลูออเรสเซนซ์ที่ระบายออกมา ความแตกต่างระหว่างค่า  $F_m$  และ  $F_0$  เรียกว่า variable fluorescence ( $F_v = F_m - F_0$ ) และประสิทธิภาพการให้แสงสูงสุดเรียก maximum quantum yield ( $\Delta_{dark}$ ) เป็นดัชนีแสดงประสิทธิภาพของการถ่ายเทพลังงานระหว่าง LHCII กับ P680 และเป็นค่าที่แสดงสัดส่วนของพลังงานแสงที่ใบพืชดูดกลืน (absorption) ทั้งหมดที่ถูกนำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสงหรือประสิทธิภาพของ PSII (Maxwell and Johnson, 2000) ในสภาพปกติกระบวนการให้แสงฉบับนี้มีค่า  $\Delta_{dark}$  0.81 - 0.8 (Gimenoa *et al.*, 2012) ค่า  $\Delta_{dark}$  จึงเป็นค่าที่นิยมใช้เป็นพารามิเตอร์ในการตรวจวัดความสมบูรณ์ของระบบ PSII ของพืชเมื่อพืชนั้นได้รับสภาวะเครียด

มีรายงานการใช้ค่าประสิทธิภาพการให้แสงสูงสุด ( $\Delta_{dark}$ ) เพื่อศึกษาการตอบสนองของพืชภายใต้สภาพน้ำท่วม เช่น ในฉบับ Gimeno *et al.* (2012) พบว่าเมื่อสับดูค่าที่ได้รับสภาพน้ำท่วม ค่า  $\Delta_{dark}$  มีการปรับลดลง เมื่อเพิ่มระยะเวลาของสภาพน้ำท่วมขัง โดยการลดลงของ  $\Delta_{dark}$  แสดงถึงความเสียหายที่เกิดขึ้นกับศูนย์กลางปฏิกิริยาของ PSII (P680) ดังนั้นการลดลงของค่าประสิทธิภาพการให้แสงสูงสุดจึงยืนยันว่า การจำลองสภาพน้ำท่วมที่ให้กับสับดูนี้ ทำให้สับดูได้รับสภาพเครียดจริง และรายงานวิจัยของ Verma *et al.* (2014) ที่ใช้กิ่งพันธุ์ของสับดูที่มีอายุ 40 วัน ให้ระดับน้ำท่วมสูงจากพื้นดิน 5 เซนติเมตร เป็นระยะเวลา 0 ถึง 4 สัปดาห์ และศึกษาการฟื้นตัวของสับดูหลังได้รับสภาพน้ำท่วม พบว่าเมื่อได้รับสภาพน้ำท่วม  $\Delta_{dark}$  มีค่าลดลงประมาณ 17 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับต้นปกติ และในช่วงการฟื้นตัวหลังน้ำท่วม พบว่า ค่า  $\Delta_{dark}$  เพิ่มขึ้นประมาณ 14 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับต้นสับดูที่ได้รับสภาพน้ำท่วม และมีการศึกษาในพืชตระกูลถั่วที่ได้รับสภาวะน้ำท่วม โดย Christiance and Shabala (2003) พบว่า ค่า  $F_v/F_m$  ของถั่วที่ได้รับสภาพน้ำท่วม มีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด เมื่อเปรียบเทียบกับต้นปกติ โดย

พบว่า หลังจากต้นถั่วได้รับสภาพน้ำท่วมเป็นเวลา 7 วัน ค่า Fv/Fm มีค่าลดลงถึง 0.756 เมื่อเทียบกับต้นปกติที่มีค่า 0.83

### การตอบสนองในระดับยีน

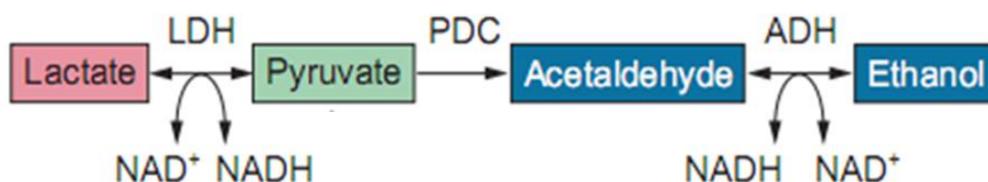
ในส่วนของการศึกษาการตอบสนองในระดับยีนต่อสภาพน้ำท่วมซึ่งเป็นภาวะที่มีออกซิเจนต่ำหรือขาดออกซิเจน ยังไม่มีรายงานในสบู่ดำ (Ceasar and Lgnacimuthu, 2011) แต่มีการวิจัยเกี่ยวกับยีนที่ตอบสนองต่อสภาพน้ำท่วมในพืชอื่นๆ เช่น *Arabidopsis* พบว่ามีการแสดงออกของยีนในกลุ่ม ERF ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับ ethylene response factors เมื่อได้รับสภาพน้ำท่วม ซึ่ง Licausi *et al.* (2010) ได้ศึกษาเกี่ยวกับยีนที่ตอบสนองต่อสภาพน้ำท่วมของ *Arabidopsis* ในกลุ่มของ ERF 2 ยีนคือ *HRE1* และ *HRE2* โดยถ่ายยีน *HRE1* เข้าไปใน *Arabidopsis* เพียงยีนเดียว พบว่าความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมมีน้อยซึ่งไม่ต่างกับพืชปกติ และเปรียบเทียบกับการถ่ายยีนทั้งสองชนิดร่วมกัน คือ *HRE1* และ *HRE2* พร้อมกันในต้นพืช พบว่าสามารถทนต่อสภาพน้ำท่วมได้ดีเมื่อเทียบกับต้นปกติ จึงกล่าวได้ว่ายีน *HRE1* และ *HRE2* นั้นมีการทำงานร่วมกันในสภาวะน้ำท่วม เช่นเดียวกับ Bailey and Voesenek (2008) ที่ศึกษาข้าวภายใต้สภาพน้ำท่วมลึก พบว่า มีการแสดงออกของยีนในกลุ่ม ERF คือ ยีน *Sub1A* ซึ่งถูกชักนำโดยเอธิลีนที่เพิ่มขึ้นภายใต้สภาพน้ำท่วม

งานวิจัยของ Hwang *et al.* (2011) ศึกษาการแสดงออกของยีนใน *Arabidopsis* ภายใต้สภาพออกซิเจนต่ำ พบการแสดงออกของกลุ่ม hypoxia-responsive genes ซึ่งรวมถึงยีนที่ควบคุมการสร้าง zinc finger protein, WRKY family transcription factor, glycosyl hydrolase, alcohol dehydrogenase (*ADH*) , pyruvate decarboxylase (*PDC*) และ phosphofructokinase รูปแบบการแสดงออกของ hypoxia-responsive genes แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มหลักๆ ได้แก่ กลุ่ม early response ได้แก่ ยีนในกลุ่ม fermentation-related genes และ กลุ่ม transcription factor เช่น zinc finger family และ WRKY family และมีรายงานวิจัยเกี่ยวกับยีนที่ตอบสนองต่อสภาพน้ำท่วมในข้าว โดย Hattori *et al.* (2011) ศึกษาการแสดงออกของยีนในข้าวโดยให้สภาพน้ำท่วมลึกที่ระดับ 50 เซนติเมตร เป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่า มีการแสดงออกของยีน *Sub1A* ในข้าว นอกจากนี้ยังมียีนกลุ่ม  $\alpha$ -amylase แสดงออกในข้าวภายใต้สภาพน้ำท่วมลึก ได้แก่ ยีน *RAmy3C* , *RAmy3D* และ ยีน *RAmy3E* และยีนที่เกี่ยวข้องกับ Sucrose synthase ที่แสดงออกได้แก่ยีน *Sus1* *Sus2* และ *Sus3* พบในรากของข้าวโพดและมันฝรั่ง

สำหรับงานวิจัยเอนไซม์และยีนที่เกี่ยวข้องกับการหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจน หรือ กระบวนการหมักนั้น Sachs *et al.* (1995) รายงานว่า เมื่อดันกล้าข้าวโพดได้รับสภาพน้ำท่วม พบว่า มีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหายใจ โดยดันกล้าที่อยู่ในภาวะการหายใจแบบ ไม่ใช้ออกซิเจน จะมีการสังเคราะห์โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจน เกิดขึ้น ประมาณ 20 ชนิด จัดอยู่ในกลุ่มของ anaerobic proteins (AnPs) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกิดขึ้นใน กระบวนการไกลโคไลซิส เช่น เอนไซม์ alcohol dehydrogenase, choline, aldolase, glycose-phosphate, isomerase, glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase, pyruvate decarboxylase และ sucrose synthase พืชที่ทนน้ำท่วมและไม่ทนน้ำท่วมนั้นจะมีปริมาณ ANPs ที่แตกต่างกัน ANPs มีความสำคัญในการสร้างและใช้พลังงานของพืช แบ่ง ANPs ได้เป็น 3 กลุ่มคือกลุ่มแรกได้แก่ enzymes mobilizing sucrose กลุ่มที่ 2 คือ main glycolytic enzymes และกลุ่มที่ 3 คือ enzymes of alcoholic fermentation (Ram *et al.*, 2002)

เมื่อเกิดน้ำท่วม จะเกิดการเปลี่ยนการหายใจจาก aerobic ไปเป็น anaerobic respiration และ เกิดกระบวนการ alcoholic fermentation ซึ่งให้พลังงานกับพืช เนื่องจากเมื่อพืชขาดออกซิเจน กระบวนการไกลโคไลซิสไม่สามารถเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ (Water *et al.*, 1991) อัตราของ alcoholic fermentation ที่เพิ่มขึ้นจึงสำคัญสำหรับการให้พลังงานซึ่งจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโต และการมีชีวิตรอดของพืชในสภาพน้ำท่วม กระบวนการหมักนี้มีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง 3 ชนิด คือ Lactate dehydrogenase (LDH) Pyruvate decarboxylase (PDC) และ Alcohol dehydrogenase (ADH) โดย LDH ทำหน้าที่เปลี่ยน pyruvate ที่เกิดขึ้นในขั้นตอนของ glycolysis ไปเป็น lactic acid โดย Lactic acid ที่อยู่ในเซลล์ จะทำให้ไซโตซอลมีสถานะเป็นกรดสูงขึ้น จึงกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ PDC ให้มีการทำงานเพิ่มมากขึ้น โดยเอนไซม์ PDC ซึ่งเป็นเอนไซม์แรก และถูกจัดให้เป็น rate-limiting enzyme ของกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ในพืชที่ได้รับสภาพขาด ออกซิเจน จะเปลี่ยน pyruvate เป็นเป็น acetaldehyde ซึ่ง acetaldehyde ที่มีความเป็นพิษ พืชจะถูก ลดการเป็นพิษโดยการเปลี่ยน acetaldehyde เป็น ethanol โดยอาศัย เอนไซม์ ADH ทำให้เกิด พลังงานในรูปของ NAD<sup>+</sup> และ ATP (Ap Rees *et al.*, 1987; Kennedy *et al.*, 1992; Tadege *et al.* (1999) (ภาพที่ 1)

รายงานว่ กระบวนการหมักที่เกิดขึ้นภายใต้สภาวะน้ำท่วม เนื่องจากไกลโคไลซิส คือ กระบวนการย่อยสลายน้ำตาล การหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจน ผลผลิตที่ได้จากการสังเคราะห์แสง จะเปลี่ยนจากแป้งเป็นน้ำตาล เนื่องจากขาดออกซิเจน ซึ่งเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย โดยพืชจะ เปลี่ยนไปเป็นกระบวนการหมัก กระบวนการหมักที่เกิดขึ้นภายใต้สภาวะออกซิเจนต่ำนี้



ภาพที่ 1 กระบวนการสร้าง lactate และ ethanol ภายใต้สภาวะขาดออกซิเจน

ที่มา: Tadege *et al.*, (1999)

### ยีน pyruvate Decarboxylase (PDC)

ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอนไซม์ pyruvate decarboxylase ได้แก่ ยีน *PDC* ซึ่งมีการศึกษาเกี่ยวกับยีน *PDC* ในหลาย ๆ พืช เช่น Kursteiner *et al.* (2003) ศึกษาใน *Arabidopsis* เกี่ยวกับการแสดงออกของยีน *PDC* ภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจน โดยไม่มีสภาวะเครียดอื่นร่วมด้วย เปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในส่วนต่าง ๆ ของ *Arabidopsis* เช่น เมล็ด ดอก ยอด ราก และ ต้นกล้า พบว่ามีการแสดงออกของยีน *PDC* ในทุกส่วนของพืช แต่มีการแสดงออกมากที่สุดในการแสดงออกที่สูงสุดในดอก นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อทำการถ่ายยีน *PDC* เข้าไปในราก จะทำให้ *Arabidopsis* ทนน้ำท่วมได้มากขึ้น มีรายงานเกี่ยวกับ *PDC* ในข้าวโพดโดย Dolferus *et al.* (1999) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการถ่ายยีนในฝ้าย โดยใช้ยีน *PDC1* ที่ได้จากข้าว โดยใช้ 35s เป็นโปรโมเตอร์ หลังจากนั้นนำต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนมาปลูกเปรียบเทียบกับต้นที่ได้รับการถ่ายยีนในสภาพออกซิเจนต่ำ พบว่า ต้นที่ได้รับการถ่ายยีนนั้นมีการทำงานของเอนไซม์ *PDC* สูงกว่าต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และยังพบว่าเมื่อมีการสังเคราะห์ ethanol เพิ่มขึ้นด้วยเมื่อเทียบกับต้นปกติ แต่ยังไม่มียางานว่า การเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์ *PDC* นั้นจะทำให้ฝ้ายทนทานต่อสภาพน้ำท่วมได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยเกี่ยวกับระดับการทำงานของเอนไซม์ *PDC* ในข้าว และ *Arabidopsis* โดย Dennis *et al.* (2000) พบว่า เมื่อถ่ายยีน *PDC* เข้าสู่ *Arabidopsis* และให้ได้รับสภาพออกซิเจนต่ำ จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ *PDC* สูงขึ้น เมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน เช่นเดียวกับ Quimino *et al.* (1999) ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ *PDC* ในข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน *PDC* เทียบกับข้าวที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน โดยให้สภาพออกซิเจนต่ำเป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่า ข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน *PDC* มีกิจกรรมของเอนไซม์ *PDC* ที่สูงกว่า ในข้าวที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และ Kato-Noguchi (2002) ได้ให้สภาพออกซิเจนต่ำ คือ 5 เปอร์เซ็นต์ ออกซิเจน และ 5 เปอร์เซ็นต์ในโตรเจนกับต้นข้าว ที่ระยะเวลา 0 1 2 3 4 12 18 และ 24 ชั่วโมง พบกิจกรรมของเอนไซม์ *PDC* เพิ่มขึ้นที่ 6

ชั่วโมง หลังจากได้รับสภาพน้ำท่วม และมีปริมาณความเข้มข้นของเอทานอลเพิ่มสูงขึ้น โดยวัดค่าได้สูงสุดที่ 24 ชั่วโมง หลังจากได้รับสภาพน้ำท่วม

ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kato-Noguchi and Morokuma (2007) ที่ให้สภาพออกซิเจนต่ำเป็นเวลา 48 ชั่วโมง กับข้าวที่มีอายุ 3 วันหลังจากงอก พบว่า ข้าวทั้ง 4 สายพันธุ์ มีการทำงานของเอนไซม์ PDC เพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับต้นปกติที่ไม่ได้รับสภาวะออกซิเจนต่ำ

ยีน alcohol dehydrogenase (*ADH*)

ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอนไซม์ alcohol dehydrogenase ได้แก่ ยีน *ADH* Francis *et al.* (1974) พบว่าในสภาพที่มีน้ำท่วม นั้น การทำงานของเอนไซม์ alcohol dehydrogenase ในรากของพืชตระกูลถั่วคลุมดิน จะมีอัตราเพิ่มขึ้นเป็น 30 เท่า ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากระบวนการหายใจแบบ anaerobic เกิดขึ้น Schramm and Mazurowa (1975) พบว่า เมื่อนำใบเลี้ยงของถั่ว ไปจุ่มลงในน้ำที่เติมอากาศลงไปเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาวิเคราะห์ พบว่าการทำงานของเอนไซม์ malic dehydrogenase ลดน้อยลง แต่เอนไซม์ alcohol dehydrogenase จะสูงขึ้น ในปัจจุบันมีการศึกษาในพืชหลายชนิดเกี่ยวกับ ยีน *ADH* ในระดับจีโนมเลกุล เกี่ยวกับการศึกษาลำดับเบสและการโคลนยีนทั้งในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและพืชใบเลี้ยงคู่ เช่น ข้าว ข้าวโพด ข้าวบาร์เลย์ ถั่ว และ มะเขือเทศ เป็นต้น Van der Straeten *et al.*, 1991 ศึกษา ยีน *ADH* ในมะเขือเทศที่มีอายุ 1 เดือน โดยจำลองสภาพน้ำท่วมให้มะเขือเทศถูกน้ำท่วมอยู่ในระดับ 13 เซนติเมตร วัดจากความสูงของดินเป็นเวลา 40 ชั่วโมง พบว่าสภาวะที่ขาดออกซิเจนในช่วงแรก สามารถกระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีน *ADH* เกิดขึ้น โดยมีการแสดงออกสูงสุดในชั่วโมงที่ 8 และมีการแสดงออกลดลงหลังจากนั้น Kumutha *et al.* (2008) ได้เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *ADH* ในรากของต้นถั่วที่ได้รับสภาพน้ำท่วม ด้วยเทคนิค RT-PCR ของถั่วสายพันธุ์ ICPL8403 (ทนต่อสภาพน้ำท่วม) และ สายพันธุ์ ICP7035 (ไม่ทนต่อสภาพน้ำท่วม) พบว่าปริมาณความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอของสายพันธุ์ ICPL8403 เข้มที่สุด เมื่อเทียบกับแถบดีเอ็นเอของต้นถั่วสายพันธุ์ ICP7035 ซึ่งกล่าวได้ว่า พันธุ์ทนน้ำท่วมเมื่อได้รับสภาพน้ำท่วมแล้วจะมีการชักนำให้ยีน *ADH* แสดงออกมากขึ้น

# อุปกรณ์ และ วิธีการ

## อุปกรณ์

### 1. พืชทดลอง

ต้นกล้าสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) สายพันธุ์ชัชชนาท ที่ได้จากการเพาะเมล็ด อายุ 2 เดือน

### 2. วัสดุและอุปกรณ์ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน

- 2.1 เครื่องแก้วต่าง ๆ เช่น ขวดแก้วขนาด 4 ออนซ์ บีกเกอร์ กระจกบด
- 2.2 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)
- 2.3 ตู้อบ (hot air oven)
- 2.4 เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH-meter)
- 2.5 เครื่องชั่งสาร (balance)
- 2.6 เตาไมโครเวฟ (microwave)
- 2.7 โกร่งบดตัวอย่าง
- 2.8 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) และเครื่องกวนตะกอน (vortex)
- 2.9 เครื่อง Thermal Cycler สำหรับทำปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR)
- 2.10 ชุดเครื่องมือ gel documentation system พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพเจล
- 2.11 ชุดเครื่องมือวิเคราะห์การแสดงออกของยีน Mastercycler ep realplex (บริษัท Eppendorf Thailand)
- 2.12 ชุดเครื่องมืออะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส
- 2.13 เครื่อง NanoDrop รุ่น 8000 บริษัท Thermo Scientific

### 3. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอจากพืช

- 3.1 Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB)
- 3.2 Polyvinylpyrrolipone (PVP)
- 3.3 beta-mercaptoethanol
- 3.4 Sodium Chloride

- 3.5 Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)
  - 3.6 TRIS hydrochloride (Tris-HCl)
  - 3.7 Chloroform
  - 3.8 Isoamyl alcohol
  - 3.9 DEPC
  - 3.10 DNase I (Fermentas, USA)
  - 3.11 10X DNase I reaction buffer
4. สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ first strand DNA
    - 4.1 OligodT primer (Fermentus, USA)
    - 4.2 Deoxyribonucleotide triphosphate (Fermentus, USA)
    - 4.3 5x reaction buffer (Fermentus, USA)
    - 4.4 RiboRock RNase inhibitor (Fermentus, USA)
    - 4.5 Revert Aid M-MuLVRT (Fermentus, USA)
    - 4.6 RNaseH (Fermentus, USA)
5. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *ADH* และ *PDC* โดยวิธี PCR
    - 5.1 dNTP
    - 5.2  $MgCl_2$
    - 5.3 10X buffer
    - 5.4 ไพรเมอร์ยีน *ADH* *PDC* และ *Actin*
    - 5.5 *Taq* DNA polymerase
6. สารเคมีที่ใช้ในการทำ real-time PCR
    - 6.1 Thermo Scientific Maxima SYBR Green qPCR Master Mix ของบริษัท BIOLIN
    - 6.2 ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีน *PDC* *ADH* และ *Actin*

## 7. อุปกรณ์สำหรับปลูกพืช

ได้แก่ ทราย กระบะปลูก กระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 นิ้ว

## 8. วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้วัดค่าทางสรีรวิทยา

8.1 เครื่องวัดความดัน (pressure chamber บริษัท SoilMoisture Equipment

ประเทศ สหรัฐอเมริกา

8.2 เครื่องมือประเภท portable chlorophyll II flurometer รุ่น PAM2001

(บริษัท Heinz Walz GmbH ประเทศเยอรมัน)

8.3 แผ่นพลาสติกใส (wrap)

8.4 ใบมีด

8.5 แวนชยาย

## 9. โปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ข้อมูล

9.1 ฐานข้อมูลสำหรับหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนหรือสายดีเอ็นเอที่สนใจ จาก website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/>

9.2 โปรแกรมสำหรับการออกแบบไพรเมอร์และเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างสายดีเอ็นเอที่สนใจกับฐานข้อมูล ได้แก่โปรแกรม clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/clustal W/>) primer3 ([www.bioinformatics.nl/primer3plus/](http://www.bioinformatics.nl/primer3plus/)) และ OligoAnalyzer 3.1 ([www.sg.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/](http://www.sg.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/))

## วิธีการ

### 1. การเตรียมพืชทดลอง

เพาะเมล็ดสับดูดำ โดยเลือกผลสับดูดำสายพันธุ์ชยันนาท ที่มีสีเหลืองแกมน้ำตาล หลังจากนั้นนำมาเพาะในกระบะเพาะเมล็ดโดยมีวัสดุเพาะเป็นทรายละเอียด เมื่อต้นกล้าสับดูดำมีอายุ 1 เดือน ย้ายต้นกล้าลงกระถางขนาด 6 นิ้วโดยใช้ทรายเป็นวัสดุปลูก บำรุงต้นโดยการให้น้ำปุ๋ยสูตรเสมอ 16-16-16 ปลูกจนกระทั่งต้นเจริญเติบโตและมีอายุ 2 เดือน คัดเลือกเฉพาะต้นที่มีความสมบูรณ์และมีขนาดใกล้เคียงกัน ทำการระบุหมายเลขต้นสับดูดำ และตำแหน่งใบในแต่ละต้น เพื่อจะใช้เป็นใบที่วัดผลในการจำลองสภาพน้ำท่วมต่อไป

### 2. การจำลองสภาพน้ำท่วม

จำลองสภาพน้ำท่วม โดยการนำกระถางที่ปลูกสับดูดำ มาแช่น้ำในกระบะน้ำที่มีความจุ 80 ลิตร จำนวน 6 กระบะ ให้ระดับน้ำสูงจากพื้นกระบะ 30 เซนติเมตร และให้ระดับน้ำสูงจากผิววัสดุปลูกในแต่ละกระถาง 15 เซนติเมตร ให้สับดูดำอยู่ในสภาพน้ำท่วมซึ่งเป็นเวลา 15 วัน โดยมีจำนวนต้นสับดูดำ 9 ต้นในแต่ละกระบะ รวมจำนวนต้นสับดูดำที่ใช้ในการทดลองทั้งสิ้น 54 ต้น โดยระยะเวลาที่สับดูดำได้รับสภาพน้ำท่วม คือ 15 วัน

บันทึกลักษณะการเปลี่ยนแปลงและการตอบสนองต่อสภาพน้ำท่วมที่จำลองให้กับต้นกล้าสับดูดำ ทั้งการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการตอบสนองในเชิงสรีรวิทยา เพื่อเป็นการยืนยันว่าต้นกล้าสับดูดำได้รับความเครียดเนื่องจากสภาพน้ำท่วมจริง โดยการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา บันทึกการเปลี่ยนสีของใบ การเปลี่ยนแปลงของลำต้น และการเปลี่ยนสีของราก ตั้งแต่ก่อนการขังน้ำจนถึงสิ้นสุดการทดลอง ในส่วนของการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสรีรวิทยา ลักษณะที่เลือกมาศึกษาคือ ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบพืช (total leaf water potential,  $\Psi_t$ ) และประสิทธิภาพการใช้แสงสูงสุด (maximum quantum yield,  $\Phi_{dark}$ )

การวัดประสิทธิภาพการใช้แสงสูงสุด เป็นการวัดประสิทธิภาพการใช้แสงของใบในที่มีดด้วยเครื่องมือประเภท portable chlorophyll II fluorometer รุ่น PAM2001 (บริษัท Heinz Walz GmbH ประเทศเยอรมัน) ใช้ใบตำแหน่งที่ 4 นับจากยอดจากต้นสับดูดำที่ได้รับสภาพน้ำท่วมเป็นระยะเวลา 0 ชั่วโมง ถึง 15 วัน ซึ่งเป็นใบที่มีการเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว เก็บข้อมูลในช่วงกลางคืน เวลาประมาณ

20.00 - 21.00 น. ในวันที่ 1-10 วัน และเก็บข้อมูลในวันที่ 15 หลังจากได้รับสภาพน้ำท่วม ในแต่ละครั้ง เก็บข้อมูลใบสนุ่ค่า 3 ใบ จากต้นสนุ่ค่า 3 ต้น ในการวัดประสิทธิภาพการใช้แสงสูงสุดนี้ ใช้ใบจากต้นกล้าสนุ่ค่า 2 ชุด ชุดแรกเรียกว่าใบตัด คือใบที่ถูกตัดจากต้นหลังจากวัดค่าพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพการใช้แสงแล้ว เพื่อใช้วัดค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบ ใบชุดที่สองเรียกว่าใบตาม คือใบที่ใช้ติดตามวัดประสิทธิภาพการใช้แสงทุกวันอย่างต่อเนื่อง โดยวัดในวันและช่วงเวลาเดียวกันกับที่เก็บข้อมูลของใบตัด

การวัดค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบ (Ψ) เลือกวัดใบในตำแหน่งที่ 4 นับจากยอดลงมา ซึ่งเป็นตัวอย่างใบตัดใบเดียวกับที่ใช้วัดค่าประสิทธิภาพการใช้แสงสูงสุด โดยใช้เครื่องวัดความดัน (pressure chamber บริษัท SoilMoisture Equipment ประเทศสหรัฐอเมริกา) ซึ่งอาศัยหลักการวัดของ Boyer (1995) คือวัดพลังงานความดันภายในท่อน้ำของพืช โดยใช้แผ่นพลาสติกใส (wrap) หุ้มชิ้นส่วนใบเพื่อป้องกันการระเหยน้ำหลังตัดใบออกจากต้น ใส่ชิ้นส่วนใบเข้าเครื่องวัด จากนั้นเพิ่มความดันแก๊สซึ่งมาจากถังบรรจุไนโตรเจน พร้อมกับสังเกตฟิล์มน้ำที่ปลายก้านใบผ่านแว่นขยาย อ่านค่าและบันทึกค่าความดันที่ได้ซึ่งจะอยู่ในรูปค่าติดลบ เป็นค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบ มีหน่วยเป็นกิโลพาสกาล (kPa) เก็บข้อมูลต้นที่ปลูกในสภาพควบคุม (0 ชั่วโมง) เปรียบเทียบกับต้นที่ได้รับสภาพน้ำท่วมในแต่ละช่วงเวลา คือ ได้รับสภาพน้ำท่วมตั้งแต่วันที่ 1-10 และเก็บในวันที่ 15 หลังจากได้รับสภาพน้ำท่วม ในแต่ละครั้ง เก็บข้อมูลใบสนุ่ค่า 3 ใบ จากต้นสนุ่ค่า 3 ต้น ในช่วงเวลาเช้ามืด ตั้งแต่เวลาประมาณ 5.00 ถึง 6.00 น.

### 3. การสกัดอาร์เอ็นเอรวม

สกัดอาร์เอ็นเอรวมโดยวิธีของ Laksana (2011) นำตัวอย่างใบอ่อนและรากของสนุ่ค่าหนัก 0.1 กรัม จากต้นที่ได้รับสภาพน้ำท่วมเป็นระยะเวลา 6 12 24 48 96 และ 192 ชั่วโมง และจากต้นในสภาพควบคุม (ได้รับสภาพน้ำท่วม 0 ชั่วโมง) มาบดในไนโตรเจนเหลวจนละเอียด ย้ายตัวอย่างลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม extraction buffer 2% CTAB, 2%PVP, 100 mM-HCl, 25 mM EDTA, 5M NaCl และ  $DH_2O$  ที่ผ่านการกำจัด RNase ด้วย diethyl pyrocarbonate: DEPC) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร แล้วเติม  $\beta$ -mercaptoethanol ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วย vortex และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เติม phenol:chloroform:isoamy alcohol (25:24:1) ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยเขย่าแรง ๆ แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสใ้หลอดใหม่ แล้วเติม chloroform:isoamy alcohol (24:1) หนึ่งเท่าของปริมาณส่วนใส ผสมให้เข้ากันโดย

เขย่าแรง ๆ แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที คูด่วนใส่หลอดใหม่แล้วเติม isopropanol ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และ 5M NaCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วล้างตะกอนด้วย 70 % ethanol ที่เข้มข้นปริมาตร 300 ไมโครลิตร แล้วหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วตากตะกอนประมาณ 20 นาที และเติม DEPC-dH<sub>2</sub>O ปริมาตร 25 ไมโครลิตร และเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

นำอาร์เอ็นเอรวมที่สกัดได้มาตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นโดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส ด้วย 1 % อะกาโรส ใน 0.5X MOPs ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาทีและวัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น A<sub>260/280</sub> นาโนเมตร โดยเครื่อง NanoDrop รุ่น 8000

#### 4. การกำจัดจีโนมมิกดีเอ็นเอออกจากตัวอย่างอาร์เอ็นเอรวม

กำจัดจีโนมมิกดีเอ็นเอออกจากอาร์เอ็นเอรวมที่สกัดได้โดยใช้ DNase I (Fermentas, USA) นำอาร์เอ็นเอรวมที่สกัดได้ 1 ไมโครกรัม เติม 10X DNase I reaction buffer ที่ผสม MgCl<sub>2</sub> ไว้แล้ว ปริมาตร 1 ไมโครลิตร DNase I 1 ไมโครลิตร น้ำกลั่นที่ผ่านการทำลายเอนไซม์ RNase ด้วย DEPC ปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติม 50 mM EDTA 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 10 นาที แล้วนำมาแช่ในน้ำแข็ง 1 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ DNase I แล้วทำการตรวจสอบผลการกำจัดจีโนมมิกดีเอ็นเอด้วยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสใน 1เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสใน 1X MOPs ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที

#### 5. การสังเคราะห์ first strand cDNA

นำอาร์เอ็นเอรวม ที่สกัดได้มาสร้าง first strand DNA โดยนำอาร์เอ็นเอรวม 1 ไมโครกรัม มาผสมกับ OligodT primer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 10 mM dNTP mix ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ DEPC-treated water ให้ได้ปริมาตรรวม 12.5 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แล้วเติมสารละลายต่าง ๆ ดังต่อไปนี้ 5x reaction buffer ปริมาณ 4 ไมโครลิตร RiboRock RNase inhibitor ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร 10 mM dNTP mix ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ Revert Aid

M-MuLVRT ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และนำไปแช่ในน้ำแข็งเดิม RNaseH ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร แล้ววัดความเข้มข้นของ first strand DNA ที่ได้ด้วยเครื่อง Bio-Photometer Plus

## 6. การออกแบบไพรเมอร์ และการทำ PCR จาก first strand cDNA

ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับส่วนของยีน *Alcohol Dehydrogenase (ADH)* และยีน *Pyruvate Decarboxylase (PDC)* สำหรับปฏิกิริยา PCR โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนอนุรักษ์ของยีน *ADH* จาก *Manihot esculenta* (Accession number EU250000.1), *Citrus sinensis* (Accession number XM\_006480124.1), *Lithachne humilis* (Accession number U91624.1), *Sorghum halepense*, (Accession number DQ096168.1) และยีน *PDC* จาก *Populus trichocarpa* (Accession number XM\_002322961.2), *Ricinus communis* (Accession number XM\_002530454.1), *Solanum lycopersicum* (Accession number XM\_004246730.1), *Fragaria vesca* subsp. *vesca* (Accession number XM\_004294256.1) ที่ปรากฏในฐานข้อมูล Genbank ออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม OligoAnalyzer 3.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *ADH* และ *PDC* ที่ออกแบบได้แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *ADH* *PDC*

ยีน	annealing temperature (°C)	ไพรเมอร์
<i>ADH</i>	58	Forward 5' TGATGGGGTRCCAATA'3
		Reverse 5' CCAAACCTTCTTGGCTTCT 3'
<i>PDC</i>	56	Forward 5' TGGTCAACTGCCA GAAG 3'
		Reverse 5' AGTTCTTGATSACGTTGTA 3'

ตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *ADH* และ *PDC* ในอาร์เอ็นเอของสับงูดำ โดยใช้ first strand cDNA เป็นแม่แบบ ใช้ไพรเมอร์และอุณหภูมิ annealing ตามตารางที่ 1 ปริมาณสารที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR แสดงในตารางที่ 2 โดยผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่คาดว่าจะได้จากยีน *ADH* คือชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาด 286 คู่เบส และ ขนาด 337 คู่เบส จากยีน *PDC* ปฏิกิริยา PCR แบ่งเป็น ขั้นตอน pre-denature ใช้อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ขึ้นต่อมา denature ประกอบด้วยอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที อุณหภูมิ annealing สำหรับยีน *ADH* 58 องศาเซลเซียส สำหรับยีน *PDC* 56 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ขั้นตอน extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที ตามลำดับ ทำซ้ำขั้นตอน denature ถึง extension จำนวน 30 รอบ แล้วตามด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดตรวจสอบผลโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรส เจล เข้มข้น 1% ในบัฟเฟอร์ 0.5X TBE แล้วแยกขนาดโดยใช้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลไปย้อมด้วยสารละลายเอทิลเดียมโบรไมด์ และตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation จากนั้นส่งผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท 1st BASE (ประเทศมาเลเซีย) แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้มาเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ADH* และ *PDC* ในฐานข้อมูลสาธารณะโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป BLASTN ในฐานข้อมูล NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)

หลังจากนั้น นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตรวจสอบแล้วว่าเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะกับยีน *ADH* และ *PDC* ในสับงูดำ มาออกแบบ และสังเคราะห์ไพรเมอร์สำหรับการตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยวิธี real-time PCR ต่อไป

## ตารางที่ 2 ปริมาณสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR

สารที่ใช้	ปริมาณ (ไมโครลิตร)	
	<i>ADH</i>	<i>PDC</i>
1. ดีเอ็นเอต้นแบบ (5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	2	2
2. dNTP (250 ไมโครโมลต่อไมโครลิตร)	5	5
3. MgCl <sub>2</sub> (5 มิลลิโมลาร์)	2	2
4. 10Xbuffer (10mM Tris-HCl pH 8.0, 50mM KCl)	2	2
5. ไพรมเมอร์ (0.125 ไมโครโมลาร์)	0.5	0.5
6. <i>Taq</i> DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0.1	0.05
7. น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ	8.4	8.45
ปริมาณรวม	20	20

### 7. ศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค real-time PCR

ศึกษาการวัดการแสดงออกของยีน *ADH* และ *PDC* ด้วยเทคนิค real-time PCR โดย ออกแบบไพรมเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สังเคราะห์ได้จากการทดลองก่อนหน้านี้โดยใช้โปรแกรม primer3 ไพรมเมอร์ของยีน *ADH* *PDC* และ *Actin* ที่ออกแบบได้แสดงในตารางที่ 3 วิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนด้วยเครื่อง Mastercycler® ep realplex บริษัท Eppendorf (Thailand) ใช้ชุด SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit บริษัท BIOLIN ชุด โดยการเติม Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2x) ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร แล้วเติม forward primer และ reverse primer ความเข้มข้นชนิดละ 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรชนิดละ 0.75 ไมโครลิตร เติม first strand cDNA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และเติม DEPC-treated water ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ตั้งโปรแกรมสำหรับปฏิกิริยา PCR ดังนี้ denature อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที จำนวน 45 รอบ โดยมียีน *Actin* เป็น internal control ที่เหมาะสมกับสปีชีส์ เป็นยีนควบคุม และคำนวณค่า relative expression โดยการนำค่าการแสดงออกของยีน *ADH* และ *PDC* ในใบในสถานะที่ไม่ถูกนำท่วมจากต้นควบคุมเป็นยีนอ้างอิง

**ตารางที่ 3** ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์สำหรับ real-time PCR ที่จำเพาะกับยีน *ADH* *PDC* และ *Actin*

ยีน	annealing temperature (°C)	ไพรเมอร์
<i>ADH</i>	60	Forward 5' CAATCCCTTAGCTCCTTTGG'3
		Reverse 5' TCTTTGGTTTAGCCACATTCA 3'
<i>PDC</i>	60	Forward 5' ACATCGCAGCATTGTTGAAA 3'
		Reverse 5' CGTGCCACTTTTCGGTATG 3'
<i>Actin</i>	60	Forward 5' AGCTTCCTGATGGGCAAGTC 3'
		Reverse 5' GGAACCACCACTGAGCACAA 3'

#### 8. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและถ่ายยีน และห้องปฏิบัติการชีววิทยาโมเลกุล  
ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

เรือนปลูกพืชทดลอง ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต  
กำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

#### 9. ระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง

เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2554 ถึง เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2557

## ผลและวิจารณ์

### การจำลองสภาพน้ำท่วม

จากการให้ต้นกล้าสบู่ดำเผชิญกับสภาพน้ำท่วมเป็นระยะเวลา 0-15 วัน พบการเปลี่ยนแปลงทั้งทางลักษณะสัณฐานวิทยา ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบ ( $\Psi$ ) และประสิทธิภาพการใช้แสงสูงสุด ( $\Phi_{dark}$ ) ดังนี้

#### การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา

สังเกตการเปลี่ยนแปลงทางด้านสัณฐานวิทยา พบว่า สบู่ดำที่อยู่ในสภาวะน้ำท่วมยังมีลักษณะแตกต่างจากต้นควบคุมอย่างเห็นได้ชัด โดยลักษณะผิดปกติที่เกิดขึ้นสามารถตรวจพบได้ทั้งที่ ส่วนใบ ส่วนลำต้น และส่วนราก (ภาพที่ 2)

ในส่วนของใบ พบว่า เมื่อสบู่ดำได้รับสภาพน้ำท่วมขังในช่วง 1-4 วันแรก ยังไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงของใบอย่างเด่นชัด แต่เมื่อสบู่ดำได้รับสภาพน้ำท่วมขังเป็นระยะเวลาตั้งแต่ 5 วันเป็นต้นไป สบู่ดำเริ่มแสดงอาการใบเหี่ยว โดยสังเกตได้ในตอนกลางวัน และตอนเย็น แต่เมื่อสบู่ดำได้รับสภาพน้ำท่วมเป็นเวลายาวนานขึ้น ใบสบู่ดำจะเริ่มเปลี่ยนสีจากสีเขียวเข้มเป็นสีเหลือง สังเกตเห็นได้ชัดเจนในวันที่ 10 หลังได้รับสภาพน้ำท่วมเป็นต้นไป เมื่อเปรียบเทียบกับต้นควบคุม อาการใบเหลืองของสบู่ดำที่เผชิญกับสภาพน้ำท่วมจะแสดงอาการชัดเจนมากขึ้นเมื่อได้รับสภาพน้ำท่วมยาวนานขึ้น และพบว่าเกิดขึ้นที่ใบที่มีอายุมากกว่าหรือใบที่อยู่ทางส่วนโคนของกิ่งในแต่ละกิ่งย่อย และหลังจากได้รับสภาพน้ำท่วมเป็นระยะเวลา 15 วัน เริ่มสังเกตเห็นการม้วนพับของใบเกิดขึ้น และพบว่า มีการยืดตัวของยอดเกิดขึ้นอีกด้วย

ลักษณะทางสัณฐานของใบที่เปลี่ยนแปลงนั้น มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Maryam and Nasreen (2012) ซึ่งรายงานว่ ในข้าวฟ่างที่ได้รับสภาพน้ำท่วมเป็นเวลานาน จะมีการเปลี่ยนแปลงของใบเกิดขึ้น โดยใบแก่หลุดร่วงก่อนใบอ่อน เนื่องจากมีการสังเคราะห์เอทิลีนมาก เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Yin *et al.* (2009) พบว่า เมื่อต้นเบญจมาศได้รับสภาพน้ำท่วมใน 2 วัน เริ่มแสดงอาการเหี่ยวเกิดขึ้น และเกิดใบร่วงตามมา เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Malik *et al.* (2001) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางด้านสัณฐานของข้าวสาลีที่ได้รับสภาพน้ำท่วม เป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่า

หลังจาก 14 วัน ที่ข้าวสาลีได้รับสภาพน้ำท่วมส่งผลให้การเจริญเติบโตและน้ำหนักแห้งของข้าวสาลีลดลงอย่างมาก โดยมีค่าลดลงตามระยะเวลาที่ได้รับสภาพน้ำท่วมยาวนานขึ้น นอกจากนี้ยังสังเกตเห็นการเสื่อมสภาพของใบ โดยใบแก่จะแสดงอาการหลุดร่วงก่อนใบอ่อน เมื่อเทียบกับต้นควบคุม

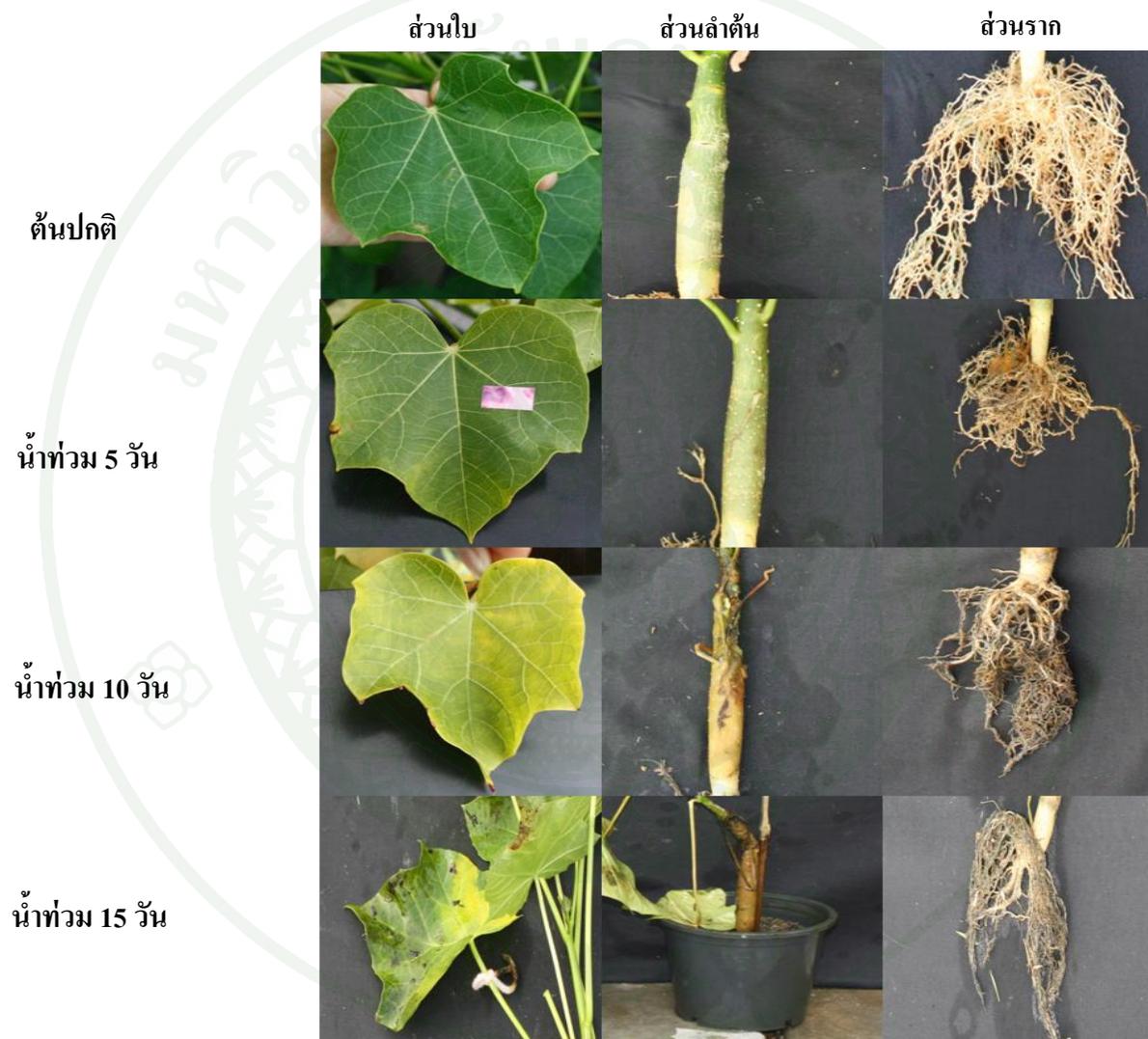
ในเรื่องการยึดตัวของพืชในระหว่างน้ำท่วมมีรายงานว่า พืชอาจได้รับอิทธิพลจากเอธิลีน และ GA โดย Hoffman-Benning and Kende (1992) ศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับการยึดตัวของข้าวน้ำลึก พบว่า การยึดตัวของข้อปล้องระหว่างน้ำท่วมถูกควบคุมโดยอัตราส่วนของ Gibberellin และ ABA และเอธิลีนเป็นตัวสนับสนุนกิจกรรมของ Gibberellin ซึ่งสภาพน้ำท่วมจะชักนำให้เกิดการสะสมของเอธิลีน ทำให้เกิดการลดระดับของ ABA ภายในเซลล์เป็นผลให้เกิดการยึดตัวของลำต้นของพืชต่อ Gibberellin เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Voesenek *et al.* (2003) พบว่าเมื่อ *Rumex palustris* ได้รับสภาพน้ำท่วมจะส่งผลให้มีการยึดตัวของก้านใบ และมีการยึดตัวอย่างเห็นได้ชัดเมื่อได้รับสภาพน้ำท่วมเป็นเวลา 50 ชั่วโมง และ Malik *et al.* (2001) พบว่า เมื่อข้าวสาลีได้รับสภาพน้ำท่วมเป็นระยะเวลา 14 วัน การยึดตัวของยอดยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับต้นปกติ แต่เมื่อข้าวสาลีได้รับสภาพน้ำท่วมที่ระดับความลึก 100 มิลลิเมตร พบว่าข้าวสาลีมีการยึดตัวของยอดที่ลดลงและยังส่งผลให้ใบมีลักษณะที่สั้นลง เนื่องจากการแตกกอที่ลดลง จึงลดอัตราการยึดตัวของยอด

ในส่วนลำต้น ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของลำต้นสับดูดำ เมื่อได้รับสภาพน้ำท่วมในช่วงแรก แต่เมื่อสับดูดำได้รับสภาพน้ำท่วมเป็นระยะเวลา 5 วันขึ้นไป พบลักษณะปุ่มลีขาวบริเวณลำต้นเหนือผิวน้ำ เมื่อสับดูดำได้รับสภาพน้ำท่วมชงยาวนานขึ้น สังเกตเห็นลักษณะโคนต้นบวมพอง และเริ่มปริแตก และในวันที่ 15 หลังจากได้รับสภาพน้ำท่วม พบว่าลำต้นเน่า และหักล้ม

จากลักษณะการเปลี่ยนแปลงของลำต้นสับดูดำนี้ มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yin *et al.* (2009) ที่พบว่า วันที่ 18 หลังจากเบญจมาศได้รับน้ำท่วม มีการเปลี่ยนแปลงของลำต้นคือลำต้นแตก หักงอ และเมื่อได้รับสภาพน้ำท่วมเป็นระยะเวลานานขึ้นลำต้นเน่า และต้นเบญจมาศตายในที่สุด มารวย และไพศาล (2539) ได้ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาของถั่วเขียวเมื่อได้รับสภาวะน้ำท่วมเป็นเวลา 18 วัน พบว่า เมื่อถั่วเขียวได้รับสภาพน้ำท่วมจะมีการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของลำต้น คือลำต้นบวมพอง ซึ่งผลที่ได้เกิดจากการชักนำให้รากมีการสังเคราะห์เอทิลีนเพิ่มขึ้น และมีการลำเลียงสู่ลำต้นและใบ ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาต่างๆ รวมไปถึงการบวมพองของโคนต้นด้วย ซึ่งลักษณะลำต้นแตกส่วนใหญ่เกิดบริเวณเหนือน้ำ เนื่องจากเป็นบริเวณที่ได้รับออกซิเจนมากกว่าบริเวณอื่นๆ จึงมีการตั้งสมมติฐานว่าถ้ารากส่วนใหญ่ที่ถูกน้ำท่วมยังคงได้รับออกซิเจนเพียงพอ รอยแตกบริเวณโคนต้นอาจไม่เกิดขึ้น (เอมอร, 2547) สอดคล้องกับ ไพศาล

และคณะ (2545) ที่กล่าวว่า อาการรอยแตกที่เปลือกของลำต้น นั้นจะช่วยในการแลกเปลี่ยนแก๊ส ออกซิเจนได้เมื่อพืชนั้นได้รับสภาพน้ำท่วมขัง ซึ่งในกรณีของสบู่ดำนี้ ไม่ได้มีการศึกษาต่อเกี่ยวกับ ลักษณะการเกิดปุ่มสีขาว และรอยแตกบนลำต้น จึงไม่อาจอธิบายได้ชัดเจนถึงสาเหตุ และประโยชน์ ของการเกิดลักษณะดังกล่าวขึ้นในงานวิจัยนี้

ในส่วนของการ พบว่า ลักษณะการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเป็นไปในแนวทางเดียวกับในใบ และลำต้น คือ ในช่วงแรกของการได้รับสภาพเครียด จะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน แต่เมื่อ ได้รับสภาพเครียดยาวนานขึ้น ในกรณีของรากสบู่ดำ คือตั้งแต่ 10 วันขึ้นไป สังเกตเห็นความเสียหายของระบบรากเกิดขึ้น คือรากขาด และเริ่มเน่า มีกลิ่นเหม็น ในวันที่ 15 พบว่ารากเน่า ตาย และเปลี่ยนเป็นสีคล้ำขึ้นอย่างชัดเจน สอดคล้องกับงานวิจัยของ สุทธิพันธ์ (2548) ที่ให้สภาพน้ำท่วมขังต้นส้ม โขกุน พบว่า รากของต้นส้มในสภาพขังน้ำมีสีดำ และพบการตายของรากบางส่วน โดยมีจำนวนรากที่ตายเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ได้รับการขังน้ำ และ Malik *et al.* (2001) ศึกษาผลกระทบทางด้านสัณฐานของรากในข้าวสาลีที่ได้รับสภาพน้ำท่วม รายงานว่า เมื่อข้าวสาลีได้รับ สภาพน้ำท่วมเป็นระยะเวลา 14 วัน พบการตายของราก และความยาวของรากลดลงเมื่อได้รับสภาพ น้ำท่วมยาวนานขึ้น ซึ่งให้เห็นว่าสภาพน้ำท่วมนั้นส่งผลกระทบต่อระบบรากทำให้ระบบรากพืชนั้นเสียหาย เช่นเดียวกับ Vodnik *et al.* (2009) ศึกษาผลกระทบของสภาวะออกซิเจนต่ำในรากข้าวโพด ที่ระยะเวลา 7 วัน พบว่า สภาวะออกซิเจนต่ำไม่ทำให้ลักษณะของรากและน้ำหนักแห้งแตกต่างจาก ต้นปกติอย่างมีนัยสำคัญ แต่พบการสร้างรากพิเศษขึ้นเมื่อข้าวโพดได้รับสภาวะออกซิเจนต่ำเป็น เวลานานขึ้น เนื่องจาก การตอบสนองต่อสภาวะขาดออกซิเจนของรากส่งผลให้พืชนั้นสร้างราก พิเศษบริเวณฐานของลำต้น เพื่อให้พืชสามารถนำออกซิเจนไปใช้ในกระบวนการหายใจของพืชได้



ภาพที่ 2 ลักษณะสัณฐานที่เปลี่ยนแปลงไปของต้นสบู่ดำที่ได้รับสภาวะน้ำท่วมในช่วงระยะเวลา 5 10 และ 15 วัน เมื่อเทียบกับต้นปกติ

## การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา

### ประสิทธิภาพการใช้แสงสูงสุด

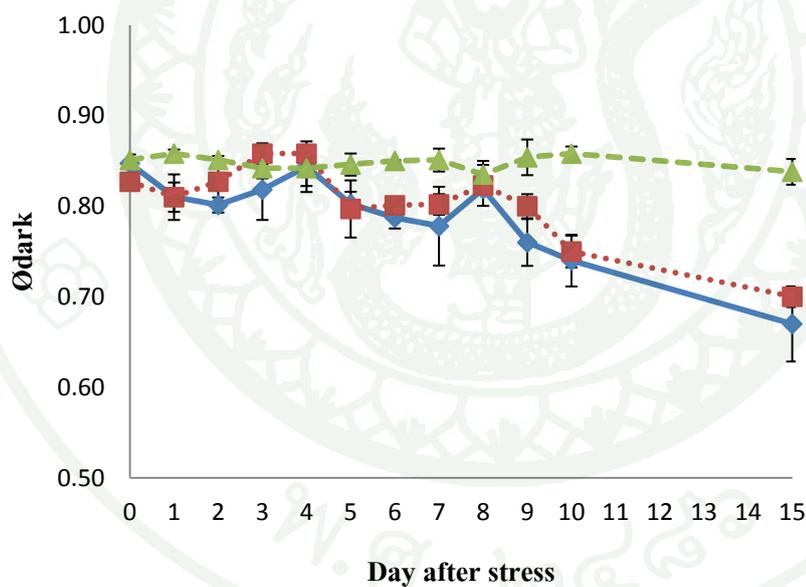
ประสิทธิภาพการใช้แสงสูงสุด (maximum quantum yield,  $\Phi_{dark}$ ) เป็นค่าที่แสดงสัดส่วนของพลังงานแสงที่ใบพืชดูดกลืน (absorption) ทั้งหมดที่ถูกนำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง จึงเป็นค่าที่นิยมใช้ในการตรวจสอบความสมบูรณ์ของระบบรับแสง (PSII) ของพืชเมื่อถูกกระทบด้วยสภาพเครียด โดยพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของใบสนุ่ค่าใบเดิมตลอดเวลาที่ได้รับสภาพน้ำท่วม คือ ใบตาม ควบคู่กับค่าที่วัดได้จากใบตัด คือ ใบที่ถูกตัดจากต้นหลังจากวัดค่า  $\Phi_{dark}$  และนำไปใช้วัดค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบต่อไป เพื่อยืนยันการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในใบตัดว่าเป็นไปในแนวทางเดียวกับใบตาม

ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า ค่า  $\Phi_{dark}$  ของต้นสนุ่ค่าลดลงตามจำนวนวันที่สนุ่ค่าได้รับความเครียดเพิ่มขึ้น สอดคล้องกันในค่าที่วัดได้จากทั้งใบตามและใบตัด โดยในสภาพควบคุมมีค่าเฉลี่ยตลอดการทดลองอยู่ในช่วง 0.81 - 0.84 สอดคล้องกับรายงานของ Gimeno และคณะ ในปี 2012 แต่เมื่อต้นสนุ่ค่าเผชิญกับสภาพเครียดจากน้ำท่วม  $\Phi_{dark}$  ที่วัดได้มีค่าลดลง โดยในช่วง 5 วันแรก ที่สนุ่ค่าได้รับสภาพน้ำท่วม ค่า  $\Phi_{dark}$  เหลือยังมีค่าอยู่ในช่วงเดียวกันกับค่าที่วัดได้จากต้นควบคุม แต่หลังจากได้รับสภาพน้ำท่วมในวันที่ 7 เป็นต้นไป ค่า  $\Phi_{dark}$  เริ่มปรับลดลง โดยค่าจากใบตามวัดได้เฉลี่ยที่ 0.80 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การลดลงเมื่อเทียบกับต้นควบคุม 3.02 เปอร์เซ็นต์ และค่าจากใบตัดวัดได้เฉลี่ยที่ 0.778 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การลดลง 8.15 เปอร์เซ็นต์ ค่า  $\Phi_{dark}$  มีการปรับลดลงมากขึ้นเมื่ออยู่ภายใต้สภาพน้ำท่วมยาวนานขึ้น โดยค่าที่วัดได้ในวันที่ 15 ค่า  $\Phi_{dark}$  จากใบตามวัดได้เฉลี่ยที่ 0.70 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การลดลง 15.36 เปอร์เซ็นต์ และค่าจากใบตัดวัดได้เฉลี่ยที่ 0.67 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การลดลง 20.90 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 3 และตารางที่ 4)

ผลการวัดค่า  $\Phi_{dark}$  ของสนุ่ค่าภายใต้สภาพน้ำท่วมนี้ สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Gimeno *et al.* (2012) ที่รายงานว่าสนุ่ค่าเมื่อได้รับสภาพน้ำท่วมร่วมกับการเติม NaCl ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0 150 และ 300 mM พบว่า ค่า  $\Phi_{dark}$  จะลดลงจากค่าปกติที่วัดได้จากต้นในสภาพควบคุมที่อยู่ในช่วง 0.81 - 0.85 เป็น 0.78 - 0.84 เมื่อสนุ่ค่าได้รับสภาพเครียดเพิ่มขึ้น ค่า  $\Phi_{dark}$

ที่ลดลงนี้แสดงถึงความเสียหายที่เกิดขึ้นกับศูนย์กลางปฏิกิริยาของ PSII (P680) อาจเนื่องจากการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ภายในช่องว่างระหว่างเซลล์ที่บริเวณปากใบ หรืออาจเกิดเนื่องจากการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระ เช่น superoxide anion และ hydrogen peroxide ซึ่งจะก่อให้เกิดความเสียหายกับโครงสร้างคลอโรพลาสต์ (Yordanova and Popova, 2007) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Verma *et al.* (2014) ศึกษาประสิทธิภาพการใช้แสงสูงสุดของสนูปดำภายใต้สภาพน้ำท่วมโดยใช้กิ่งพันธุ์ของสนูปดำที่มีอายุ 40 วัน ให้ระดับน้ำท่วมสูงจากพื้นดิน 5 เซนติเมตร โดยจำลองสภาพน้ำท่วมเป็นระยะเวลา 0 ถึง 4 สัปดาห์ และศึกษาการฟื้นตัวของสนูปดำหลังจาก 4 สัปดาห์ ถึง 8 สัปดาห์ พบว่าเมื่อสนูปดำได้รับสภาพน้ำท่วมสนูปดำมีค่า  $\Delta dark$  ลดลงประมาณ 17 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับต้นปกติ และหลังจากสนูปดำฟื้นตัวกลับมาคงเดิม พบว่า ค่า  $\Delta dark$  เพิ่มขึ้นประมาณ 14 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับต้นสนูปดำที่ได้รับสภาพน้ำท่วม การลดลงของค่า  $\Delta dark$  แสดงให้เห็นว่าเกิดการเสียหายของประสิทธิภาพและกลไกของระบบรับแสง (Tan *et al.*, 2008) นอกจากนี้ งานวิจัยของ Christiance and Shabala (2003) ที่ศึกษาประสิทธิภาพการใช้แสงสูงสุดของพืชตระกูลถั่วเมื่อรับสภาพน้ำท่วมที่ระยะเวลา 1 2 4 และ 8 วัน พบว่า ค่า  $\Delta dark$  ของถั่วที่ได้รับสภาพน้ำท่วม มีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด เมื่อเปรียบเทียบกับต้นปกติ โดยพบว่า หลังจากต้นถั่วได้รับสภาพน้ำท่วมเป็นเวลา 7 วัน ค่า  $\Delta dark$  มีค่าลดลงถึง 0.756 เมื่อเทียบกับต้นปกติที่มีค่า 0.83 และมีค่าลดต่ำสุดเป็น 0.57 ในวันที่ 8 และยังเปรียบเทียบกับค่า  $\Delta dark$  เมื่อระดับน้ำลดลง พบว่า เมื่อต้นถั่วฟื้นจากสภาพน้ำท่วมเพียง 1 วัน ค่า  $\Delta dark$  นั้นมีการปรับเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และมีค่าสูงสุดในวันที่ 8 โดยมีค่าเป็น 0.80 แสดงให้เห็นว่าต้นถั่วอยู่ในสภาวะปกติ เช่นเดียวกันกับการศึกษาถึงประสิทธิภาพการใช้แสงสูงสุดของข้าวสาลีที่ได้รับสภาพน้ำท่วม โดย Zheng *et al.* (2009) ศึกษาผลกระทบของภาวะน้ำท่วมต่อข้าวสาลี 2 สายพันธุ์คือ สายพันธุ์ Huaimai 17 และ สายพันธุ์ Yang mai 12 โดยให้สภาพน้ำท่วมเป็นระยะเวลาที่แตกต่างกันคือ ที่ 10 วัน และ 18 วัน ที่ระดับความลึก 1-2 เซนติเมตร วัดจากระดับผิวดิน พบว่า 10 วัน หลังจากข้าวสาลีได้รับสภาพน้ำท่วม ไม่พบความแตกต่างระหว่างค่า  $\Delta dark$  เมื่อเทียบกับต้นปกติของทั้ง 2 สายพันธุ์ แต่เมื่อข้าวสาลีได้รับสภาพน้ำท่วมหลังจาก 18 วัน ค่า  $\Delta dark$  ลดต่ำลง เป็น 0.74 เมื่อเทียบกับต้นปกติซึ่งมีค่าอยู่ที่ 0.83 ในสายพันธุ์ Huaimai 17 และจากค่า 0.80 ที่วัดได้จากต้นควบคุม เป็น 0.78 ในสายพันธุ์ Yang mai 12 จึงแสดงให้เห็นว่าข้าวสาลีสายพันธุ์ Huaimai 17 มีความอ่อนแอต่อสภาพน้ำท่วมมากกว่าสายพันธุ์ Yang mai 12 และในปี 2008 Naumann และคณะ ศึกษาการตอบสนองทางด้านสรีรวิทยาของพืช *Myrica cerifera* ที่ได้รับ

สภาพน้ำท่วมปกติร่วมกับการให้สภาพน้ำท่วมที่เป็นน้ำเค็ม ที่มีความเข้มข้นของเกลือ NaCl ที่ระดับ 0 5 10 และ 15 กรัม/ลิตร โดยให้สภาพน้ำท่วมเป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่า ค่า  $\Delta dark$  ของพืชที่ได้รับสภาพน้ำท่วมเค็มที่ความเข้มข้น 10 และ 15 กรัม/ลิตร มีค่า  $\Delta dark$  ลดต่ำลงมากกว่าในพืชที่ได้รับเกลือความเข้มข้นระดับอื่นซึ่งพบได้ในวันที่ 12 คืออยู่ในช่วง 0.62-0.67 เมื่อเทียบกับต้นปกติที่มีค่าอยู่ที่ 0.81 อย่างไรก็ตามเมื่อต้น *Myrica cerifera* ได้รับสภาพน้ำท่วมปกติและได้รับน้ำท่วมเค็มที่ระดับ 5 กรัม/ลิตรไม่พบความแตกต่างของค่า  $\Delta dark$  เมื่อเทียบกับต้นปกติ จะเห็นได้ว่าประสิทธิภาพการใช้แสงสูงสุดนั้นมีความสำคัญในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระบบ PSII ของพืชที่ได้รับสภาวะเครียดเนื่องจากน้ำท่วม และในสภาวะน้ำท่วมเค็มจะส่งผลกระทบต่อการลดลงของค่าประสิทธิภาพการใช้แสงสูงสุดมากกว่าในสภาวะน้ำท่วมปกติ ซึ่งจากงานวิจัยต่าง ๆ จะเห็นว่าค่า  $\Delta dark$  ปรับลดลงเมื่อพืชได้รับความเครียดจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ยืนยันให้เห็นว่า การจำลองสภาพน้ำท่วมที่ให้กับสนุ่นดำนี้ ทำให้สนุ่นดำได้รับสภาพเครียดจริง



ภาพที่ 3 การเปลี่ยนแปลงค่าประสิทธิภาพการใช้แสงสูงสุด (maximum quantum yield,  $\Delta dark$ ) ในใบตัด (—◆—) และใบตาม (···■···) ของสนุ่นดำภายใต้สภาวะน้ำท่วม

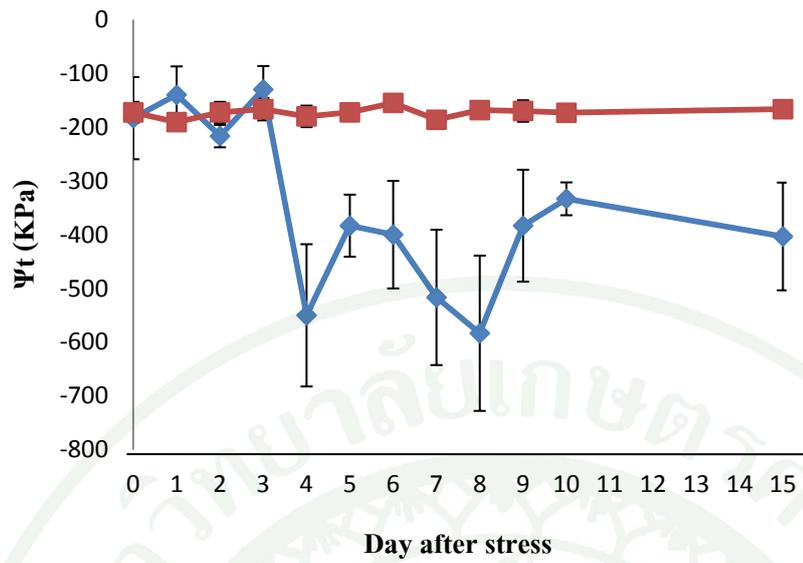
### ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบ ( $\Psi_t$ )

จากการจำลองสภาพน้ำท่วมให้สบูดำ พบว่า ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบสบูดำมีแนวโน้มที่ลดลงเมื่อสบูดำได้รับสภาพน้ำท่วมเป็นเวลานานขึ้น โดยค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบของสบูดำที่วัดได้จากต้นที่ไม่ได้รับสภาพน้ำท่วม มีค่าเฉลี่ย -183.3 กิโลพาสคาล และเมื่อได้รับสภาพน้ำท่วมเป็นระยะเวลา 7 วัน มีค่าเฉลี่ย -516.6 กิโลพาสคาล คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การลดลงของค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบของสบูดำเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับสภาพน้ำท่วม 181.83 เปอร์เซ็นต์ และหลังจากได้รับสภาพน้ำท่วมเป็นระยะเวลา 15 วัน ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ -403 กิโลพาสคาล คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การลดลง 119.86 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4 และตารางที่ 4)

การลดลงของค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบนั้นอาจจะไม่เห็นการลดลงที่ชัดเจน อาจเนื่องจากใช้ส่วนก้านใบในการวัดค่านี้ ซึ่งก้านใบของสบูดำมีลักษณะอวบน้ำ ทำให้เมื่อนำตัวอย่างพืชเข้าเครื่องวัด แม้ยังไม่ได้ให้ความดันแก๊ส แต่กลับพบฟิล์มน้ำบริเวณรอยตัดที่ปลายก้านใบ นอกจากนี้ พืชที่ใช้วัดเป็นพืชที่มีน้ำยาง ซึ่งอาจส่งผลต่อการสังเกตฟิล์มน้ำในการวัดได้ ทำให้ค่าที่อ่านได้อาจเกิดการผิดพลาด แต่อย่างไรก็ตาม แนวโน้มการปรับลดลงของค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบนี้ สะท้อนให้เห็นว่า สภาพน้ำท่วมที่จำลองให้ ส่งผลให้ระบบรากพืชเสียหาย ซึ่งสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงลักษณะของรากสบูดำที่สังเกตพบภายใต้สภาพน้ำท่วม ทำให้ความสามารถในการดูดน้ำ และลำเลียงน้ำลดลง ซึ่งส่งผลให้พืชขาดน้ำ โดยค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบบอกถึงสถานะของน้ำในพืชได้ว่ามีอัตราการสูญเสียน้ำสูงกว่าอัตราการนำน้ำเข้า กล่าวคืออัตราน้ำที่ไหลเข้าสู่ต้นไม่ทันกับที่สูญเสียน้ำออกไป ค่าที่ลดลงสะท้อนให้เห็นว่า พืชมีการขาดน้ำที่รุนแรงขึ้น (Nicolas *et al.*, 2005) ซึ่งผลที่ได้มีแนวโน้มไปในทางเดียวกับรายงานวิจัยของ Bradford and Hsiao (1982) กล่าวว่า เมื่อพืชได้รับสภาพน้ำท่วมส่งผลให้ปากใบปิดทำให้ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบของพืชลดลง ซึ่งมีความสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Gimeno *et al.* (2012) ที่รายงานว่าสบูดำเมื่อได้รับสภาพน้ำท่วมร่วมกับการเติม NaCl ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0 150 และ 300 mM พบว่าค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อสบูดำได้รับสภาพน้ำท่วมเป็นระยะเวลา 1 วัน แต่หลังจาก 4 วันเมื่อสบูดำได้รับสภาพน้ำท่วมพบว่า ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบลดต่ำลงเรื่อยๆ เช่นเดียวกับงานวิจัย

ของ Lewty (1990) ที่ศึกษาพืชตระกูลสน 3 สายพันธุ์เมื่อได้รับสภาพน้ำท่วม พบว่าทั้ง 3 สายพันธุ์มีการตอบสนองต่อค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบไปในแนวทางเดียวกันคือ มีค่าลดลงเมื่อได้รับสภาพน้ำท่วมยาวนานขึ้น ในปี 2007 Striker และคณะ ได้ศึกษาผลกระทบของภาวะน้ำท่วมในต้น Lotus tenuis ให้สภาพน้ำท่วมเป็นระยะเวลา 0 7 14 21 28 35 และ 42 วัน พบว่า ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบนั้นมีค่าลดลงเมื่อ Lotus tenuis ได้รับสภาวะน้ำท่วมเป็นเวลานานขึ้น เมื่อเทียบกับต้นในสภาพปกติ โดยพบว่าการลดลงของค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบนั้นจะลดลงหลังจากการลดลงของค่าการนำไหลของปากใบ และมีการศึกษาเปรียบเทียบค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบพริกที่ได้รับสภาวะน้ำท่วมที่ระยะเวลา 7 วัน โดย Ismail and Davies (1997) เปรียบเทียบกับพริกที่ไม่ได้รับสภาพน้ำท่วม สังเกตเห็นว่าในช่วงแรกที่พริกได้รับสภาพน้ำท่วม ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบรวมไปถึงการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานของใบ แต่หลังจากวันที่ 4 ที่พริกได้รับสภาพน้ำท่วม พบว่าใบพริกมีลักษณะเหี่ยวและค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบเริ่มลดลง และวัดค่าได้ต่ำสุดที่ 6 วันหลังจากได้รับสภาพน้ำท่วม ซึ่งมีค่าประมาณ  $-1.2 \text{ MPa}$

สุทธิพันธ์ (2548) กล่าวว่า อิทธิพลของสภาพน้ำท่วมมีผลให้ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบส้มโขนลดลงตามระยะเวลาที่ได้รับสภาพน้ำท่วมยาวนานขึ้น ทั้ง 2 ช่วงอายุใบ คือวัดค่าที่ช่วงอายุใบ 7 วัน และ 14 วัน โดยที่หลังได้รับสภาพน้ำท่วมในสัปดาห์แรก ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับต้นปกติ โดยต้นอายุใบ 7 วัน มีค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบลดลงมากกว่าต้นปกติ 45.4 เปอร์เซ็นต์ และต้นอายุใบ 14 วัน มีค่าลดลง 72.2 เปอร์เซ็นต์ และหลังได้รับน้ำท่วมเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบลดลงอย่างต่อเนื่องในต้นอายุ 7 วัน มีค่าลดลง 120 เปอร์เซ็นต์ และต้นอายุใบ 14 วันมีค่าลดลง 105 เปอร์เซ็นต์ เมื่อได้รับสภาพน้ำท่วมเป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบมีค่าลดลงมากกว่าต้นปกติ โดยต้นอายุใบ 7 วัน และต้นอายุใบ 14 วัน มีค่าลดลงมากกว่าต้นปกติถึง 131.6 เปอร์เซ็นต์ ทั้ง 2 ช่วงอายุใบ หลังสิ้นสุดการได้รับสภาพน้ำท่วม 4 สัปดาห์ พบว่าสภาพน้ำท่วมส่งผลต่อต้นส้มอย่างรุนแรง โดยต้นอายุใบ 7 วัน มีค่าลดลงถึง 145 เปอร์เซ็นต์ และต้นอายุใบ 14 วัน มีค่าลดลงถึง 166.7 เปอร์เซ็นต์ จึงแสดงให้เห็นว่าต้นส้มมีอาการขาดน้ำ ความสามารถของรากในการดูดน้ำ และลำเลียงน้ำได้รับผลกระทบ ระบบรากขาดออกซิเจน การชดเชยน้ำจากรากไม่เพียงพอกับที่ต้องสูญเสียจากใบ ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบจึงมีค่าลดลงมาก (Taiz and Zeiger, 1991)



ภาพที่ 4 ผลของสภาพน้ำท่วมต่อค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบสับดูดำที่ได้รับสภาพน้ำท่วม เป็นเวลา 15 วัน (—◆—) เมื่อเทียบกับต้นควบคุม (—■—)

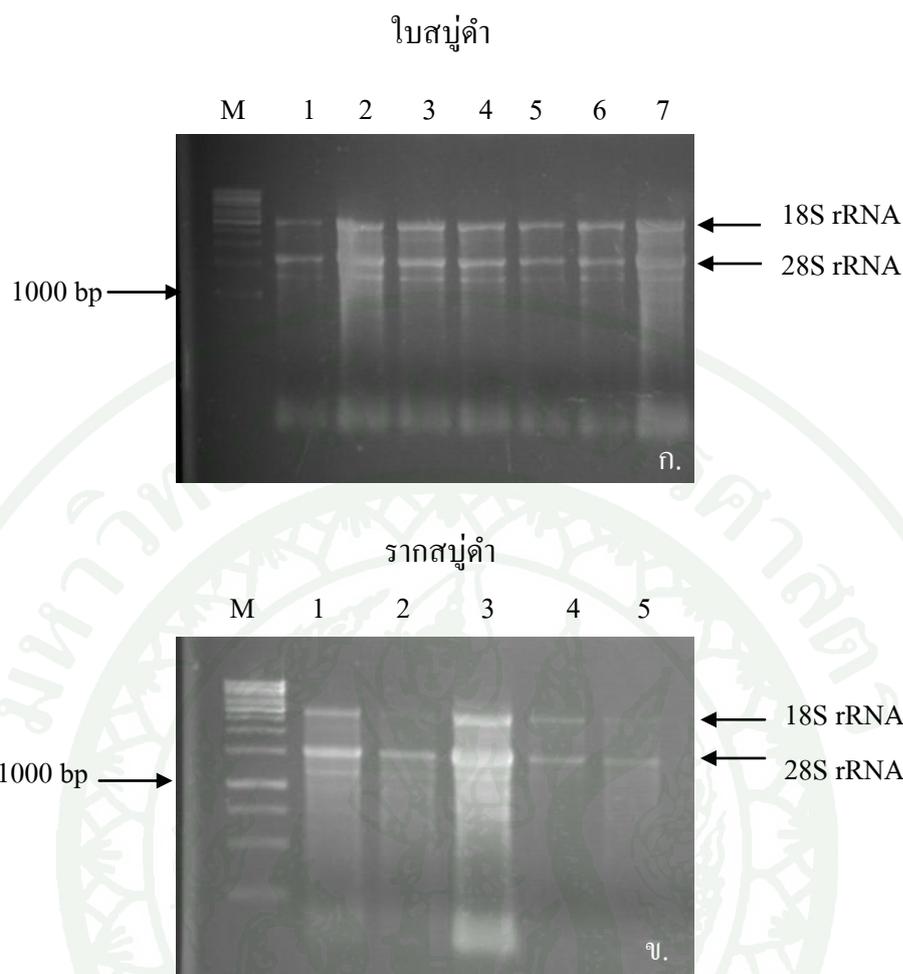
ตารางที่ 4 ผลของสภาพน้ำท่วมต่อการเปลี่ยนแปลงค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบ และประสิทธิภาพการใช้แสงสูงสุดในใบสนุ่นดำที่ได้รับสภาพน้ำท่วมเป็นระยะเวลา 15 วัน

Parameter	Treatment period (days)												% change	%change
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	15	between 0 and 7 Days	between 0 and 15 Days
$\Psi_t$	-183.3	-140	-216.6	-130	-550	-383.3	-400	-516.6	-583.3	-383.3	-333.3	-403	181.83	119.86
$\Delta$ dark														
-cut leave	0.847	0.81	0.801	0.818	0.844	0.802	0.787	0.778	0.819	0.76	0.74	0.67	-8.15	-20.90
-continue leave	0.827	0.81	0.827	0.858	0.858	0.797	0.801	0.802	0.823	0.80	0.75	0.7	-3.02	-15.36

### การสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากใบและรากของสับดูดำ

สกัดอาร์เอ็นเอรวมจากใบของสับดูดำที่ได้รับสภาพน้ำท่วมเป็นระยะเวลา 6 12 24 48 96 และ 192 ชั่วโมง และจากรากของสับดูดำที่ได้รับสภาพน้ำท่วมเป็นระยะเวลา 6 12 24 48 ชั่วโมง เนื่องจากตัวอย่างใบของสับดูดำที่ได้รับสภาพน้ำท่วมยาวนานกว่า 192 ชั่วโมง และรากของสับดูดำที่ได้รับสภาพน้ำท่วมยาวนานกว่า 48 ชั่วโมง เกิดความเสียหาย เมื่อนำตัวอย่างมาสกัดแล้วไม่พบอาร์เอ็นเอ

ตรวจสอบความเข้มข้นและคุณภาพของอาร์เอ็นเอรวม โดยการทำอิลีกโตรโฟรีซิส ด้วย 1% อะกาโรส ใน 1X MOPs ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที (ภาพที่ 5) และการวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยเครื่อง NanoDrop ที่ความยาวคลื่นแสง A260/280 นาโนเมตร มีค่าประมาณ 1.8 ความเข้มข้นประมาณ 1,000-2,000 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร



ภาพที่ 5 แถบอาร์เอ็นเอที่สกัดจากใบ (ก) และราก (ข) ของสนุ่นดำ

Lane M (ก และ ข) 1 kp ladder merker (บริษัท Fermentas)

Lane 1-7 (ก) อาร์เอ็นเอจากใบสนุ่นดำที่ได้รับสภาพน้ำท่วมเป็นระยะเวลา 0 6 12 24 48 96 และ 192 ชั่วโมง

Lane 1-5 (ข) อาร์เอ็นเอจากรากสนุ่นดำที่ได้รับสภาพน้ำท่วมเป็นระยะเวลา 0 6 12 24 48 ชั่วโมง

หลังจากนั้นนำอาร์เอ็นเอรวมที่สกัดได้มาสังเคราะห์ first strand cDNA และนำ first strand cDNA ไปเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอคู่สมของยีน *PDC* และ *ADH* ต่อไป

#### การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะกับยีน *ADH* และ *PDC* ในสับุดำ

จากการใช้ first strand cDNA เป็นแม่แบบ ร่วมกับการใช้ไพรเมอร์และอุณหภูมิ annealing ตามตารางที่ 1 เมื่อใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาสำหรับยีน *PDC* ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300 คู่เบส และเมื่อใช้ไพรเมอร์ของยีน *ADH* ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 250 คู่เบส จากนั้นส่งผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา PCR ที่คาดว่าจะเป็นส่วนหนึ่งของยีน *PDC* และ *ADH* ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า ตัวอย่างดีเอ็นเอคู่สมที่ได้จากการเพิ่มปริมาณกับไพรเมอร์ของยีน *ADH* มีขนาด 286 คู่เบส และ ยีน *PDC* มีขนาด 337 คู่เบส ซึ่งส่วนดีเอ็นเอคู่สมที่เกิดจากไพรเมอร์ *ADH* และ *PDC* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอกลุ่มที่เกิดจากไพรเมอร์ของยีน *ADH* และ *PDC*  
ในสับค้ำ

ชนิดยีน	ลำดับเบส
<i>ADH</i>	GAGTCCGACTCTCTTTAGTGATACACAGTTGTTTCATAGAG GATCTCTTGCAAAGATCAATCCCTTAGCTCCTTTGGATAA AGTCTGCATTCTTAGTTGTGGTATCTCAACAGGACTTGGT GCGACATTGAATGTGGCTAAACCAAAGAAAGGTTTCCTCA GTTGCTGTTTTCGGATTAGGAGCTGTAGGCCTAGCAGCTG CAGAAGGTGCAAGAATTGCTGGAGCATCTAGGATCATTG GGGTGGATTTGAACCCAAAGAGGTTTGAAGAAGCCAAGA AGTTTGGAA
<i>PDC</i>	CACCATGGTGTATCCACCATTGTTGATCAAGAAGATGATA GTCCTCTGTCCACATCGCAGCATTGTTG AAATATCTTGAGCAGTCACCTGAAAGCTACCATCACCAA AGCAATCACACGCTTCTCTGGCGAGCCTGAGCATAACC GAAAAGTGGCACGGACTGGCCACCCGCCTCTGTGTACTG GGTATCGTCCTCTCACCCGCTATGGGTCGATGAGTATCTG GGGTAATATGGACAACCGTATGGGGCGTGGCACATCATC CGCTGTTTGTCTTCTACTATTGTTGATGGGAATAATGT TGATTTTAGTCCTCTAACAAGTGATGATTCTACTG

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้มาตรวจสอบความเหมือนกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PDC* และ *ADH* ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป BLASTN พบว่า

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอกลุ่มที่เกิดจากไพร์เมอร์ของยีน *ADH* ในสนุ่นำมีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ADH* ในพืชหลายชนิด เช่น *Paeonia delavayi* 94 % (Accession no. AEL75248.1), *Pyrus ussuriensis* 92 % (Accession no. AEL75248.1) และ *Gossypium costulatum* 91 % (Accession no. AAC14952.1) และ *Leavenworthia uniflora* 89% (Accession no. AAC79369.1) (ตารางที่ 6) และลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอกลุ่มที่เกิดจากไพร์เมอร์ของยีน *PDC* ในสนุ่นำมีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PDC* ใน *PDC Diospyros kaki* 92 % (Accession no. ACI41985.1), *Cucumis melo* 91%(Accession no. AIC36754.1) *Fragaria vesca* subsp. *vesca* 89 % (Accession no. XP\_004293926.1) และ *Arabidopsis thaliana* 78 % (Accession no. NP\_200307.1) (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 6 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอกลุ่มที่สังเคราะห์ได้จากไพรเมอร์ของยีน *ADH* ในสุนัขดำกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *ADH* ในฐานข้อมูล Genbank

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession number
Alcohol dehydrogenase ( <i>Pyrus ussuriensis</i> )	99.4	99.4	92%	3e-24	92%	AEL75248.1
Alcohol dehydrogenase 1B ( <i>Paeonia delavayi</i> )	100	100	92%	8e-24	94%	AAB70172.1
Alcohol dehydrogenase 2 ( <i>Leavenworthia uniflora</i> )	97.8	97.8	92%	9e-24	89%	AAC79369.1
Alcohol dehydrogenase 1 [ <i>Brassica rapa</i> ]	99.8	99.8	92%	6e-23	90%	AEC13713.1
Alcohol dehydrogenase 2 [ <i>Leavenworthia crassa</i> ] <i>Arabis alpina</i> ]	99.8	99.8	92%	7e-23	90%	AHJ37544.1
Alcohol dehydrogenase [ <i>Gossypium costulatum</i> ]	98.2	98.2	92%	8e-23	91%	AAC14952.1

ตารางที่ 7 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอกลุ่มที่สังเคราะห์ได้จากไพรเมอร์ของยีน *PDC* ในสับรู่ดำกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *PDC* ในฐานข้อมูล Genbank

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession number
putative pyruvate decarboxylase 3 [ <i>Diospyros kaki</i> ]	76.6	76.6	32%	4e-14	92%	ACI41985.1
pyruvate/alpha-keto acid decarboxylase [ <i>Cucumis melo</i> ]	72.8	72.8	92%	2e-12	91%	AIC36754.1
PREDICTED: pyruvate decarboxylase isozyme 1-like [ <i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> ]	73.6	73.6	30%	8e-13	89%	XP_004293926.1
PREDICTED: pyruvate decarboxylase 1 [ <i>Glycine max</i> ]	74.3	74.3	32%	5e-13	86%	XP_003529168.1
pyruvate decarboxylase-2 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	77.0	77.0	32%	6e-14	78%	NP_200307.1

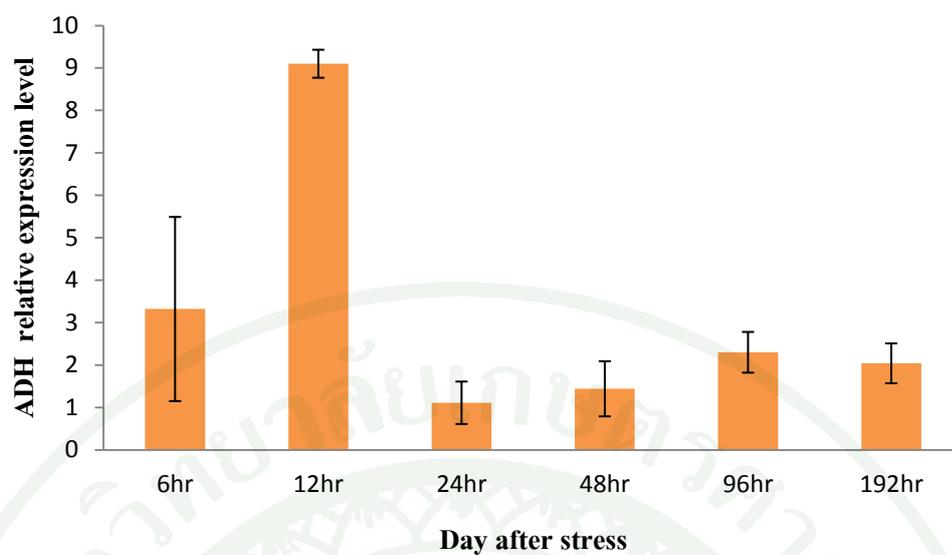
## การศึกษาการแสดงออกของยีน *ADH* และ *PDC* ด้วยเทคนิค real-time PCR

ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *ADH* และ *PDC* สำหรับทำ real-time PCR จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอคู่สมที่เกิดจากไพรเมอร์ของยีน *ADH* และ *PDC* ในสบูดำ โดยใช้โปรแกรม primer3 ตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่นี้ด้วยปฏิกิริยา PCR พบแถบดีเอ็นเอหนึ่งแถบขนาดประมาณ 96 คู่เบส จากตัวอย่างที่สังเคราะห์ดีเอ็นเอคู่สมด้วยไพรเมอร์ของยีน *ADH* และ 186 คู่เบส จากตัวอย่างที่สังเคราะห์ดีเอ็นเอคู่สมด้วยไพรเมอร์ของยีน *PDC* ในสบูดำที่ได้รับสภาพน้ำท่วมทุกเวลาที่ทดลองรวมทั้งจากต้นควบคุม

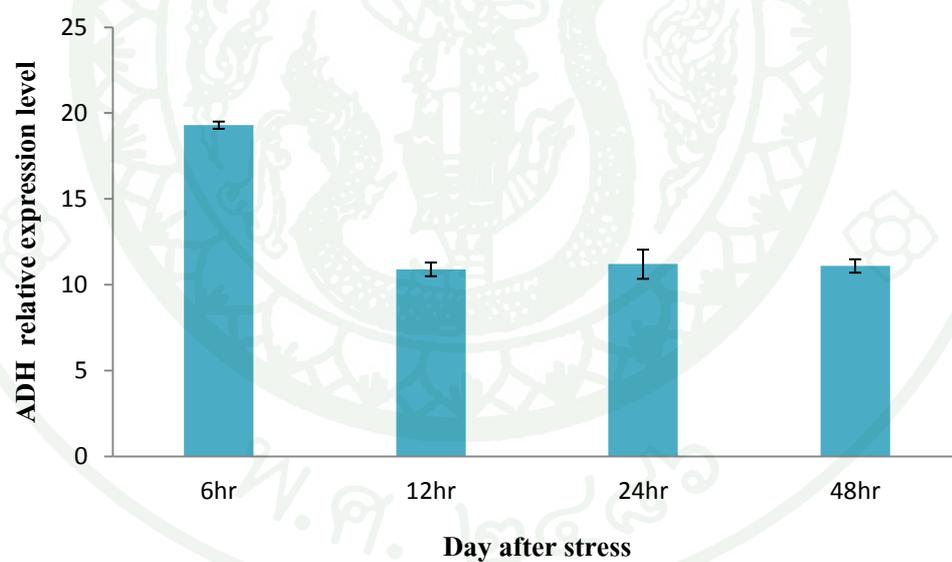
ตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน *ADH* ด้วยวิธี real-time PCR จากใบของสบูดำที่ได้รับสภาพน้ำท่วมเป็นระยะเวลา 6 12 24 48 96 และ 192 ชั่วโมง และจากรากของสบูดำที่ได้รับสภาพน้ำท่วมเป็นระยะเวลา 6 12 24 48 ชั่วโมง สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน *ADH* ในใบสบูดำที่ได้รับสภาพน้ำท่วม ตั้งแต่ที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง และระดับการแสดงออกของยีนเพิ่มมากขึ้นเมื่อสบูดำได้รับสภาพน้ำท่วมยาวนานขึ้น โดยมีการแสดงออกสูงสุดในชั่วโมงที่ 12 หลังได้รับสภาพน้ำท่วม จากนั้นการแสดงออกของยีน *ADH* จึงเริ่มลดลงและคงที่ในชั่วโมงที่ 24 48 96 และ 192 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 6) ในส่วนการแสดงออกของยีน *ADH* ในรากสบูดำนั้น พบว่ามีระดับการแสดงออกสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 6 หลังได้รับสภาพน้ำท่วม และการแสดงออกของยีนเริ่มลดลงและมีระดับการแสดงออกคงที่ในชั่วโมงที่ 12 24 และ 48 หลังจากที่ได้รับสภาพน้ำท่วม (ภาพที่ 7) ความแตกต่างของการแสดงออกของยีน *ADH* ในใบและรากของสบูดำนั้น ขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่รับสภาพน้ำท่วม ซึ่งสอดคล้องกับ Dolferus *et al.* (1999) ที่พบว่า ยีน *ADH* ใน *Arabidopsis* จะแสดงออกภายใต้สภาวะออกซิเจนต่ำ ซึ่งระดับการแสดงออกของยีนนั้นขึ้นอยู่กักระยะเวลาและระดับของการขาดออกซิเจนที่พืชได้รับ Kumutha *et al.* (2008) ได้เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *ADH* ในรากของต้นถั่วที่ได้รับสภาพน้ำท่วมด้วยเทคนิค RT-PCR ของถั่วสายพันธุ์ ICPL 8403 (พันธุ์ทนน้ำท่วม) และสายพันธุ์ ICP7035 (พันธุ์ไม่ทนน้ำท่วม) พบว่าความเข้มของแถบดีเอ็นเอของยีน *ADH* ของต้นถั่วสายพันธุ์ ICPL 8403 สูงสุด เมื่อเทียบกับแถบดีเอ็นเออื่นจากสายพันธุ์ไม่ทนน้ำท่วม กล่าวได้ว่า ความเข้มของแถบดีเอ็นเอแสดงว่ามียีน *ADH* แสดงออกมาก อาจเนื่องจากในสภาวะออกซิเจนต่ำ เมื่อพืชเกิดการหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจน *ADH* เป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในการเปลี่ยน NADH เป็น NAD เพื่อให้ได้พลังงาน จึงการแสดงออกของยีน *ADH* ที่เพิ่มมากขึ้น เช่นเดียวกับ Sairam *et al.* (2009) ที่ศึกษาการแสดงออกของยีน *ADH* ในถั่วเขียว 3 สายพันธุ์ โดยมีพันธุ์ทนน้ำท่วม 2 สายพันธุ์ และพันธุ์ไม่ทนน้ำท่วม 1 สายพันธุ์ ให้สภาพน้ำท่วมเป็น

ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ที่ระดับความลึก 2 เซนติเมตร วัดจากผิวดิน วิเคราะห์ การแสดงออกของยีน *ADH* ด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่า มีการแสดงออกของยีน *ADH* ในทุกสายพันธุ์ ทั้งถั่วเขียวที่ได้รับสภาพน้ำท่วมและไม่ได้รับสภาพน้ำท่วม แต่พันธุ์ทนน้ำท่วม มีการแสดงออกมากที่สุด สังเกตได้จากความเข้มของแถบ DNA ซึ่งให้เห็นว่าเมื่อได้รับสภาพน้ำท่วม พันธุ์ถั่วที่ทนน้ำท่วมมีการชักนำให้ยีน *ADH* แสดงออกมากกว่าพันธุ์ถั่วที่ไม่ทนน้ำท่วม และ Kreuzwieser *et al.* (2009) ศึกษาผลกระทบจากการขาดออกซิเจนที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักในใบและรากของต้น *Gray poplar* โดยให้สภาพออกซิเจนต่ำเป็นระยะเวลาตั้งแต่ 0 ชั่วโมงถึง 160 ชั่วโมง โดยให้สภาพน้ำท่วมที่ระดับวัดจากผิวดิน 1-2 เซนติเมตร พบว่าเมื่อ *Gray poplar* ได้รับสภาพน้ำท่วม กิจกรรมของเอนไซม์ *ADH* ในใบ เพิ่มขึ้นโดย 5 ชั่วโมงหลังได้รับสภาพน้ำท่วม เป็นระยะเวลาที่ตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ *ADH* สูงสุด และหลังจากนั้นการทำงานของเอนไซม์ เริ่มลดลงและคงที่เมื่อได้รับสภาพน้ำท่วมเป็นระยะเวลานานขึ้น ในส่วนของรากนั้น เริ่มตรวจพบการทำงานของเอนไซม์ *ADH* ในชั่วโมงที่ 5 หลังจากได้รับสภาพน้ำท่วม และกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเมื่อได้รับสภาพน้ำท่วมเป็นระยะเวลานานขึ้น ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์ *ADH* ที่เพิ่มขึ้นภายใต้สภาวะน้ำท่วม อาจเกี่ยวข้องกับการสะสมและเคลื่อนย้ายเอทานอลจากใบในรากด้วย (Kreuzwieser *et al.*, 2001) ในปี 1998 Fennoy และคณะ ได้รายงานเกี่ยวกับการแสดงออกของยีนที่เกิดขึ้นภายใต้สภาวะออกซิเจนต่ำในรากข้าวโพด พบว่า เมื่อข้าวโพดได้รับสภาวะออกซิเจนต่ำเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จะมีการชักนำให้ยีน *ADH1* และ ยีน *ADH2* แสดงออก และการแสดงออกเริ่มลดลงที่ 12 ชั่วโมง โดยในสภาวะออกซิเจนต่ำ หรือกระบวนการหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจนนั้น จะมีการแสดงออกของยีนในกลุ่ม ANPS เกิดขึ้น ซึ่งได้แก่ยีน *ADH1* โดยยีน *ADH2* และการแสดงออกของยีน *ADH* นั้นส่วนใหญ่จะพบในรากพืช (Vogel *et al.*, 1989) รายงานวิจัยนี้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Klok *et al.* (2002) ซึ่งศึกษาการแสดงออกของยีนภายใต้สภาวะออกซิเจนต่ำใน *Arabidopsis* โดยให้สภาพออกซิเจนต่ำเป็นเวลา 0 - 20 ชั่วโมง พบว่ามีการแสดงออกของยีน *ADH1* สูงสุดที่ 4 ชั่วโมง และการแสดงออกของยีน *ADH1* เริ่มลดลงเรื่อยๆ เมื่อได้รับสภาวะออกซิเจนต่ำเป็นระยะเวลานานขึ้น Komatsu *et al.* (2011) ศึกษาการแสดงออกของยีน *ADH* ในรากต้นถั่วเหลืองที่ได้รับสภาพน้ำท่วมเป็นระยะเวลาตั้งแต่ 6 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่าเมื่อถั่วเหลืองได้รับสภาพน้ำท่วมมีการแสดงออกของยีน *ADH* ที่เพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาที่ได้รับสภาพน้ำท่วม และมีการแสดงออกของยีน *ADH* สูงสุดที่ 24 ชั่วโมง หลังจากได้รับสภาพน้ำท่วม ซึ่งการเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน *ADH* นั้นชี้ให้เห็นว่า *ADH* นั้นเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญที่เกี่ยวกับกระบวนการหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจน ซึ่งสามารถช่วยทำให้พืชสามารถอยู่รอดได้ในสภาวะออกซิเจนต่ำ (Komatsu *et al.*, 2009)

มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการศึกษาการแสดงออกของยีน *PDC* และ *ADH* ร่วมกันในรากของเบญจมาศภายใต้ภาวะน้ำท่วม โดย Yin *et al.* (2009) ได้ให้สถานะน้ำท่วมกับเบญจมาศเป็นระยะเวลา 0 2 4 6 และ 8 วัน พบว่า มีรูปแบบการแสดงออกของยีน *ADH* และ *PDC* ที่แตกต่างกัน การแสดงออกของยีน *ADH* ในรากมีการแสดงออกสูงสุดในวันที่ 2 หลังจากนั้นการแสดงออกมีแนวโน้มลดลงเมื่อเบญจมาศได้รับสถานะน้ำท่วมเป็นระยะเวลายาวนานขึ้น โดยมีระดับการแสดงออกต่ำสุดในวันที่ 8 ขณะที่การแสดงออกของยีน *PDC* ซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเบญจมาศได้รับสภาพน้ำท่วมยาวนานขึ้นและมีการแสดงออกสูงสุดในวันที่ 4 หลังจากนั้นการแสดงออกจะเริ่มลดลง และมีระดับการแสดงออกต่ำสุดในวันที่ 8 หลังได้รับสภาพน้ำท่วม ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kumutha *et al.* (2008) ที่พบว่า ยีน *ADH* มีการแสดงออกที่รากของถั่วเขียวเมื่อถั่วเขียวได้รับสถานะน้ำท่วมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แต่การแสดงออกจะลดต่ำลงเมื่อถั่วเขียวได้รับสถานะน้ำท่วมยาวนานขึ้น และยังมีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการแสดงออกของยีน *ADH* และ *PDC* ใน *Arabidopsis* ที่ได้รับสภาพออกซิเจน 5 เปอร์เซ็นต์ และไนโตรเจน 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 0 1 3 8 24 และ 72 ชั่วโมง พบว่ามียีน *ADH* และยีน *PDC* แสดงออกในสภาวะดังกล่าว กล่าวคือในส่วนของยอดมีการแสดงออกของยีน *ADH* และยีน *PDC* ที่ระยะเวลา 0 1 และ 3 ชั่วโมง ส่วนระยะเวลา 8 24 และ 72 ชั่วโมงมีการแสดงออกของยีนที่น้อยมากหรือไม่มีเลย ส่วนในรากพบว่ายีน *ADH* และยีน *PDC* แสดงออกในทุกๆ ระยะเวลา มีการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *ADH* และยีน *PDC* พบว่า มีการแสดงออกในรากสูงกว่าในใบ (Hwang *et al.*, 2011)



ภาพที่ 6 ระดับการแสดงออกของยีน *ADH* ในไขของสปลูดำที่ได้รับสภาวะน้ำท่วมเป็นระยะเวลา 6-192 ชั่วโมง

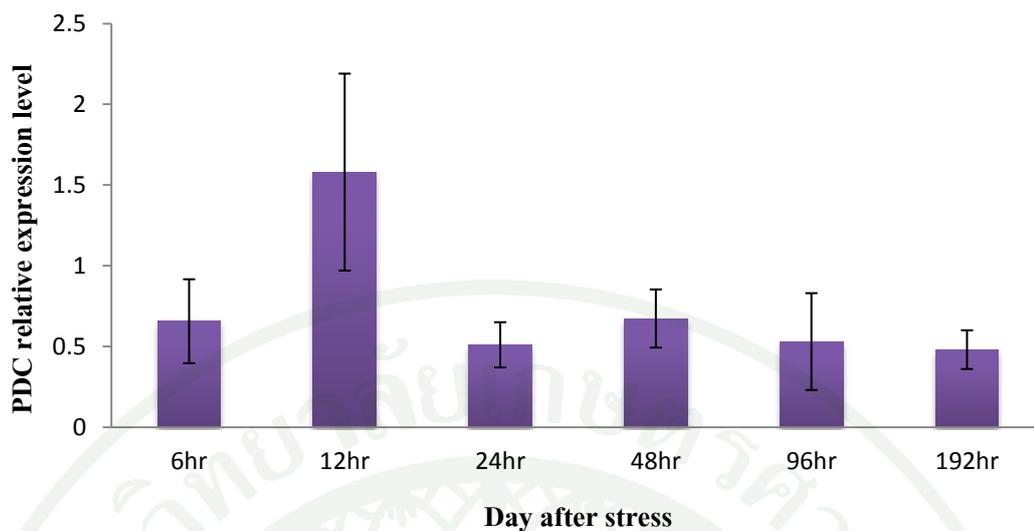


ภาพที่ 7 ระดับการแสดงออกของยีน *ADH* ในรากของสปลูดำที่ได้รับสภาวะน้ำท่วมเป็นระยะเวลา 6-48 ชั่วโมง

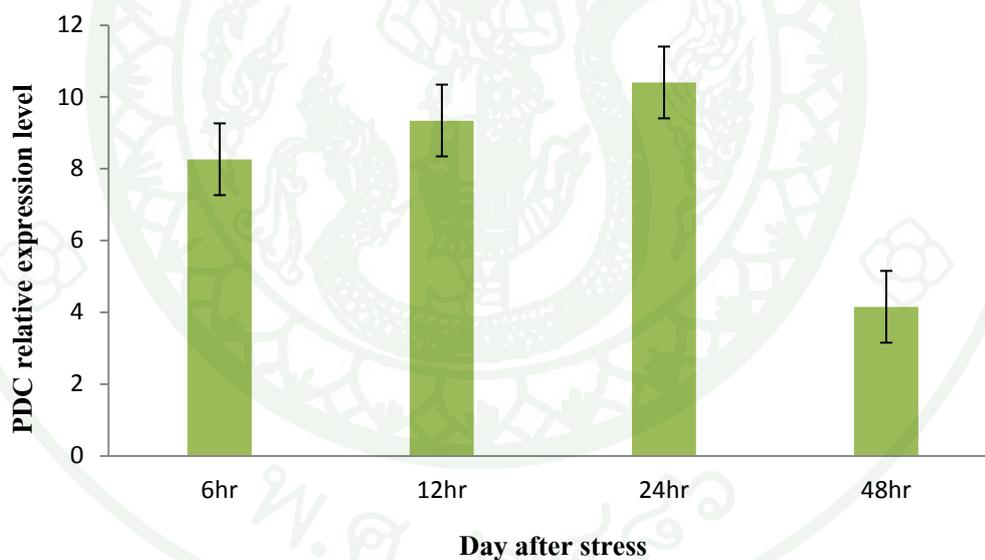
ตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน *PDC* ด้วยวิธี real-time PCR จากใบของสับดูคาที่ ได้รับสภาพน้ำท่วมเป็นระยะเวลา 6 12 24 48 96 และ 192 ชั่วโมง และจากรากของสับดูคาที่ ได้รับสภาพน้ำท่วมเป็นระยะเวลา 6 12 24 48 ชั่วโมง สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน *PDC* ในใบสับดูคาที่ได้รับสภาพน้ำท่วม ตั้งแต่ 6 ชั่วโมงและการแสดงออกของยีนจะเพิ่มมากขึ้น เมื่อสับดูคาได้รับสภาพน้ำท่วมยาวนานขึ้น โดยมีการแสดงออกสูงสุดในชั่วโมงที่ 12 หลังได้รับ สภาพน้ำท่วม จากนั้นการแสดงออกของยีน *PDC* จึงเริ่มลดลงในชั่วโมงที่ 24 และมีการแสดงออก ที่ค่อนข้างจะคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 192 (ภาพที่ 8) สำหรับการแสดงออกของยีน *PDC* ในรากนั้น สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน *PDC* เมื่อสับดูคาได้รับสภาพน้ำท่วมเป็นเวลา 6 ชั่วโมงได้ เช่นเดียวกับในใบ และการแสดงออกของยีนนี้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยมีการแสดงออกสูงสุด เมื่อ สับดูคาได้รับสภาพน้ำท่วมเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นการแสดงออกเริ่มลดลงเมื่อสับดูคา ได้รับสภาพน้ำท่วมเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 9)

ความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีน *PDC* ในใบขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่รับสภาพ น้ำท่วม ซึ่งสอดคล้องกับ Quimino *et al.* (1999) ที่พบว่า ยีน *PDC* ใน ข้าว แสดงออกภายใต้สภาวะ ออกซิเจนต่ำ และเมื่อเพิ่มการแสดงออกของยีน *PDC* ในข้าว ทำให้ข้าวสามารถทนทานต่อสภาวะน้ำท่วม ได้ยาวนานขึ้น และผลการทดลองที่ได้ให้ผลเป็นไปได้ในทิศทางเดียวกันกับงานวิจัยของ Kato-Nouguchi (2002) ซึ่งพบว่า การแสดงออกของยีน *PDC* ในข้าว ไร้อัตที่เพิ่มขึ้นเป็นผลอัน เนื่องมาจากความเครียดจากสภาพที่พืชได้รับออกซิเจนต่ำ เนื่องจากกลไกหนึ่งที่พืชใช้ใน กระบวนการหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจน มีผลทำให้เกิดการสังเคราะห์เอทานอลขึ้น ซึ่งเป็นการ ปรับตัวให้พืชนั้นทนต่อสภาพเครียดดังกล่าว และมีรายงานการพบการแสดงออกของยีน *PDC* ใน รากข้าว โดยพบว่าภาวะออกซิเจนต่ำในข้าวมีผลกระตุ้นการแสดงออกของยีน *PDC* และการสะสม ของเอทานอลในรากข้าว โดยเริ่มเกิดที่ 6 ชั่วโมง หลังจากได้รับภาวะออกซิเจนต่ำ และมีแนวโน้ม การแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับสภาพน้ำท่วมเป็นเวลานานขึ้น (Kato-Nouguchi, 2003) สอดคล้องกับ Menegus *et al.* (1991) ที่รายงานว่าระดับการแสดงออกของ ยีน *PDC* ที่แสดงออกใน รากนั้นเพิ่มขึ้น เมื่อพืชได้รับสภาพน้ำท่วมเป็นระยะเวลานานเนื่องจาก การที่รากพืชเกิดจาก กระบวนการหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจนในกระบวนการไกลโคไลซิส ซึ่งจะเกิดกระบวนการหมัก ethanol และสุดท้ายจะได้เป็น  $\text{NAD}^+$  และ ATP ซึ่งนับเป็นหนึ่งในกระบวนการสร้างพลังงานให้พืช สามารถอยู่รอดได้ในสภาวะน้ำท่วม และ Kursteiner *et al.*, (2003) ศึกษาการแสดงออกของกลุ่มยีน *PDC* ใน *Arabidopsis* ภายใต้สภาวะออกซิเจนต่ำ โดยเปรียบเทียบการแสดงออกระหว่างยีน *PDC1* *PDC2* *PDC3* และ *PDC4* พบว่า มีการแสดงออกของยีน *PDC1* เพิ่มสูงขึ้นเมื่อได้รับสภาวะ

ออกซิเจนต่ำ เมื่อเทียบกับยีน *PDC2* *PDC3* และ *PDC4* ซึ่งไม่พบการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นภายใต้ภาวะออกซิเจนต่ำ แสดงให้เห็นว่า ยีน *PDC1* นั้นเป็นยีนที่ตอบสนองต่อภาวะออกซิเจนต่ำ และสามารถชักนำให้เกิดได้ในภายใต้สภาพดังกล่าว โดยการแสดงออกของยีน *PDC1* นี้ เป็นอิสระจากยีน *PDC* ชนิดอื่น มีการศึกษาถึงการทำงานของเอนไซม์ Pyruvate decarboxylase (PDC) ในข้าวที่ได้รับการสภาวะออกซิเจนต่ำโดยการถ่ายยีน *PDC* จากข้าวโพดเข้าสู่ข้าว พบว่าข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน *PDC* นั้นมีกิจกรรมของเอนไซม์ PDC สูงขึ้น เมื่อเทียบกับข้าวที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (Agarwal *et al.*, 2007) และ Kreuzwieser *et al.* (2009) ศึกษาผลกระทบจากการขาดออกซิเจนที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักในใบและรากของต้น *Gray poplar* โดยให้สภาพออกซิเจนต่ำเป็นระยะเวลาตั้งแต่ 0 ชั่วโมงถึง 160 ชั่วโมง โดยให้ระดับน้ำสูงจากผิววัสดุปลูกในแต่ละกระถาง 1-2 เซนติเมตร พบว่าการชักนำให้เกิดการขาดออกซิเจนในรากนั้นจะส่งผลให้เกิดกระบวนการหมักเอทานอลในรากขึ้น โดยมีการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์ PDC หลังจาก 5 ชั่วโมงของการขาดออกซิเจน และยังพบว่าเมื่อให้สภาพออกซิเจนต่ำเป็นเวลานาน เอนไซม์ PDC มีกิจกรรมเพิ่มขึ้น 3 เท่า เมื่อเทียบกับต้นปกติ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kato-Noguchi and Morokuma (2007) ที่ศึกษาการทำงานของ เอนไซม์ PDC ในใบเลี้ยงของข้าว 4 สายพันธุ์ โดยใช้ข้าวที่มีอายุ 3 วันหลังจากงอก ให้สภาพออกซิเจนต่ำเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า เมื่อได้รับสภาวะออกซิเจนต่ำนั้น ตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ PDC เพิ่มขึ้นในข้าวทั้ง 4 สายพันธุ์ เมื่อเทียบกับต้นปกติที่ไม่ได้รับสภาวะออกซิเจนต่ำ และ ยังมีศึกษาเกี่ยวกับการถ่ายยีน *PDC* ในฝ้ายโดย Dennis *et al.* (2000) ซึ่งใช้ยีน *PDC1* ที่ได้จากข้าว และใช้ 35s เป็น โปรโมเตอร์ หลังจากนั้นนำต้นฝ้ายที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนมาปลูกเปรียบเทียบกับต้นที่ได้รับการถ่ายยีนในสภาพออกซิเจนต่ำ พบว่า ต้นที่ได้รับการถ่ายยีนนั้นมีกิจกรรมของเอนไซม์ PDC สูงกว่า และมีอัตราการสังเคราะห์ ethanol เพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน



ภาพที่ 8 ระดับการแสดงออกของยีน *PDC* ในใบของสุมุดำที่ได้รับสภาวะน้ำท่วมเป็นระยะเวลา 6 - 192 ชั่วโมง



ภาพที่ 9 ระดับการแสดงออกของยีน *PDC* ในรากของสุมุดำที่ได้รับสภาวะน้ำท่วมเป็นระยะเวลา 6-48 ชั่วโมง

## สรุป

1. การจำลองสภาพน้ำท่วมที่ให้กับสบูดำเป็นระยะเวลา 15 วัน ที่ระดับความลึกของน้ำ 30 เซนติเมตร สามารถทำให้สบูดำอยู่ภายใต้สภาวะเครียดได้ โดยค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบ และประสิทธิภาพการใช้น้ำสูงสุดมีค่าลดลงเมื่อเทียบกับต้นในสภาพควบคุม และเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานชัดเจนทั้งในส่วนของใบ ลำต้น และราก

2. การหาบางส่วนของยีน *ADH* และ *PDC* โดยเทคนิค PCR ร่วมกับไพรเมอร์ให้จำเพาะกับ ยีนดังกล่าว พบว่า เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 286 และ 337 คู่เบส และมีความเหมือนกับยีน *ADH* ใน *Paeonia delavayi* (94%) *Pyrus ussuriensis* (92%) และ *Gossypium costulatum* (90%) และ ยีน *PDC* ใน *Diospyros kaki* (92%) และ *Cucumis melo* (91%) ตามลำดับ

3. การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน โดยใช้เทคนิค real-time PCR พบว่า ยีน *ADH* มีการแสดงออกสูงสุดในใบและราก ที่ได้รับสภาพน้ำท่วมเป็นเวลา 12 ชั่วโมง และ 6 ชั่วโมง ขณะที่ ในส่วนของยีน *PDC* พบว่า มีการแสดงออกสูงสุดในใบและที่ ได้รับสภาพน้ำท่วมเป็นเวลา 12 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ

## เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- เกษม พริกคง. 2544. ผลของสภาวะน้ำท่วมขังต่อการเจริญเติบโต พลังงานศักย์ของน้ำไนโบ ปริมาณคลอโรฟิลล์ ลักษณะทางกายวิภาค และสัณฐานวิทยาบางประการของฝรั่งสามพันธุ์, ปัญหาพิเศษปริญญาโท ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ . 26 น.
- กวิศร์ วานิชกุล. 2540. การรวบรวมและใช้ประโยชน์มะม่วงที่อยู่นอกในพื้นที่น้ำท่วม, น. 47-68 ใน อุทกภัยผลกระทบต่อสวนไม้ผลและแนวทางแก้ไข. สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่ง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- จักรี เส้นทอง. 2539. พลวัตผลผลิตพืช. โรงพิมพ์มีงเมือง. เชียงใหม่. 235น.
- ชำนาญ ฉัตรแก้ว. 2549. สบู่ดำพืชพลังงาน. ห้างหุ้นส่วนจำกัดฟีนีล็บลิซซิ่ง, กรุงเทพฯ.
- ณรรฐพล วัลลีย์ลักษณ์. 2541. รายชื่อพืชยาฆ่าแมลงบางชนิดในประเทศไทย, น. 92. ใน การประชุมทศวรรษ "พืชสารฆ่าแมลงในการทำการเกษตร". กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- ณัฐวดี อินทาวรี. 2549. การตอบสนองของพืชตระกูลแตงบางชนิดต่อสภาพน้ำท่วม. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม. 24 น.
- นวรรตน์ อุดมประเสริฐ. 2451. สรีรวิทยาของการผลิตพืช. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.
- นรินทร์ สมบูรณ์สาร. 2526. การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา กายวิภาคและเซลล์วิทยาของพืชไฮโดรคาร์บอนบางชนิด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นิรนาม. ม.ป.ป. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่. แหล่งที่มา:  
[http://www.sc.psu.ac.th/chm/biodiversity/mangrove\\_plant.htm](http://www.sc.psu.ac.th/chm/biodiversity/mangrove_plant.htm), 18 กรกฎาคม 2557.

บุญอุ้ม แคล้วโยธา. 2532. การศึกษาวัสดุขยายพันธุ์ และระยะปลูกที่เหมาะสมของสบู่ดำ  
 วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ไพโรศาล ต้นไชย, ลพ ภวภูตานนท์, กฤษณา กฤษณพุกด์ และคณพล จุฑามณี. 2545. การ  
 เจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของชมพูในสภาพน้ำท่วม. บทคัดย่อ  
 ภาคโปสเตอร์ ใน การประชุมพืชสวนแห่งชาติครั้งที่ 2 วันที่ 28-30 พฤษภาคม 2545, คณะ  
 เกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, ณ  
 โรงแรมเจริญธานี ปรีณเซส ขอนแก่น.

ภาคภูมิ พรประเสริฐ. 2550. สรีรวิทยาของพืช. โอ.เอส. พรินต์ติ้ง เฮาส์, กรุงเทพฯ.

ระพีพันธ์ ภาสบุตร และ สุขสันต์ สิทธิผลไพบุลย์. 2524ก. การใช้น้ำมันสบู่ดำเป็นพลังงาน  
 ทดแทนเครื่องยนต์ดีเซล. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

ระพีพันธ์ ภาสบุตร และ สุขสันต์ สิทธิผลไพบุลย์. 2524ข. ผลการวิจัยค้นคว้าการใช้น้ำมันสบู่ดำ  
 เป็นพลังงานทดแทนในเครื่องยนต์ดีเซล, น.11-14. ใน การใช้น้ำมันสบู่ดำเดินเครื่องยนต์  
 ดีเซล. กรุงเทพมหานคร: กองเกษตรเคมีและกองวิศวกรรม กรมวิชาการเกษตร.

รวี เสธฐักดี. 2540. ต้นไม้ในสภาวะถูกน้ำท่วมขังและแนวทางแก้ไข, น. 9-20 ใน อุทกภัย  
 ผลกระทบต่อสวนผลไม้และแนวแก้ไข. สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่ง  
 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

รวี เสธฐักดี. ม.ป.ป. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. แหล่งที่มา:  
<http://web.ku.ac.th/nk40/ravee.htm>, 6 กรกฎาคม 2557.

มารวย เมฆานวกุล และ ไพศาล เหล่าสุวรรณ. 2539. ผลของระยะเวลาที่น้ำท่วมขังต่อการ  
 เจริญเติบโตและผลผลิตของถั่วเขียว. วารสารเทคโนโลยีสูรนารี 3: 85-94.

ทวีศักดิ์ อุ่ณจิตติกุล. 2548. สบู่ดำพืชพลังงานสารพัดประโยชน์. สำนักพิมพ์ วชิระ, กรุงเทพฯ. 99 น.

เทียมใจ คมกฤต. 2539. กายวิภาคของพุดกษ. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 268 น.

สุภาพรรณ เฟื่องเพชร. 2555. การตอบสนองและแนวทางในการจัดการหญ้าอาหารสัตว์สกุลบราเคียเรีย (*Brachiaria*) ในสภาพน้ำท่วมขังเพื่อการผลิตเมล็ดพันธุ์. ใน *รายวิชาสัมมนา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, อุบลราชธานี.*

สมบัติ ชินะวงศ์. 2548. แปลงปลูกสวนป่าสบู่ดำ. *ว. เกษตรกรรมธรรมชาติ*. 8: 32-35.

สุทธิพันธ์ รัตนสิงห์. 2548. ผลของสภาวะน้ำท่วมขังต่อลักษณะทางสรีรวิทยา และสัณฐานวิทยาของต้นต่อสัมพันธ์ต่างๆ และสัมพันธ์โซ่กินที่ต่อบนต้นต่อ *Toyer Citrange*. *วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.*

สุนทรี ยิ่งชัชวาล จินตนา บางจัน และ ธาดา ชัยสีหา. 2543. พลังงานศักย์ของน้ำในใบมะม่วงภายใต้สภาพน้ำขัง, น. 95-114. ใน *รายงานโครงการวิจัยวิธีการให้อากาศเพื่อผู้ชีวิตต้นมะม่วงที่ประสบอุทกภัย. สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.*

เอมอร เลิศสำราญ. 2547. ผลของระดับน้ำที่ท่วมขังต่อการเจริญเติบโตและการเกิดรากบริเวณโคนต้นของชมพูพันธุ์ทับทิมจันทร์. *ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.*

Agarwal, S., A. Kapoor, O.S. Lakshmi and A. Grover. 2007. Production and phenotypic analysis of rice transgenics with altered levels of pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase proteins. *Plant Biol*. 45: 637-646.

- Ahmed, S., E. Nawata and T. Sakuratani. 2006. Changes of endogenous ABA and ACC, and their correlations to photosynthesis and water relations in mungbean (*Vigna radiate* (L.) Wilczak cv. KPS1) during waterlogging. **Environ. Exp. Bot.** 57:278-284.
- Ap Rees, T., L.E.T. Jenkin, A.M. Smith and P.M. Wilson. 1987. The metabolism of flood tolerant plants, pp. 227-238. In R.M.M. Crawford, ed. **Plant Life in Aquatic and Amphibious Habitats**. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Armstrong, W. 1968. oxygen diffusion from the roots of woody species. **Physiol. Plant.** 21:539-543.
- \_\_\_\_\_. 2009. Measuring and interpreting critical oxygen pressures in roots. **Ann. Bot.** 103: 281-293.
- Aschi-Smiti, S., W. chaibi, R. Brouquisse, B. Beerenice-Ricard and P. Saglio. 2004. Assessment of enzyme induction and aerenchyma formation as mechanisms for flooding tolerance in *Tr. Folium subterraneum* 'park'. **Ann Bot.** 91: 195-204.
- Bailey-Serres, J. and L.A.C.J Voeselek. 2008. Flooding stress: acclimations and genetic diversity. **Annu. Rev. Plant Biol.** 59:313-339.
- Bradford, K.J. and S.F. Yang. 1981. Physiological responses of plants to waterlogging. **Hort-Science.** 16: 25-30.
- Bradford, K.J. and T.C. Hsiao. 1982. Stomatal behavior and water relations of waterlogged tomato plants. **Plant Physiol.** 70:1508-1513.
- Boyer, J.S. 1995. **Measuring the Water Status of Plants and Soils**. Academic Press, Inc., California, U.S.A.

- Cesar, S.A. and S. Lgnacimuthu. 2011. Applications of biotechnologu and biochemical engineering for the improvement of jatropa and biodiesel: A review. **Renewable Sustain. Energy Rev.** 15: 5176-5185.
- Christiance, F. and S. Shabala. 2003. Screening methods for waterlogging tolerance in Lucerne comparative analysis of waterlogging effects on chlorophyll fluorescence, photosynthesis, biomass and chlorophyll content. **Func. Plant Biol.** 30: 335-343.
- Costa, M.N.X. da. 2004. Desempenho de duas gramíneas forrageiras tropicais tolerantes ao estresse hídrico poralagamentoem doissolos gleihumicos. Piracicaba: ESALQ/USP. 89 p. Tese, Doutorado *cited* Dias-filho, M.B. Lopes, M.J.S. 2011.
- Davies, F.S. and J.A. Flore. 1986a. Short-term flooding effects on gas exchange and quantum yield of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei* Reade). **Plant Physiol.** 81: 289-292.
- Dennis, E.S., R. Dolferus, M. Ellis, M. Rahman, Y. Wu, F.K. Hoeren, A. Grover, K.P. Ismond, A.G. Good and W.J. Peacock. 2000. Molecular strategies for improving waterlogging tolerance in plant. **J. Exp. Bot.** 342: 89-97.
- Dolferus, R., M. Jacobs, W.J. Peacock and E.S. Dennis. 1999. Differential interactions of promoter elements in stress responses of the *Arabidopsis Adh* gene. **Plant Physiol.** 105: 1075-1087.
- Evan, D.E. 2003. Aerenchyma formation. **New Phytologist.** 161: 35-49.
- Fennoy, S.L., T. Nong and J. Bailey-Serres. 1998. Transcriptional and post-transcriptional processes regulate gene expression in oxygen-deprived roots of maize. **Plant J.** 15: 727-735.

- Francis, C.M., A.C. Devitt. and P. Steele. 1974. Influence of flooding on the alcohol dehydrogenase activity of roots *Trifolium subterraneum* L. Aust. **J. Plant Physiol.** 1: 9-13.
- Gemino, V., J.P. Syvertsen, I. Simon, M. Nieves, L. Diaz-Lopez, V. Martinez, F. Garcia-Sanchez. 2012. Physiological and morphological responses to flooding with fresh or saline water in *Jatropha curcas*. **Environ and Exp Bot.** 78: 47-55.
- Hasnian, S. and K.H. Sheikh. 1976. Effects of flooding and drainage on the growth of *Capsicum annuum* L. **Biologia.** 22: 89-106.
- Hattori, Y., K. Nagai and M. Ashikari. 2011. Rice growth adapting to deepwater. **J. Plant Physiol.** 14: 100-105.
- He, C.J., M.C. Drew and P.W. Morgan. 1994. Induction of enzymes associated with lysigenous aerenchyma formation in roots of *Zea mays* during hypoxia or nitrogen starvation. **J. Plant Physiol.** 105: 861-865.
- Heller, J. 1996. Physic nut. *Jatropha curcas* L. Promoting the Conservation and Use of Underutilized and Neglected Crops. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben (IPGRI). 66 p.
- Hofman-Benning, S. and H. Kende. 1992. On the role of abscisic acid and gibberellin in the regulation of growth in rice. **Plant Physiol.** 99: 1156-1161.
- Hook, D.D., C.L. Brown and P.P. Kormanik. 1970. Lenticel and water root development of swamp tupelo under various flooding condition. **Bot. Gaz.** 131: 217-224.
- Hsu, Y.M., M.J. Tseng and C.H. Lin. 1999. The fluctuation of carbohydrates and nitrogen compounds in flooded wax-apple trees. **Bot Bull Acad Ssin.** 40: 193-198.

- Hwang, J.H., M.O. Lee, Y.H. Choy, Y.M. Ha-Lee, C.B. Hong and D.H. Lee. 2011. Expression profile analysis of hypoxia responses in *Arabidopsis* roots and shoots. **J. Plant Biol.** 54: 373-383.
- Ishak bin, P. 1992. **Physiological and morphological change of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus Lamk.*) and Champedak (*A. integer Merr.*) seedlings under flooding condition.** M.S. Thesis, Kasetsart Univ., Bangkok.
- Ismail, M.R. and W.J. Davies. 1997. Reduction in leaf growth and stomatal conductance of *Capsicum* (*Capsicum annum*) growth in flooded soil and its relation to Abscisic acid. **J. Trop. Agric. Sci.** 20: 101-106.
- Jackson, M.B. 1982. Ethylene as a growth promoting hormone under flooded conditions, pp. 291-301. In P.F. Wareing, ed. **Plant Growth Substance**. Academic Press, London.
- Jackson, M.B. and M. Drew. 1984. Effects of flooding on growth and metabolism of herbaceous plants. pp.47-128. In **Flooding and Plant Growth**. T.T. Kozlowski (ed). Academic Press, Orlando, Florida.
- Jackson, M.B. and T.D. Colmer. 2005. Response and adaptation by plants to flooding stress. **Ann. Bot.** 96: 501-505.
- Jones, N. and J.H. Miller. 1991. *Jatropha curcas*: A multipurpose species for probiomatic sites, **Land Resour.Ser.** 1: 1-1s2.
- Kato-Nouguchi, H. 2002. Hypoxic induction of anoxia tolerance in *Avena* coleoptiles. **J. Plant Physiol.** 159: 751-755.
- \_\_\_\_\_. 2003. Anoxia tolerance in rice roots acclimated by several different periods of hypoxia. **J. Plant Physiol.** 160: 565-568.

- Kato-Noguchi, H. and M. Morokuma. 2007. Ethanolic fermentation and anoxia tolerance in four rice cultivars. **J. Plant Physiol.** 164: 168-173.
- Kawase, M. 1974. Role of ethylene in induction of flooding damage in sunflower. **Physiol. Plant.** 31: 29-38.
- \_\_\_\_\_. 1976. Ethylene accumulation in flooded plants. **Physio Plant.** 36: 236-241.
- \_\_\_\_\_. 1981. Anatomical and morphological adaptation of plants to waterlogging. **Hort-Science.** 16: 30-34.
- Kennedy, R.A., M.E. Rumpho and T.C. Fox. 1992. Anaerobic metabolism in plant. **Plant Physiol.** 100: 1-6.
- Kepka, M. and J.R. Morris. 1967. The effect of nitrogen and aeration on nutrient uptake and growth of peach seedlings in solution culture. **Roczn. Nank. Roln. Ser. A.** 92: 653-664.
- Klok, E.J., L.W. Wilson, D. Wilson, S.C. Chapman, R.M. Ewing, S.C. Somerville, W.J. Peacock, R. Dolferus and E.S. Dennis. 2002. Expression profile analysis of the lox-oxygen response in *Arabidopsis* root cultures. **Plant Biologist.** 14: 2481-2494.
- Komatsu, S., R. Yamamoto, Y. Nanjo, Y. Mikami, H. Yunokawa and K. Sakata. 2009. A comprehensive analysis of the soybean genes and proteins expressed under flooding stress using transcriptome and proteome techniques. **J Proteome Res** 8: 4766-4778.
- Komatsu, S., D. Thibaut, S. Hiraga, M. Kato, M. Chiba, A. Hashiguchi, M. Tougou, S. Shimamura and H. Yasue. 2011. Characterization of a novel flooding stress-responsive alcohol dehydrogenase expressed in soybean roots. **Plant Mol Biol.** 77: 309-322.

- Kozlowski, T.T. and S.G. Pallardy. 1982. Water supply and tree growth part II. Flooding. **For. Abstr.** 43: 145-161.
- Kozlowski, T.T. 1984. Responses of woody plants to flooding, pp. 129-163. *In* T.T. Kozlowski (ed.). **Flooding and Plant Growth**. Academic Press, New York.
- Kreuzwieser, J., F.J.M. Harren, L.J. Laarhoven, I. Boamfa, S. Lintel-Hekkert, U. Scheerer, C. Huglin and H. Rennenberg. 2001. Acetaldehyde emission by the leaves of trees: correlation with physiological and environmental parameters. **Plant Physiol.** 113: 41-49
- Kreuzwieser, J., J. Hauberg, K.A. Howell, A. Carroll, H. Rennenberg, A.H. Millar and J. Whelan. 2009. Differential response of Gray Poplar leaves and roots underpins stress adaptation during hypoxia. **Plant Physiol.** 149: 461-473.
- Krizek, D.T. 1982. Plant responses to atmospheric stress caused by waterlogging. *In* M.N. Christiansen and C.F. Lewis (eds). **Breeding Plant for Less Favorable Environment**. John Wiley and Sons. 439 p.
- Kumutha, D., R.K. Sairam, K. Ezhilmathi, V. Chinnusamy and R.C. Meena. 2008. Effect of waterlogging on carbohydrate metabolism in pigeon pea (*Cajanus cajan* L.): upregulation of sucrose synthase and alcohol dehydrogenase. **Plant Sci.** 175: 706-716.
- Kürsteiner, O., I. Dupuis and C. Kuhlemeier. 2003. The pyruvate decarboxylase1 gene of *Arabidopsis* is required during anoxia but not other environmental stresses. **Plant Physiol.** 132: 968-978.
- Laksana, C. 2011. **Simple and rapid RNA extraction from young and mature leave of oil palm** (*Elaeis guineensis* Jacq.). Special Problem. Kasetsart university. 27p.

- Lewty, M.J. 1990. Effect of waterlogging on the growth and water relations of three *Pinus* Taxa. **Forest Ecol. Manage.** 30: 189-201.
- Liao, C.T. and C.H. Lin. 1994. Effect of flooding stress on photosynthetic activities of *Momordica charantia*. **Plant Physiol. Biochem.** 32: 1-5.
- \_\_\_\_\_. 1999. Physiological adaptation of crop plants to flooding stress. **Natl. Sci.** 25: 148-157
- Licausi, F., J.T. Van Dongen, B. Giuntoli, G. Novi, A. Santaniello, P. Geigenberger and P. Perata. 2010. HRE1 and HRE2, two hypoxia-inducible ethylene response factor, affect anaerobic responses in *Arabidopsis thaliana*. **Plant J.** 62: 302-315
- Malik, A.I., T.D. Colmer, H. Lambers and M. Schortemeyer. 2001. Changes in physiological and morphological traits of roots and shoots of wheat in response to different depths of waterlogging. **Plant Physiol.** 28: 1121–1131.
- Maryam, A. and S. Nasreen. 2012. A Review: water logging effects on morphological, anatomical, physiological and biochemical attributes of food and cash crops. **Int. J. Water Resource Environ. Sci.** 4: 113-120.
- Maxwell, K. and G.N. Johnson. 2000. Chlorophyll fluorescence a practical guide. **J. Exp. Bot.** 51: 659-668.
- McPherson, D.C. 1939. Cortical air spaces in the roots of *Zea mays* L. **New Phytol.** 35: 64-73.
- McNamara, S.T. and C.A. Mitchell. 1991. Role of auxin and ethylene in adventitious root formation by a flood-resistant tomato genotype. **HortScience.** 26: 57-58.
- Menegus, F., L. Cattaruzza, M. Mattana, N. Beffagna, E. Ragg. 1991. Response to anoxia in rice and wheat seedlings: changes in the pH of intracellular compartments, glucose-6-phosphate level and metabolic rate. **Plant Physiol.** 95: 760-767.

- Naumann, J.C., D.R. Young and J.E. Anderson. 2008. Leaf chlorophyll fluorescence, reflectance, and physiological response to freshwater and saltwater flooding in the evergreen shrub, *Myrica cerifera*. **Environ and Exp Bot.** 63: 402-409.
- Nicolas, E., A. Torrecillas, J. Dell Amico, J.J. Alarcon. 2005. The effect of short-term flooding on the sap flow, gas exchange and hydraulic conductivity of young apricot trees. **Trees** 19:51-57.
- Padua, L.S., N. Bunyaphatsara and M.J. Lemmens. 1999. Medicinal and poisonous plants 1. **Prosea.** 12: 320-325.
- Perata, P., J. Pozueta-romero, T. Akazawa and J. Yanaguchi. 1992. Effect of anoxia on starch breakdown in rice and wheat seeds. **Planta.** 188: 611-618
- Pereira, J.S. and T.T. Kozlowski. 1977. Variations among woody angiosperms in relation to flooding. **Physiol. Plant.** 41:184-192.
- Peter. C. V. W. and K. Chayamarit. 2007. Euphorbiaceae. **Flora of Thailand Volume Eight Part Two.** 2: 339-348.
- Phung, H.T., and E.B. Knipling. 1976. Photosynthesis and transpiration of citrus seedling under flooded conditions. **Hort Science.** 11: 131-133.
- Ram, P.C., B.B. Singh, A.K. Singh, P. Ram, P.N. Singh, H.P. Singh, I. Boamfa, F. Harren, E. Santosa, M.B. Jackson, T.L. Setter, J. Reuss, L.J. Wade, V. Pal Singh and R.K. Singh. 2002. Submergence tolerance in rainfed lowland rice: physiological basis and prospects for cultivar improvement through marker-aided breeding. **Field Crops Res.** 76: 131-152.

Reinhard, K.H. 2005. Fighting desertification by integrated utilisation of the *Jatropha* plant an integrated approach to supply energy and create income for rural development.

**Unpublished project report.** Project *Jatropha*, Germany.

Rodrigues, R.C., J.E.D. Fox, and A. Schatral. 2010. Research note: Responses of the perennial Australian native grass *Eriachne benthamii* to flooding. **Tropical Grasslands**. 44: 295–300.

Quimino, C.A., B.L. Torrizo, L.S. Timothy, E. Marc, A. Grover, M. Editha, P. Norman, S. Evangelina, L.C. Azucena, I. Osamu, W.J. Peacock, E. Dennis and K.D. Swapan. 1999. Enhancement of submergence tolerance in transgenic rice overproducing Pyruvate decarboxylase. **Plant Physiol**. 156: 516-521.

Sachs, M.M., C.C. Subbaiah and I.N. Saab. 1995. Anaerobic gene expression and flooding tolerance in maize. **J. Exp. Bot**. 294: 1-15.

Sairam, R.K., K. Dharmara, V. Chinnusamy and R.C. Meena. 2009. Waterlogging induced increase in sugar mobilization, fermentation and related gene expression in the roots of mungbean (*Vigna radiata*). **J. Plant. Physiol**. 166: 602-616.

Scholander, P.F., L. Van Dam and S.I. Scholander. 1955. Gas exchange in roots of mangroves. **Am. J. Bot**. 42: 92-98.

Schramm, R.W. and H. Mazurowa. 1975. The influence of soaking injury of seeds on the activity of cytoplasmic NAD<sup>+</sup> dependent dehydrogenases in the cotyledons of *Pisum sativum* L. and *Phaseolus vulgaris* L. **Acta. Soc. Bot. Pol**. 44: 107-114.

Schussler, E.E. and D.J. Longstreth. 2000. Changes in cell structure during the formation of root aerenchyma in *Sagittaria lancifolia* (Alismataceae). **Am. J. Bot**. 87: 12-19.

- Sena Gomes, A.R and T.T. Kozlowski. 1980. Growth responses and adaptation of *Fraxinus pennsylvanica* seedlings to flooding. **Plant Physiol.** 66: 267-271.
- Sipp, S.K. and D.T. Bell. 1974. The response of net photosynthesis to flood conditions in seedlings of *Acer saccharinum* (silver maple). **Univ. III. For. Res. Rep.** 74-9.
- Solomon, A., J. Raju. and V. Ezradanam. 2002. Pollination ecology and fruiting behavior in a monoecious species *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). **Curr. Sci.** 83: 1395-1398.
- Spichiger, R.E., V. Savolainen, M. Figeat and D. Jeanmonod. 2004. **Systematic Botany of Flowering Plants.** Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne.
- Striker, G.G., P. Insausti, A.A. Grimoldi. 2007. Effects of flooding at early summer on plant water relations of *Lotus tenuis*. **Lotus Newsletter.** 37: 1-7.
- Staubmaun, R., L. Ncube, G.M. Gubitz, W. Steiner and J.S. Read. 1999. Esterase and lipase activity in *Jatropha curcas* L. **Biotechnol.** 75: 117-126.
- Su, P.H. and C.H. Lin. 1998. Root sugar level in flooded iuffa and bitter malon is not refential to flooding tolerance. **Bot Bull Acad In.** 39: 175-179
- Szlovak, S. 1975. A Study of flooding effect on maiz transpiration at two nutrient levels. **Acta Bot. Acad. Sci.Hung.** 21: 167-174.
- Tadege, M., I. Dupuis and C. Kuhlemeier. 1999. Ethanolic fermentation: new function for an old pathway. **Trends in Plant Science.** 4(8): 320-325.
- Taiz, L. and E. Zeiger. 1991. *Plant Physiology.* The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., California.

- Tan, W., J. Liu, T. Dai, Q. Jing, W. Cao and D. Jiang. 2008. Alterations in photosynthesis and antioxidant enzyme activity in winter wheat subjected to post-anthesis waterlogging. **Photosynthetica**. 46: 21-27.
- Thomson, C.J. and H. Greenway. 1991. Metabolic evidence for stellar anoxia in maize roots exposed to low O<sub>2</sub> concentrations. **Plant Physiol**. 96: 1294-1301.
- Topa, M.A. and J.M. Cheeseman. 1992. Effects of root hypoxia and a low P supply on relative growth, carbon dioxide exchange rates and carbon partitioning in *Pinus serotina* seedlings. **Physiol. Plant**. 86: 136-144.
- Van der Straeten, D., P.R. Rodrigues, J. G. ielen and M.M. Van. 1991. Tomato alcohol dehydrogenase expression during fruit ripening and under hypoxic conditions. **Fed. Europ. Biochem. Soc.** 0014579301/s3.50.
- Verma, K.K., M. Singh and R.K. Gupta. 2014. Photosynthetic gas exchange chlorophyll fluorescence ,antioxidant enzymes, and growth responses of *Jatropha curcas* during soil flooding. **J. Turk. Bot.** 38: 130-140.
- Vodnik, D., P. Strajnar, S. Jemc and I. Macek. 2009. Respiratory potential of maize (*Zea may* L.) roots exposed to hypoxia. **Environ and Exp Bot.** 65: 107-110.
- Voesenek, L.A.C.J., J.J. Benschop, J. Bou, M.C.H. Cox, H.W. Groeneveld, F.F. Millenaar, R.A.M. Vreeburg and A.J.M. Peeters. 2003. Interactions between plant hormones regulate submergence induced shoot elongation in the flooding tolerant dicot *Rumex palustris*. **Ann. Bot.** 91: 205-211.
- Vogel, J., J. Fowler and M. Freeling. 1989. Detailed analysis of the aerobic and anaerobic tissue distribution of ADH1 activity in the primary root. **Maize Genet. Coop. Newslett.** 63: 35-36.

- Wample, R.L. and D.M. Reid. 1975. Effect of aeration on the flooded-induced formation of adventitious roots and other changes in sunflower. **Planta** 127: 26-270.
- Water, I., S. Morrell., H. Greenway and T.D. Colmer. 1991. Effects of anoxia on wheat seedlings. II. Influence of O<sub>2</sub> supply prior to anoxia on tolerance for anoxia, alcoholic fermentation, and sugar levels. **J. Exp. Bot.** 42: 1437-1447.
- Yin, D., S. Chen, F. Chen, Z. Guan and W. Fang. 2009. Morphological and physiological responses of two chrysanthemum cultivars differing in their tolerance to waterlogging. **Environ. Exp. Bot.** 67: 87-93
- Yordanova, R.Y. and L.P. Popova. 2007. Flooding-induced changes in photosynthesis and oxidative status in maize plants. **Acta Physiol. Plant.** 29: 535–541.
- Zaerr, J. B. 1983. Short-term flooding and net photosynthesis in seedlings of three conifers. **For. Sci.** 29:71-78.
- Zhang, J. and W.J. Davies. 1987. ABA in roots and leaves of flooded pea plants. **J.Exp. Bot.** 38: 649-659.
- Zheng, C., D. Jing, F. Lui, T. Dai, Q. Jing, W. Cao. 2009. Effect of salt and waterlogging stresses and their combination of leaf photosynthesis, chloroplast ATP synthesis, and antioxidant capacity in wheat. **Plant Sci.** 176: 575-582.





ภาพผนวกที่ 1 ภาพจำลองสภาพน้ำท่วม น้ำสูงจากพื้นกระบะ 30 เซนติเมตร ระดับน้ำสูงจากผิววัสดุปลูกในแต่ละกระบะ 15 เซนติเมตร



ภาพผนวกที่ 2 ระดับน้ำในกระบะที่มีความจุ 80 ลิตร

## ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ – นามสกุล	นางสาวณัฏญา ฐิติวิมล
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 12 มิถุนายน 2532
สถานที่เกิด	จังหวัดนครราชสีมา
ประวัติการศึกษา	ปริญญาตรี วท.บ. (เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน (2553)
ตำแหน่งปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-