รหัสโครงการ SUT 3-302-62-12-29 (NEW)

รายงานการวิจัย

ปรับปรุงความทนแล้งของข้าวสายพันธุ์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ

Improve drought tolerance of economic rice

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
กองทุนสนับสนุนการวิจัยและพัฒนา
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT 3-302-62-12-29 (NEW)

รายงานการวิจัย

ปรับปรุงความทนแล้งของข้าวสายพันธุ์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ

Improve drought tolerance of economic rice

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

อาจารย์ ดร.กมลชนก อำนาจกิติกร

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากกองทุนสนับสนุนการวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ปีงบประมาณ พ.ศ. 2562

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มิถุนายน 2563

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2562 ในการนี้ ขอขอบคุณฟาร์มมหาวิทยาลัย และศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ได้เอื้อเฟื้อบุคลากร พื้นที่ทำการทดลอง และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องและขอขอบคุณนักศึกษาผู้ร่วมวิจัย ได้แก่ นางสาวกนกวรรณ เอการัมย์ นางสาวประนัตดา นะราแก้ว และ นางสาวอรัญญา สายบุตร ที่ได้ปฏิบัติหน้าที่ที่ได้รับมอบหมายจากหัวหน้าโครงการวิจัยอย่างเต็มกำลังความสามารถ และขอขอบคุณห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาดินประยุกต์ และห้องปฏิบัติการดินและธาตุอาหารพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่เอื้อเฟื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง พื้นที่ในการทำการทดลองและบุคลากรบางส่วนมาช่วยสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้ จนทำให้การดำเนินงานของโครงการวิจัยเป็นไปด้วยความเรียบร้อยตามวัตถุประสงค์

กมลชนก อำนาจกิติกร

มิถุนายน 2563

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

สภาวะแห้งแล้งเป็นปัญหาที่สำคัญของการเกษตรในปัจจุบัน โดยเฉพาะการเพาะปลูกข้าวซึ่งเป็นพืชอาหารหลักของคนไทยและอีกหลายชาติในเอเชีย การปรับปรุงความทนแล้งของข้าวสายพันธุ์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจนั้นจึงมีความสำคัญอย่างมากในการทำให้ข้าวได้ผลผลิตดีขึ้นและใช้น้ำน้อยลง งานวิจัยนี้จึงมีความมุ่งหวังที่จะหากรรมวิธีทางสรีรวิทยาที่สามารถช่วยส่งเสริมความทนแล้งให้กับพันธุ์ข้าวที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของไทยในปัจจุบัน เช่น ข้าวขาวดอกมะลิ 105 และข้าวปทุมธานี 1 โดยใช้วิธีที่หลากหลาย เช่น การปรับระดับปุ๋ยไนโตรเจนเพียงระยะเวลาสั้นๆ ก่อนการได้ความเครียดจากสภาวะขาดน้ำ (nitrogen priming) การใช้สารยับยั้งการส่งสัญญานของฮอร์โมนเอทิลีน 1-methylcyclopropene (1-MCP) ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่มีบทบาทสำคัญในการเริ่งการเสื่อมสภาพหรือการชราของพืช และการใช้แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth promoting bacteria; PGPB) โดยงานวิจัยนี้ใช้การปลูกในกระถางในสภาพโรงเรือนซึ่งอาจจะมีความแตกต่างจากการทำไปใช้ในสภาพแปลงปลูก แต่มีความเหมาะสมในการทดลองเพื่อเก็บข้อมูลเบื้องต้นและการควบคุมปัจจัยต่างๆ ที่ต้องการทดสอบได้ดีกว่า โดยในการทดลองที่ที่มีระดับไนโตรเจนมาเกี่ยวข้องทางคณะผู้วิจัยได้เลือกใช้ระบบไฮโดรโพนิคมาช่วยในการปลูกข้าว ทั้งนี้ ในงานวิจัยทั้งหมดนี้ทางผู้วิจัยใช้การวางแผนการทดลองแผนสุ่มสมบูรณ์ (CRD) และวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยใช้ one-way ANOVA และ Duncan’s test ที่ระดับความน่าเชื่อถือ $p \leq 0.05$โดยผลการทดลองพบว่า nitrogen priming การใช้ 1-MCP และการใช้ PGPB มีส่วนส่งเสริมการทนแล้งของข้าวไทยทั้งสิ้น โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้ nitrogen priming ด้วยไนโตรเจนความเข้มข้น 500 ppm (nitrate: ammonium = 1:1) ก่อนการเริ่มขาดน้ำ 1 วันให้ผลดีที่สุดในการกระตุ้นอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงและรักษาระดับน้ำสัมพัทธ์ในใบระหว่างที่เกิดสภาวะขาดน้ำ และลดความเสียหายของเซลล์โดยวัดจากค่าการรั่วไหลของอิเล็กโตรไลท์ ส่วนการรมด้วย 1-MCP ที่ความเข้มข้น 1 ppm ก็ให้ผลยับยั้งการสลายตัวของโปรตีนและคลอโรฟิลล์ในใบได้ดีที่สุดผ่านการยับยั้งการทำงานของการสลายคลอโรพลาสโปรตีนด้วยระบบ chloroplast vesiculation และการสลายคลอโรฟิลล์ด้วย stay green chlorophyll degradation pathway ส่วนการใช้ PGPB 2 ชนิดคือ *Bradyrhyzobium* sp. strain SUTN 9-2 และ *Bacillus velezensis* strain S141ร่วมกันในการปลูกเชื้อก็ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตและความทนแล้งของข้าวไทยได้มากกว่าการปลูกเชื้อเดี่ยว จากผลการวิจัยในครั้งนี้จึงทำให้เห็นว่ามีวิธีที่หลากหลายที่สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อนำไปใช้เพิ่มผลผลิตและเพิ่มความทนทานต่อสภาวะขาดน้ำของข้าวได้ต่อไปในระบบการเกษตรของไทย

Abstract

Water deficit stress is the major problem of agriculture in these days, particularly rice production. Rice is a staple food of Thai people as well as many other Asian. Improvement of water deficit tolerance by discovering the methods of increasing yield but lower water use in agricultural field is crucial. In this research, we are focusing on discovering physiological strategies to promote drought tolerance in economic Thai rice cultivars Khao Dowk Mali 105 and Pathum Thani 1. We used several approach to acheieve our goal, including using nitrogen priming right before water deficiency, 1-methylcyclopropene (1-MCP) to inhibit signaling pathway of ethylene during stress induction or plant growth promoting bacteria (PGPB). In this research, we used greenhose condition as the experimental set up, which might result in different results from the field experiment. However, under greenhouse condition, we can control the tested parameter better than in field. We also used the hydroponic system in the experiment related to nitrogen level of fertilizer. All experiments were based on the Complete Randomized Design (CRD). The data were analyzed by using one-way ANOVA and Duncan's test at the significant level $p \leq 0.05$. Our results suggested that nitrogen priming, 1-MCP and PGPB had the positive effects on water deficit tolerance in rice. Regarding the nitrogen priming, 500 ppm nitrogen (nitrate: ammonium = 1:1) 1 day before the drought episode appeared to be the most effective level in photosynthesis enhancement and maintain leaf relative water content, as well as reduced the electrolyte leakage, which represented the lower cellular damage during water deficit condition. 1-MCP fumigation at 1 ppm was also viable for alleviation of leaf protein and chlorophyll degradation by limiting the stress-induced chloroplast degradation by Chloroplast Vesiculation (CV)-mediated pathway and lower chlorophyll degradation via stay green chlorophyll degradation pathway (SGR). Moreover, the co-inoculation of 2 PGPBs: *Bradyrhyzobium* sp. strain SUTN 9-2 and *Bacillus velezensis* strain S141 also promoted growth and water deficit tolerance in Thai rice more than the single inoculation of each of those. All together, there are several strategies is applicable for the further development to the higher yield and water deficit tolerance in Thai agricultural systems.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	1
1.3 สมมติฐานงานวิจัย	2
1.4 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	2
บทที่ 2 ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 วัสดุอุปกรณ์	7
3.2 ระยะเวลาการทดลอง	8
3.3 สถานที่ทาการทดลอง	8
3.4 วิธีการทดลอง	8
3.5 การบันทึกข้อมูล	12
3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล	14
บทที่ 4 ผลการการทดลองและอภิปรายผล	
การทดลองที่ 1 การศึกษาระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนที่ทำให้ข้าวไทยเจริญเติบโตเต็มที่ในระบบ Hydroponic	15
การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของระดับของปุ๋ยไนโตรเจนที่ให้ในระยะสั้นๆ (nitrogen priming) ก่อนสภาวะขาดน้ำต่อการทนแล้งของข้าวไทย	16

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

หน้า

การทดลองที่ 3 การศึกษาผลของสารยับยั้งการส่งสัญญาณของฮอร์โมนเอทิลีน 19
1-methylcyclopropene (1-MCP) ต่อการทนแล้งของข้าวไทย
การทดลองที่ 4 การศึกษาผลของแบคทีเรียที่พบในบริเวณรากพืช..... 22
ต่อการทนแล้งของข้าวไทย

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 25

บรรณานุกรม 27

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก รายชื่อไพรเมอร์และลำดับเบสที่ใช้ใน..... 31
การตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วย qPCR
ภาคผนวก ข อาหารและสภาวะที่ใช้เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *B. velezensis* 33
strain S141 และ *Bradyrhizobium* sp. strain SUTN 9-2
ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐานปริมาณโปรตีน Bovine serum albumin (BSA)..... 34
ภาคผนวก ง สภาวะแวดล้อมภายในโรงเรือนปลูกข้าว..... 35

ประวัติผู้วิจัย 37

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3.1 ค่าการวิเคราะห์ดินที่ใช้ในการปลูกข้าว 10

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 3.1 แผนภูมิแสดงการจัดการน้ำในชุดการทดลองขาดน้ำ (Water deficiency) 10

ภาพที่ 3.2 อุปกรณ์และวิธีรม 1-MCP 11

ภาพที่ 4.1 การทดลองศึกษาระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนที่ทำให้ข้าวไทย 16
เจริญเติบโตเต็มที่ในระบบ Hydroponic ของข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 และ
พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

ภาพที่ 4.2 การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 (Pathum Thani 1)
17
และขาวดอกมะลิ 105 (KDML 105) เมื่อรับ nitrogen priming ที่ระดับต่างๆ
ก่อนการขาดน้ำ

ภาพที่ 4.3 การเปลี่ยนแปลงทางด้านชีวเคมีและปริมาณน้ำสัมพัทธ์ในใบของข้าว 18
พันธุ์ปทุมธานี 1 เมื่อรับ nitrogen priming ที่ระดับต่างๆ ก่อนการขาดน้ำ

ภาพที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 (Pathum Thani 1) 20
เมื่อรับ 1-MCP ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ก่อนการขาดน้ำ

ภาพที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีและการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องการการชรา 21
ของใบของข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 (Pathum Thani 1) เมื่อรับ 1-MCP ที่ระดับ
ความเข้มข้นต่างๆ ก่อนการขาดน้ำ

ภาพที่ 4.6 การเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 (Pathum Thani 1) อายุ 8 สัปดาห์ 22
ภายหลังการปลูกเชื้อ (inoculated) *Bradyrhizobium* sp. SUTN 9-2 อย่างเดียว
(9-2) *Bacillus velezensis* S141 อย่างเดียว (S141) ปลูกเชื้อ SUTN 9-2 และ S141
ร่วมกัน (co-inoc) และไม่ผ่านการปลูกเชื้อ (Uninoc) ในสภาวะที่ได้น้ำสมบูรณ์
และสภาวะขาดน้ำ

ภาพที่ 4.7 การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของใบของข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 (Pathum Thani 1) 23
อายุ 12 สัปดาห์ (ระยะสร้างช่อดอก) ภายหลังการปลูกเชื้อ (inoculated)
Bradyrhizobium sp. SUTN 9-2 อย่างเดียว (SUTN 9-2) *Bacillus velezensis* S141
อย่างเดียว (S141) ปลูกเชื้อ SUTN 9-2 และ S141 ร่วมกัน (co-inoc) และ
ไม่ผ่านการปลูกเชื้อ (Uninoc) ในสภาวะที่ได้น้ำสมบูรณ์และสภาวะขาดน้ำ

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญของไทย ในแต่ละปีประเทศไทยทำรายได้จากการส่งออกข้าวมากกว่า 150,000 ล้านบาทต่อปี แต่ในปัจจุบันนี้โลกของเรากำลังประสบปัญหาภูมิอากาศแปรปรวนและสภาวะโลกร้อน ซึ่งทำให้สภาวะแห้งแล้งและฝนทิ้งช่วงทวีความรุนแรงในพื้นที่เกษตรกรรมต่างๆ ทั่วโลกรวมถึงประเทศไทยและจังหวัดนครราชสีมาด้วย โดยพื้นที่ปลูกข้าวส่วนใหญ่ของไทยยังเป็นพื้นที่ที่พึ่งพาน้ำฝนเป็นหลัก ทำให้การเพาะปลูกในบางพื้นที่มีผลผลิตต่ำลงซึ่งสร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจให้กับเกษตรกรเป็นจำนวนมาก

ในปัจจุบันมีการนำวิธีการต่างๆ มาชักนำให้พืชสามารถทนต่อสภาวะแห้งแล้งมากขึ้น ไม่ว่าจะเป็นการใช้สารเคมีต่างๆ เทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพ หรือการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม แต่เมื่อพิจารณาถึงธรรมชาติและเหตุผลทางวิวัฒนาการของพืชแล้ว ข้าวเป็นพืชปีเดียว (annual crop) ซึ่งภายใต้สภาพแล้งนั้นส่วนใหญ่จะตอบสนองด้วย escape strategy ซึ่งสามารถเห็นได้จากการเร่งอัตราการชราของใบและเร่งการผลิตเมล็ด แต่เนื่องจากใบเป็นแหล่งสร้างอาหาร (photosynthates) ที่สำคัญของต้นข้าว การชราของใบจึงส่งผลเสียโดยตรงต่อผลผลิตของข้าว นอกจากนี้ในสภาวะแล้งน้ำซึ่งเป็นตัวทำละลายและนำพาธาตุอาหารเข้าสู่รากพืชมีจำกัดจึงอาจจะทำให้พืชขาดธาตุอาหารที่สำคัญ เช่น ไนโตรเจน ซึ่งอาจจะเป็นหนึ่งในสาเหตุที่ทำให้ใบเกิดการเสื่อมสภาพ รวมทั้งความสมดุลของฮอร์โมนต่างๆ ที่เปลี่ยนไป ดังนั้นการเพิ่มไนโตรเจนให้กับพืชหรือการช่วยพืชในการปรับสมดุลฮอร์โมนอาจจะเป็นแนวทางในการส่งเสริมการทนทานต่อความแห้งแล้งและเพิ่มผลผลิตของข้าวภายใต้สภาวะแห้งแล้ง

แต่อย่างไรก็ตามการให้สารเคมีหรือให้ไนโตรเจนกับพืชนั้นอาจจะเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิตและทำให้มีปัญหาสิ่งแวดล้อมตามมาจากการตกค้างของสารเคมีในดิน หรือจากการชะล้างไนโตรเจนและสารเคมีเหล่านี้ซึ่งจะไหลไปสะสมในดินหรือแหล่งน้ำต่างๆ ต่อไป ซึ่งการใช้แบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับพืชมาเป็นแหล่งผลิตไนโตรเจนหรือฮอร์โมนที่ช่วยลดผลกระทบต่อสภาวะเครียดของพืชมาใช้จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจในการศึกษาเป็นอย่างยิ่ง

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาผลของไนโตรเจนหรือแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนต่อความทนแล้งของข้าว

1.2.2 เพื่อศึกษาผลของสารยับยั้งฮอร์โมนเอทิลีน 1-methylcyclopropene (1-MCP) ต่อความทนแล้งของข้าว

1.3 สมมติฐานงานวิจัย

1.3.1 เมื่อได้รับปริมาณไนโตรเจนที่สูงขึ้นในช่วงเวลาสั้นๆ ก่อนการขาดน้ำทำให้ต้นข้าวสามารถทนแล้งได้มากขึ้น

1.3.2 การยับยั้งการส่งสัญญาณของฮอร์โมนเอทิลีนช่วยเหนี่ยวนำการทนแล้งในข้าวไทย

1.3.3 แบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนและยับยั้งการสร้างเอทิลีนสามารถเพิ่มความทนแล้งให้ข้าวไทยได้

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้มุ่งเน้นการศึกษาผลของไนโตรเจนหรือการปรับสมดุลเอนไซม์ต่อการชักนำให้ข้าวทนแล้งโดยเน้นการศึกษาและเปรียบเทียบดังกล่าวไปที่ลักษณะทางสรีรวิทยา เช่น อัตราการสังเคราะห์แสง การตอบสนองของปากใบ และปัจจัยทางชีวเคมีและชีววิทยาโมเลกุลในข้าวที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น ข้าวขาวดอกมะลิ 105 (ไวต่อแสง) และข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 (ไม่ไวต่อแสง)

1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1.5.1 ทราบความเป็นไปได้ในการใช้ไนโตรเจนและการควบคุมสมดุลของฮอร์โมนพืชเพื่อเพิ่มความทนทานต่อความแล้งในข้าวไทย

1.5.2 ทราบความเป็นไปได้ในการใช้แบคทีเรียเพื่อเพิ่มความทนแล้งในข้าวไทย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2
ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ข้าวเป็นอาหารหลักของคนไทยทั้งประเทศ ปัจจุบันคนไทยที่ยึดอาชีพทำนามีประมาณ 3.7 ล้านครอบครัวหรือราวๆ 14-15 ล้านคน ไทยผลิตข้าวมากกว่า 20 ล้านตันต่อปี โดยการปลูกข้าวในไทยนั้นมีทั้งแบบนาปีและนาปรัง รวมพื้นที่ปลูกมากกว่า 60 ล้านไร่ โดยประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกข้าวลำดับที่ 5 ของโลก ซึ่งคิดเป็นรายได้เข้าประเทศมากกว่า 150,000 ล้านบาทต่อปี (สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย, 2561) ในปัจจุบันภูมิอากาศของโลกเปลี่ยนแปลงไปอย่างมากเนื่องจากสภาวะโลกร้อน ทำให้บางพื้นที่มีฝนตกมากขึ้นและบางบริเวณมีฝนตกลดลง โดยพื้นที่ส่วนใหญ่ที่เกิดภัยแล้งและฝนทิ้งช่วงอยู่ในบริเวณภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศ (สถาบันสารสนเทศทรัพยากรน้ำและการเกษตร, 2557; ประชาชาติธุรกิจ, 2561)

ในสภาวะแล้งนั้นต้นข้าวซึ่งเป็นพืชปีเดียวจะมีการตอบสนองหลักเป็นแบบ escape strategy จะสังเกตเห็นได้จากการเร่งอัตราการชราของใบ ซึ่งสามารถตรวจวัดได้จากการสังเคราะห์แสงที่ลดต่ำลงและปริมาณโปรตีนในใบที่ลดต่ำลง และจะเริ่มการถ่ายทอดสารอาหารต่างๆ ที่สะสมในใบไปยังเมล็ดซึ่งเป็นอีกหนึ่งช่วงในวัฏจักรชีวิตของพืชที่มีความสามารถในการทนแล้งได้มากกว่า ซึ่งกลยุทธ์นี้ส่งผลดีต่อพืชที่เจริญเติบโตตามธรรมชาติ แต่กลับมีผลเสียอย่างมากในทางเศรษฐกิจ เนื่องจากผลผลิตที่ลดลงในสภาวะแล้ง (สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์, 2548; Sade et al., 2017) หลายการทดลองได้แสดงให้เห็นว่าการชะลอการชราของใบนั้นส่งผลดีต่อผลผลิตของพืช ในขณะที่อีกหลายงานวิจัยก็แสดงให้เห็นว่าการชะลอการชราของใบนั้นทำให้ได้ผลผลิตลดลง (Gregersen et al., 2013; Jagadish et al., 2015) ดังนั้นเทคนิคที่นำมาใช้ในการชะลอความชราของใบและชนิดของพืชหรือแม้กระทั่งสายพันธุ์ของพืชจึงมีความสำคัญอย่างมากในการเพิ่มผลผลิตของพืชภายใต้ภาวะแล้ง

ธาตุไนโตรเจนมีความสำคัญในการผลิตข้าวเป็นอย่างยิ่ง โดยการจัดการธาตุอาหารในข้าวและพืชชนิดต่างๆ มีหลักการว่า ต้องให้ธาตุอาหารแก่พืชในปริมาณและช่วงระยะเวลาที่พืชต้องการ ในการปลูกตามธรรมชาติพืชได้ธาตุอาหารส่วนใหญ่มาจากดิน โดยที่ดินแต่ละชนิดมีปริมาณธาตุอาหารที่แตกต่างกันออกไป รวมทั้งธาตุอาหารแต่ละชนิดก็เคลื่อนที่ได้แตกต่างกันในดินชนิดไม่ต่างกัน ซึ่งจะมีผลต่อความเป็นประโยชน์ของธาตุอาหารต่อพืช ไนโตรเจนเป็นธาตุที่มีการเคลื่อนย้ายได้ดีในดิน และมีข้อจำกัดมากที่สุดไม่ว่าจะเป็นเรื่องการชะล้างและการระเหยจากดินในทั้ง 2 รูปของธาตุไนโตรเจนที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ทันที คือ รูปไนเตรทและรูปแอมโมเนียมตามลำดับ ขณะที่ฟอสฟอรัสเป็นธาตุที่เคลื่อนย้ายได้ยาก ซึ่ง Dobermann and Fairhurst (1999) ได้อธิบายสาเหตุและลักษณะอาการขาดธาตุอาหารต่างๆ ตลอดจนวิธีการป้องกันและแก้ไขไว้ดังนี้

ไนโตรเจน (N) เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของกรดอะมิโน (Amino acids) กรดนิวคลีอิก (Nucleic acids) นิวคลีโอไทล์ (Nucleotile) และคลอโรฟิลล์ ไนโตรเจนช่วยในการเจริญเติบโตของพืช

เพิ่มขนาดใบ เพิ่มจำนวนเมล็ดต่อรวง เพิ่มจำนวนเมล็ดดีต่อรวง และเพิ่มปริมาณโปรตีนในเมล็ด ไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารที่ไม่พบในวัตถุต้นกำเนิดของดิน (parent material) และพบว่ามักจะไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของข้าวในนา โดยเฉพาะในนาดินทรายที่มีระดับอินทรียวัตถุต่ำเช่นที่พบทั่วไปในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย โดยข้าวที่ขาดไนโตรเจนจะมีใบแก่หรือบางครั้งใบทั้งหมดเป็นสีเขียวอ่อน ปลายใบเหลือง ถ้าขาดรุนแรงใบแก่จะตายเหลือเพียงใบอ่อน ใบแคบ สั้นและตั้งตรง มีสีเขียวปนเหลือง การขาดไนโตรเจนมักเกิดในระยะข้าวแตกกอและระยะกำเนิดช่อดอก ซึ่งเป็นระยะที่ข้าวมีความต้องการไนโตรเจนสูง การขาดไนโตรเจนส่งผลให้การแตกกอลดลง ต้นข้าวแคระแกร็น แตกกอน้อย มีเมล็ดดีต่อรวงลดลงทำให้ผลผลิตข้าวลดลง อาการขาดไนโตรเจนจะคล้ายกับอาการขาดกำมะถัน แต่การขาดกำมะถันจะไม่พบบ่อยนักและมักแสดงอาการที่ใบอ่อนก่อนจะลามไปทั้งต้น การขาดไนโตรเจนเล็กน้อยยังคล้ายกับการขาดธาตุเหล็ก ต่างกันที่การขาดธาตุเหล็กจะเกิดกับใบอ่อนที่กำลังจะพ้นกาบใบออกมา แต่จะแตกต่างโดยสิ้นเชิงจากการขาดแมกนีเซียมซึ่งเป็นธาตุองค์ประกอบของคลอโรฟิลล์เช่นกัน เนื่องจากต้นข้าวที่ขาดแมกนีเซียมจะแสดงอาการขาดที่ใบแก่ก่อน มีอาการคล้ายการขาดโพแทสเซียม คือจะมีสีซีด พื้นที่ระหว่างเส้นใบจะเป็นสีเขียวซีด โดยจะเกิดกับใบแก่ก่อนและเมื่อขาดมากขึ้นจะลามมาถึงใบอ่อน

สาเหตุของการขาดไนโตรเจนในข้าวเกิดจากดินนามีระดับไนโตรเจนต่ำ การใส่ปุ๋ยไม่เพียงพอต่อความต้องการของพืช ดินขาดน้ำ การใส่ปุ๋ยด้วยวิธีการและเวลาที่ไม่เหมาะสม การสูญเสียไนโตรเจนไปกับผลผลิตที่เก็บเกี่ยว รวมทั้งการที่ดินมีการสูญเสียไนโตรเจนจากกระบวนการต่างๆ (Volatilization, Denitrification, การถูกชะล้างสู่ดินชั้นล่าง) สูง

การจัดการเพื่อการป้องกันและแก้ไขการขาดไนโตรเจนในข้าวสามารถทำได้โดย (Mueller, 1980)

1. การใส่ปุ๋ยไนโตรเจนให้แก่ข้าว เป็นวิธีการที่รวดเร็วที่สุด โดยข้าวจะตอบสนองต่อปุ๋ยที่ใส่โดยมีใบเขียวขึ้น มีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้นหลังจากใส่ปุ๋ย 2–3 วัน อย่างไรก็ตามการตอบสนองนี้จะขึ้นอยู่กับพันธุ์ข้าว ชนิดดิน สภาพภูมิอากาศ ชนิดปุ๋ยและปริมาณที่ใช้ รวมทั้งเวลาและวิธีการที่ใส่
2. การใช้วัสดุอินทรีย์ เช่นปุ๋ยพืชสด มูลสัตว์ ฟางข้าว เป็นต้น ในการเพิ่มระดับอินทรียวัตถุและความอุดมสมบูรณ์ของดินเพื่อเพิ่มปริมาณ ไนโตรเจนในดินในระยะยาว
3. ปรับปรุงดินเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนโดยใส่วัสดุที่มีความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุบวก (Cation Exchange Capapcity - CEC) สูง เช่น Zeolite (CEC 200-300 cmol/ดิน 1 กก.), Vermiculite (CEC 100-200 cmol/ดิน 1 กก.)

ดังที่กล่าวไปแล้วข้างต้นว่าภาวะดินขาดน้ำหรือสภาวะแล้งเป็นหนึ่งในสาเหตุสำคัญที่ทำให้ข้าวขาดไนโตรเจน เนื่องจากธาตุอาหารต่างๆ จะถูกนำพาเข้าสู่รากพืชด้วยน้ำ ซึ่งเมื่อปริมาณน้ำในดินน้อยปริมาณธาตุอาหารที่อยู่ในดินตามปกติจึงไม่เพียงพอต่อการลำเลียงเข้าสู่รากพืชอีกต่อไป การคาย

น้ำซึ่งเป็นกลไกหลักที่ช่วยในการลำเลียงน้ำและแร่ธาตุจากดินเข้าสู่พืชและไปสู่ส่วนต่างๆ ของพืชลดลง รวมทั้ง membrane permeability และความสมดุลของ active transport ภายใต้สภาวะขาดน้ำยังลดลงอีกด้วย (Silva et al., 2011) ซึ่งมีงานวิจัยหลายชิ้นได้แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มแร่ธาตุในดิน โดยเฉพาะไนโตรเจนสามารถช่วยส่งเสริมความสามารถในการทนแล้งของพืชได้ โดยการให้ไนโตรเจนมีผลในการเพิ่มอัตราการสังเคราะห์แสง พื้นที่ใบ ปริมาณคลอโรฟิลล์ ความยืดหยุ่นของผนังเซลล์ และ membrane stability (DaMatta et al., 2002; Saneoka et al., 2004; Wu et al., 2008)

ในสภาวะแล้งไม่เพียงแต่สมดุลของคาร์บอนและไนโตรเจนที่เปลี่ยนแปลงไป สมดุลของฮอร์โมนในพืชก็ยังเปลี่ยนแปลงไปอีกด้วย โดยจะเพิ่มการสร้างฮอร์โมนกลุ่มที่ชักนำการชราและการหลุดร่วงของใบ เช่น abscisic acid (ABA) และเอทิลีน แต่ในขณะเดียวกันก็ลดการสร้างฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต เช่น ออกซินและไซโตไคนิน การลดปริมาณการผลิตหรือลดการตอบสนองต่อฮอร์โมนเอทิลีนนั้นมีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในเชิงการค้าในการชะลอการชราในผลผลิตหลังการเก็บเกี่ยว แต่ในการนำมาใช้เพื่อเพิ่มความทนต่อความแล้งและสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมนั้นยังมีไม่มากนัก งานวิจัยเกี่ยวกับเพิ่มความทนต่อความแห้งแล้งด้วยสารยับยั้งการตอบสนองของเอทิลีนส่วนมากทำในฝ้าย โดยการให้ 1-Methylcyclopropene (1-MCP) ความเข้มข้น 10 g a.i. ha^{-1} เพิ่มผลผลิตของฝ้ายทั้งในสภาพควบคุมและสภาพขาดน้ำ โดยการเพิ่ม membrane integrity, photosystem II quantum efficiency, เพิ่มกิจกรรมของ antioxidant enzyme และชะลอการชราของใบ (Hussain et al., 2018; Kawakami et al., 2010) ในข้าวนั้นมีรายงานการใช้ 1-MCP เพิ่มผลผลิตของข้าวในสภาพที่มีอุณหภูมิกลางคืนสูง โดยการเพิ่มขึ้นของปัจจัยต่างๆ เช่นเดียวกับที่มีการรายงานในฝ้าย (Mohammed et al., 2015)

อีกวิธีหนึ่งที่กำลังได้รับความนิยมคือการใช้แบคทีเรียเพื่อช่วยให้พืชทนแล้งมากขึ้น ด้วยกลไกที่แตกต่างกัน ได้แก่ การผลิตหรือชักนำให้พืชมีการผลิตฮอร์โมนบางตัว เช่น ออกซิน และ ABA การสร้างสารระเหยซึ่งชักนำให้เกิดการทนต่อความแล้ง และการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาและสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์ของรากพืช หรือการสร้าง 1- aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase ซึ่งลดปริมาณการสร้างและสะสมเอทิลีน รวมถึงการสร้าง osmolyte เพื่อเพิ่มการรักษาแรงดันน้ำในเซลล์ หรือการสร้าง exopolysaccharide (EPS) ที่ทำให้ดินสามารถเก็บน้ำได้ดีขึ้น (Dimkpa et al., 2009; Vurukonda et al., 2016) แต่อย่างไรก็ตามความสามารถของแบคทีเรียในการเพิ่มความสามารถของพืชในการดูดซับธาตุอาหารที่จำเป็นโดยเฉพาะไนโตรเจน เช่น การใช้แบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนนั้น ยังไม่มีการรายงานในการส่งเสริมความทนแล้งของพืช แบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนและสามารถเพิ่มความทนแล้งของต้นข้าวได้ ได้แก่ *Bradyrhizobium* (Chaintreuil et al., 2000; Piromyou et al., 2015b) *Azotobacter* ซึ่งมีการรายงานทั้งในข้าวและข้าวสาลี (Piao et al., 2005; Vurukonda et al., 2016) และ *Bacillus* (Piao et al., 2005; Vurukonda et al., 2016) มีการรายงานว่ามีความสามารถในการอยู่ร่วมกับข้าวและมี

ความสามารถในการตรึงไนโตรเจนและการเพิ่มความทนแล้งในข้าวและข้าวโพด ดังนั้นการศึกษาความเป็นไปได้ในการเพิ่มผลผลิตและความทนแล้งของข้าวด้วยวิธีต่างๆ ในโครงการนี้จึงเป็นประโยชน์ในการพัฒนาวิธีการต่างๆ เพื่อเพิ่มความทนทานต่อสภาพแล้งของข้าวเศรษฐกิจของไทย

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตุประสงค์เพื่อศึกษาผลของไนโตรเจนหรือแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจน รวมทั้งผลของสารยับยั้งฮอร์โมนเอทิลีน 1-methylcyclopropene (1-MCP) ต่อความทนแล้งของข้าว

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 เมล็ดพันธุ์ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เก็บเกี่ยวในช่วงนาปี พ.ศ. 2561 จากศูนย์วิจัยข้าวนครราชสีมา อ.พิมาย จ.นครราชสีมา

3.1.2 เมล็ดพันธุ์ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 เก็บเกี่ยวในช่วงนาปี พ.ศ. 2561 จากศูนย์วิจัยข้าวนครราชสีมา อ.พิมาย จ.นครราชสีมา

3.1.3 แบคทีเรีย *Bradyrhyzobium* sp. strain SUT 9-2 และ *Bacillus velezensis* strain S141

3.1.4 สารเคมีองค์ประกอบปุ๋ย เช่น แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) โพแทเซียมไนเตรท (KNO_3)

3.1.5 ระบบน้ำหยด เช่น ท่อ PE, สายน้ำหยด เป็นต้น

3.1.6 กระถางพลาสติก และ วัสดุปลูก perlite และ vermiculite

3.1.7 สารเคมีในการวิเคราะห์ทางชีวเคมีต่างๆ

3.1.7.1 1-methylcyclopropene (1-MCP)

3.1.7.2 Acetone สำหรับสกัดคลอโรฟิลล์

3.1.7.3 Bradford reagent สำหรับวัดปรมาณโปรตีน

3.1.7.4 ชุด Kit ในการสกัด RNA และสังเคราะห์ cDNA

3.1.8 เครื่องมือต่างๆ ได้แก่

3.1.8.1 เครื่องวัดการสังเคราะห์ด้วยแสง ADC LCi-SD

3.1.8.2 เครื่อง pressure chamber สำหรับวัดค่าชลศักย์ในใบพืช

3.1.8.3 เครื่องวัดความชื้นในดิน

3.1.8.4 เครื่องวัดการดูดกลืนแสงชนิด 96-well reader (microplate reader), Confocal microscope

3.1.9 วัสดุอุปกรณ์อื่นๆ เช่น microplate, mircocentrifuge tube, conical tube 15 mL และ 50 mL, กระดาษเพาะเมล็ด micropipette และเครื่องแก้วต่างๆ

3.2 ระยะเวลาการทดลอง

10 มกราคม 2562 – 10 มกราคม 2563

3.3 สถานที่ทำการทดลอง

ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และห้องปฏิบัติการวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว ศูนย์เครื่องมือ 3 (F3) และ ศูนย์เครื่องมือ 10 (F10) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.4 วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 การศึกษาหาปริมาณไนโตรเจนที่ทำให้ข้าวไทยเจริญเติบโตได้ดีในระบบ Hydroponic

ปลูกต้นข้าวทั้ง 2 พันธุ์ลงในกระถางขนาด 2 ลิตรใช้ perlite: vermiculite = 1: 1 เป็นวัสดุปลูก ให้ปุ๋ยผ่านระบบน้ำหยดด้วยหัวน้ำหยดในอัตรา 30 mL/ นาที โดยปุ๋ยที่ใช้มีความเข้มข้นของไนโตรเจนในปริมาณต่างๆ กันดังนี้ 75, 150, 300 ppm โดยมีปริมาณธาตุอาหารอื่นๆ ดังนี้ ฟอสฟอรัส (P) 20 ppm โพแทสเซียม (K) 75 ppm แคลเซียม (Ca) 27 ppm แมกนีเซียม (Mg) 17 ppm ซัลเฟอร์ (S) 65 ppm, เหล็ก (Fe) 1.50 ppm แมงกานีส (Mn) 0.50 ppm สังกะสี (Zn) 0.05 ppm โมลิบดินัม (Mo) 0.01 ppm ทองแดง (Cu) 0.02 ppm โดยให้น้ำทุกวันวันละ 2 ครั้ง ครั้งละ 150 mL โดยจะมีน้ำถูกชะออกทางก้นกระถางครั้งละประมาณ 50 mL เพื่อชะล้างธาตุอาหารที่อาจจะตกค้าง ปรับเพิ่มปริมาณไนโตรเจนจาก 75 เป็น 150 และ 300 ppm โดยใช้โพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) แคลเซียมไนเตรท ($Ca(NO_3)_2$) โมโนแอมโมเนียมฟอสเฟส (MAP) และแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ให้ได้ปริมาณแอมโมเนียมและไนเตรทในอัตรา 1:1 และปรับปริมาณธาตุอื่นๆ เช่น Mg ด้วย $MgSO_4$, P ด้วยโมโนแอมโมเนียมฟอสเฟส (MAP) หรือ โมโนโพแทสเซียมฟอสเฟส (MKP) เมื่อได้ปริมาณที่เหมาะสมของทุกธาตุแล้วก็นำสูตรปุ๋ยนี้ไปใช้กับการทดลองอื่นๆ ต่อไป โดยการสังเกตอาการขาดธาตุอาหารของต้นข้าวจนถึงระยะออกรวงแล้วจึงทำการสรุปผล

การศึกษาผลของระดับของปุ๋ยไนโตรเจนที่ให้ในระยะสั้นๆ (nitrogen priming) ก่อนสภาวะขาดน้ำต่อการทนแล้งของข้าวไทย

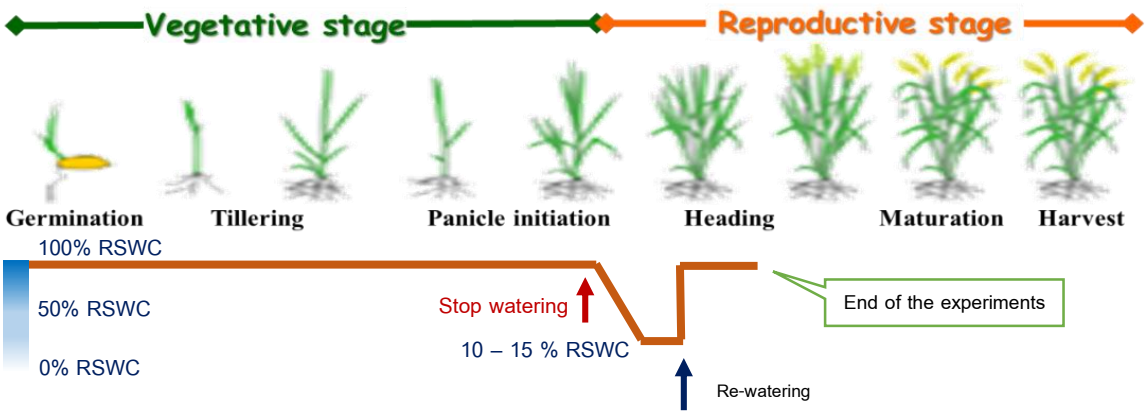
เพาะเมล็ดข้าวทั้ง 2 พันธุ์ในกระดาษเพาะเมล็ดแบบ between paper ในกล่องพลาสติกและเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 7 วันที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงย้ายปลูกลงในกระถางขนาด 2 ลิตรใช้ perlite: vermiculite = 1: 1 เป็นวัสดุปลูก ซึ่งปลูกในโรงเรือนหลังคาพลาสติก ให้ปุ๋ยผ่านระบบน้ำหยดด้วยหัวน้ำหยดในอัตรา 30 mL/ นาที โดยใช้ปุ๋ยสูตรที่ได้จากการทดลองก่อนหน้า โดยให้น้ำทุกวันวันละ 2 ครั้ง

ครั้งละ 150 mL จนต้นข้าวอยู่ในระยะสร้างช่อดอก (panicle initiation) ซึ่งประมาณ 1 เดือนหลังจากย้ายต้นกล้าปลูก จึงเปลี่ยนปริมาณไนโตรเจนในปุ๋ยเป็นความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 100, 300 (ระดับปกติที่ใช้ในช่วง 1 เดือนแรก), 500 และ 1000 ppm ซึ่งที่ระดับ 300, 500 และ 1000 ppm นั้นใช้แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) ในการปรับระดับไนโตรเจนเพื่อไม่ให้มีผลกระทบต่อปริมาณธาตุอาหารอื่นๆ โดยการใช้ปุ๋ยที่มีไนโตรเจนความเข้มข้นต่างๆ นี้ไปในระบบน้ำหยดกระถางละ 500 mL เพื่อชะล้างปุ๋ยเดิมออกจากกระถางทั้งหมดแล้วจึงเริ่มแบ่งต้นข้าวออกเป็น 2 ชุดการทดลอง คือ ต้นข้าวที่ได้รับน้ำตามปกติ (ชุดควบคุม) และต้นข้าวที่ขาดน้ำโดยในแต่ละชุดการทดลองจะมีต้นข้าวแต่ละพันธุ์ที่ได้รับปุ๋ยไนโตรเจนความเข้าข้นหนึ่งๆ ไม่น้อยกว่า 15 ต้น โดยในชุดที่ขาดน้ำนั้นจะหยุดการใช้น้ำทันทีภายหลังการให้ปุ๋นที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ของไนโตรเจนแล้วเป็นเวลา 1 สัปดาห์ โดยปกติแล้วข้าวในสภาวะดังกล่าวจะใช้เวลาเพียง 3 วันก็จะเริ่มแสดงอาการขาดน้ำ ซึ่งสังเกตเห็นได้จากการมวนใบ (leaf rolling) ซึ่งเมื่อต้นข้าวแสดงอาการขาดน้ำจะให้น้ำประมาณ 20 mL/วัน เพื่อรักษาปริมาณน้ำในวัสดุปลูกให้อยู่ระหว่าง 10-15% ของปริมาณน้ำสัมพัทธ์ในวัสดุปลูก ส่วนชุดควบคุมในระหว่างช่วงเวลาดังกล่าวจะให้น้ำทุกวันวันละ 2 ครั้ง ครั้งละ 100 mL

การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของระดับของปุ๋ยไนโตรเจนที่ให้ในระยะสั้นๆ (nitrogen priming) ก่อนสภาวะขาดน้ำต่อการทนแล้งของข้าวไทย

1. เพาะเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และปทุมธานี 1 ในกระดาษเพาะในที่มืดเป็นเวลา 10 วันก่อนจะนำต้นกล้าข้าวไปปลูกในกระถางขนาด 2 ลิตร โดยใช้ vermiculite: perlite = 1:1 เป็นวัสดุปลูก เพื่อให้ง่ายต่อการควบคุมปริมาณไนโตรเจน ในเรือนเพาะชำ

2. ปลูกในเรือนเพาะชำอีก 2 สัปดาห์โดยให้น้ำและปุ๋ยเป็นการให้ผ่านระบบน้ำหยด โดยให้ไนโตรเจนความเข้มข้น 300 ppm จนข้าวอยู่ในระยะการแตกกอ แล้วแบ่งพืชเป็น 2 ชุดการทดลองใหญ่ คือ ชุดควบคุมและชุดที่ขาดน้ำ แบ่งต้นข้าวในแต่ละชุดการทดลองใหญ่ ออกเป็น 4 ชุดการทดลองย่อย โดยในแต่ละชุดการทดลองย่อยมีจำนวน 6 ซ้ำ ในแต่ละชุดการทดลองย่อยนั้นให้สารละลายปุ๋ยที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนแตกต่างกัน คือ 100, 300, 500 และ 1000 ppm ปริมาตรเพียงพอในการชะสารละลายเดิมที่มีอยู่ออกไป หลังจากให้พืชขาดน้ำ ในน้ำซึ่งคงความเข้มข้นของไนโตรเจน 4 ระดับนี้จนถึงระยะเก็บเกี่ยว โดยจะทำให้พืชขาดน้ำซ้ำอีกในระยะสร้างช่อดอกอ่อน (panicle initiation) โดยการขาดน้ำและการให้น้ำนั้นจะเป็นไปตามภาพที่ 3.1 และในระหว่างที่หยุดการรดน้ำ ติดตามค่าความชื้นในดินด้วยเครื่องวัดความชื้นในดิน



ภาพที่ 3.1 แผนภูมิแสดงการจัดการน้ำในชุดการทดลองขาดน้ำ (Water deficiency)

3. วัดการตอบสนองทางสรีรวิทยา เช่น อัตราการสังเคราะห์แสง ค่าการตอบสนองของปากใบ และค่าการคายน้ำในทั้งชุดควบคุมและชุดที่ขาดน้ำ เมื่อข้าวในชุดที่ขาดน้ำเริ่มแสดงอาการขาดน้ำซึ่งเห็นได้จากใบที่ม้วนงอ ในใบที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้วและมีอายุน้อยที่สุด ในช่วง 9.00 – 12.00 น. ตามวิธีการของ Sade and Umnajkitikorn et al. (2017)

4. เก็บตัวอย่างใบของข้าวในทุกชุดการทดลองแล้วนำมาวิเคราะห์การตอบสนองทางชีวเคมี เช่น ปริมาณคลอโรฟิลล์ และปริมาณโปรตีน กิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านออกซิเดชัน (antioxidant enzyme) ในใบอ่อนที่สุดที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้ว (youngest fully expanded leaves) ในช่วง 9.00 – 12.00 น. ตามวิธีการของ Sade and Umnajkitikorn et al. (2017)

การทดลองที่ 3 การศึกษาผลของสารยับยั้งการตอบสนองต่อฮอร์โมนเอทิลีน 1-methylcyclopropene (1-MCP) ต่อความทนแล้งของข้าว

1. เพาะเมล็ดข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ในกระบะเพาะโดยใช้พีทมอสเป็นวัสดุปลูกในที่มืดเป็นเวลา 10 วันก่อนจะนำต้นกล้าข้าวไปปลูกในกระถางขนาด 2 ลิตร ซึ่งบรรจุด้วยดินร่วนเหนียวที่มีค่าการวิเคราะห์ดินในตารางที่ 1 และคลุกเคล้าให้เข้ากันดีแล้วกับปุ๋ยมูลค้างคาวกระถางละ 5 กรัม เพื่อให้ดินมีปริมาณไนโตรเจนเพียงพอต่อการเจริญเติบโตของต้นข้าวในช่วง 1 เดือนแรก

ตารางที่ 3.1 ค่าการวิเคราะห์ดินที่ใช้ในการปลูกข้าว

ตัวอย่าง	EC (dS/m)	pH	%OM	P(ppm)	K(ppm)	Ca(ppm)	Mg(ppm)
1. ดินปลูกข้าว	0.36	7.64	1.21	23.2	52.4	4078.4	1872.7

2. แบ่งต้นข้าวในแต่ละชุดการทดลองใหญ่ ออกเป็น 4 ชุดการทดลองย่อย โดยในแต่ละชุดการทดลองย่อยมีจำนวน 7 ซ้ำ ในแต่ละชุดการทดลองย่อยนั้นรมด้วย 1-MCP โดยใช้ความเข้มข้น 0, 0.1, 1 และ 5 ppm 1-MCP ทั้งในกลุ่มที่ต้นข้าวได้รับน้ำอย่างเต็มที่ (Well-watered; WW) และสภาวะขาดน้ำ (Water stress; WS) ดังภาพที่ 3.2

ภาพที่ 3.2 อุปกรณ์และวิธีรม 1-MCP

3. ทำการวิเคราะห์ผลทางสรีรวิทยาและชีวเคมีเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 และค่าการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการชราของใบ (Leaf senescence) ได้แก่ Autophagy-related protein 8a (ATG8a), ATP synthase C chain H, chloroplastic (atpH), Chloroplast vesiculation (CV), Photosynthetic reaction center protein (D1), Photosystem II type I chlorophyll a/b-binding protein complex II subunit B1 (LHCP), Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic (PsbO1), Senescence-inducible chloroplast stay-green protein 1 (SGR) และใช้ Transcription elongation factor (TEF) เป็นยีนอ้างอิง ลำดับเบสตามภาคผนวก ก

การทดลองที่ 4 การศึกษาผลของแบคทีเรีย co-inoculation ของแบคทีเรีย *Bacillus velezensis* strain S141 และ *Bradyrhizobium* sp. strain SUTN 9-2 ต่อความทนแล้งของข้าว

1. ฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวของเมล็ดข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ด้วย 95% ethanol เป็นเวลา 5 นาที และ 3% sodium hypochlorite เป็นเวลา 10 นาที

2. แช่น้ำ RO ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเป็นเวลา 2 วัน เทน้ำออกและบ่มเมล็ดข้าวต่อในขวดในที่มืดอีกจนข้าวงอกรากออกมาประมาณ 1 เซนติเมตร (ใช้เวลาประมาณ 1 วัน)

3. นำเมล็ดข้าวงอกจากขั้นตอนที่ 2 มาแช่ในสารละลายน้ำ RO ของแบคทีเรีย *Bradyrhizobium* SUTN 9-2 และ/หรือ *Bacillus* S141 ที่ OD_{600} = 0.6 (มีจำนวนเซลล์ที่ 10^7 เซลล์/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 1 คืน โดยแบ่งออกเป็น 4 ชุดการทดลองคือ

1. Non-inoculation
2. Single inoculation ของ SUTN 9-2
3. Single inoculation ของ S141
4. Co-inoculation ของ SUTN 9-2 และ S141

4. นำเมล็ดดังกล่าวไปปลูกตามกรรมวิธีเดียวกับการทดลองที่ 1 แต่ให้ไนโตรเจนความเข้มข้มเพียง 100 ppm ในช่วง 1 เดือนแรก แล้วเปลี่ยนเป็น 300 ppm ก่อนออกดอก 7 วัน เนื่องจากต้นข้าวในชุดควบคุมเริ่มแสดงอาการขาดไนโตรเจน

5. ทำการวิเคราะห์ผลทางสรีรวิทยาเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 และ 2

3.5 การบันทึกข้อมูล

3.5.1 วัดอัตราการสังเคราะห์แสง ค่าการตอบสนองของปากใบ และค่าการคายน้ำ โดยใช้เครื่องวัดการสังเคราะห์ด้วยแสง ADC LCi-SD โดยควบคุมปริมาณแสงที่ส่องมาที่ใบ (Q) ให้อยู่ระหว่าง 750 – 800 μmol cm^{-2} s^{-1}

3.5.2 การสกัดและวัดปริมาณคลอโรฟิลล์

a. เก็บใบสดอย่างน้อย 300 มิลลิกรัม ในต้นข้าวอายุ 4 สัปดาห์แล้วแช่ลงในไนโตรเจนเหลวทันที
b. ตัดใบเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ในโกร่ง เติมไนโตรเจนเหลวและบดด้วยสาก
c. แบ่งตัวอย่างประมาณ 500 มิลลิกรัมที่บดแล้วใส่หลอดไมโครเซนติฟิวส์ขนาด 1.5 mศ
d. นำตัวอย่างไป Freeze dry เพื่อกำจัดความคลาดเคลื่อนของตัวอย่างที่อาจจะมีปริมาณน้ำที่แตกต่างกัน
e. ชั่งตัวอย่างประมาณ 50 มิลลิกรัมใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 mL แล้วเติมอะซิโตน 80 % 5 mL
f. สกัดคลอโรฟิลล์โดยการเขย่าหยอดทั้งหมดด้วย shaker ในที่มืดที่ 5°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง
g. ปั่นแยกหลอดที่ 9,500 rpm 10 นาที
h. ดูดสารสกัดปริมาณ 200 μL ใส่ microplate แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสง (A) ของปริมาณคลอโรฟิลล์ โดยใช้ microplate reader ที่ความยาวคลื่น 645 และ 663 นาโนเมตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

i. คำนวณความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ดังนี้ (ใช้อะซิโตน 80 % เป็นตัวควบคุม blank)

ปริมาณ Chlorophyll a

Ca (mg/g) = [12.7xA663 – 2.69xA645] x V/ [1000xW]

ปริมาณ Chlorophyll b

Cb (mg/g) = [22.9xA645 – 4.86xA663] x V/ [1000xW]

ปริมาณ Chlorophyll ทั้งหมด

Ca+b (mg/g) = [8.02xA663 + 20.20xA645] x V/ [1000xW]

เมื่อ V = ปริมาณของสารสกัด (ml) ; W = น้ำหนักของใบสด (g)

3.5.3 การสกัดและวัดปริมาณโปรตีน

a. แบ่งตัวอย่างที่บดด้วยไนโตรเจนเหลวใส่ลงในหลอด microcentrifuge ตัวอย่างละ 50 มิลลิกรัม
b. สกัดด้วย 50 mM Tris-HCl buffer pH 8.0 + 1% triton-100 โดยเขย่าหยอดทั้งหมดด้วย shaker ในที่มืดที่ 5°C เป็นเวลา 1ชั่วโมง
c. Centrifuge ที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที
d. ดูดสารละลายใส (supernatant) ใส่หลอดใหม่ เพื่อใช้ในการวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford (Bradford, 1976) ดังต่อไป
e. เติม dH_2O ลงในหลอด microcentrifuge ที่เตรียมไว้ 780 uL สารสกัด 20 uL และ Bradford reagent (PanReac AppliChem) ปริมาตร 200 ul ลงในหลอดในข้อ 2 ผสมสารละลายในหลอดให้เข้ากันด้วย Vortex
f. ตั้งไว้ในที่มืด 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ 595 nm
g. ทำกราฟมาตรฐานด้วย BSA ความเข้มข้น 0-3 µg/assay
h. คำนวณความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค)

3.5.4 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน

a. สกัด total RNA ด้วย RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) จากตัวอย่างใบข้าวที่บดละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลวแล้ว ตามขั้นตอนของชุด kit

b. ตรวจวัดความเข้มข้นและคุณภาพของ RNA ด้วยเครื่อง nanodrop และเจลอิเล็กโตรโฟไรซิส

c. สังเคราะห์ mRNA ด้วย QuantiNova Reverse Transcription Kit (Qiagen) โดยใช้ RNA template 1 µg ตามวิธีการของชุด kit โดยมีการเพิ่มเวลาในขั้นตอนการกำจัด gDNA จาก 2 นาทีเป็น 5 นาที

d. วิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วย quantitative RT-PCR โดยวิธี $2^{-\Delta\Delta Ct}$ โดยใช้ PowerUp SYBR Green Master Mix (AppiedBiosystem) เปรียบเทียบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการชราของใบ (Leaf senescence) ได้แก่ Autophagy-related protein 8a (ATG8a), ATP synthase C chain H, chloroplastic (atpH), Chloroplast vesiculation (CV), Photosynthetic reaction center protein (D1), Photosystem II type I chlorophyll a/b-binding protein complex II subunit B1 (LHCP), Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic (PsbO1), Senescence-inducible chloroplast stay-green protein 1 (SGR) และใช้ Transcription elongation factor (TEF) เป็นยีนอ้างอิง ลำดับเบสตามภาคผนวก ก

3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของค่าการตอบสนองทางสรีรวิทยาในทุกชุดการทดลอง โดยใช้โปรแกรมสถิติ SPSS v. 21.0 ภายใต้การออกแบบการทดลองแบบสุ่ม Complete randomized design (CRD) และใช้การวิเคราะห์แบบ One-way ANOVA และ Duncan's test

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

การทดลองที่ 1 การศึกษาระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนที่ทำให้ข้าวไทยเจริญเติบโตเต็มที่ในระบบ Hydroponic

เนื่องจากยังไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับการปลูกข้าวไทยในระบบ hydroponic จึงต้องมีการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาปริมาณธาตุอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของต้นข้าว ซึ่งจากการทดลองการปลูกข้าวไทย (*Oryza sativa* L. indica) พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และปทุมธานี 1 ในวัสดุปลูก Perlite: Vermiculite = 1:1 ในกระถางพลาสติกขนาด 2 ลิตร (ภาพที่ 4.1) โดยใช้ปุ๋ยสูตรเดียวกับที่เคยใช้กับข้าวญี่ปุ่น (*Oryza sativa* L. japonica พันธุ์ Kitaake) ซึ่งมีองค์ประกอบคือ ไนโตรเจน (N) 75 ppm, P 20 ppm, K 75 ppm, Ca 27 ppm, Mg 17 ppm, S 65 ppm, Fe 1.50 ppm, Mn 0.50 ppm, Zn 0.05 ppm, Mo 0.01 ppm, Cu 0.02 ppm พบว่าที่ระยะ 2 สัปดาห์หลังย้ายต้นกล้าต้นข้าวไทยทั้ง 2 พันธุ์แสดงอาการใบสีเขียวอ่อนและปลายใบเหลืองจากการขาดไนโตรเจนและแสดงอาการแคระแกร็นไม่แตกกอตามปกติ จึงทำการปรับปริมาณปุ๋ยไนโตรเจนขึ้นเป็น 150 ppm ต้นข้าวก็ยังแสดงอาการใบสีเขียวอ่อนจากการขาดไนโตรเจนเล็กน้อยในข้าวทั้ง 2 พันธุ์ นอกจากนี้ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 เริ่มมีอาการขาดแมกนีเซียมจากการสังเกตเห็นอาการใบที่มีสีเขียวซีดระหว่างเส้นใบและใบแก่เปลี่ยนเป็นสีขาวซีด และบางใบเกิดอาการหยิกงอในสัปดาห์ที่ 4 หลังจากย้ายกล้าปลูก แต่ไม่สังเกตเห็นอาการเหล่านี้ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 จึงเพิ่มปริมาณแมกนีเซียม (Mg) เป็น 32 ppm และ N เป็น 300 ppm พบว่าข้าวทั้ง 2 พันธุ์สามารถเจริญเติบโตได้ดีจนถึงระยะออกดอกโดยข้าวปทุมธานี 1 แตกกอได้ถึง 20-30 ต้นต่อกระถาง (จากต้นกล้าที่ย้ายปลูกเพียง 1 ต้น) และข้าวขาวมะลิ 105 แตกกออยู่ระหว่าง 15-25 ต้นต่อกระถาง ดังนั้นจึงใช้ระดับไนโตรเจน 300 ppm และแม็กนีเซียม 32 ppm ส่วนธาตุอาหารอื่นๆ คงไว้ตามเดิม (P 20 ppm, K 75 ppm, Ca 27 ppm, S 65 ppm, Fe 1.50 ppm, Mn 0.50 ppm, Zn 0.05 ppm, Mo 0.01 ppm, Cu 0.02 ppm) ในการทดลองต่อไป

อภิปรายผลการทดลอง

จากผลการทดลองที่ได้จะเห็นว่าปริมาณไนโตรเจนที่ข้าวไทย (*Oryza sativa* subsp. indica) มีแนวโน้มที่จะใช้ปริมาณไนโตรเจนมากกว่าข้าวญี่ปุ่น (*Oryza sativa* subsp. japonica) (Sade et al., 2017b) ซึ่งก็สอดคล้องกับงานวิจัยของ Chanh et al. (1981) ที่แสดงให้เห็นว่าการดูดไนโตรเจนเข้าไปใช้ (uptake) และการเจริญเติบโตของข้าว indica ที่มากกว่าข้าว japonica รวมทั้งงานวิจัยในระดับชีววิทยาโมเลกุลยังแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ nitrate reductase 2 (*OsNR2*) ที่พบในข้าว indica ยังมีประสิทธิภาพสูงกว่าในข้าว japonica ซึ่งเมื่อทดสอบเพิ่มการแสดงออกของยีน *OsNR2* ของข้าว indica ในข้าว japonica ซึ่งพบว่าเป็นการส่งเสริมการเพิ่มปริมาณผลผลิตในข้าว japonica อีกด้วย

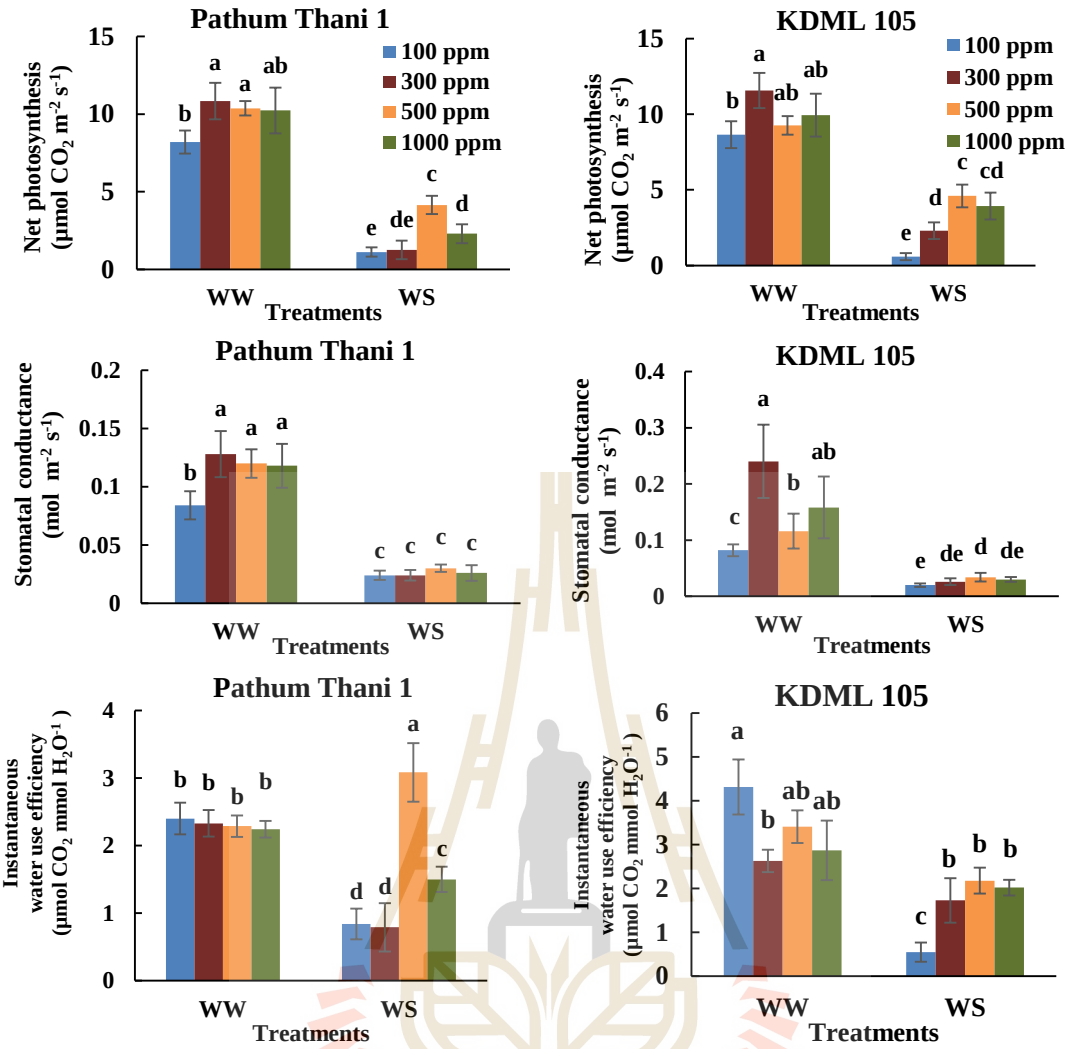
นอกจาก nitrate reductase (NR) จะเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญ (key enzyme) ในกระบวนการสะสมไนโตรเจนในพืช NR ยังมีบทบาทควบคุมการแสดงออกและการทำงานในลักษณะส่งเสริม (feed-forward) ของ nitrate transporter 1.1B (*OsNRT 1.1B*) ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการนำ nitrate ion เข้าสู่เซลล์รากของต้นข้าวอีกด้วย จึงทำให้ข้าว indica ใช้ไนโตรเจนในการเจริญเติบโตมากกว่าข้าว japonica (Zhang and Chu, 2019)

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบระหว่างข้าวไม่ไวแสงอย่างเช่นข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 และ ข้าวไวแสงอย่างเช่นพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 พบว่าข้าวไม่ไวแสงก็มีแนวโน้มใช้ไนโตรเจนมากกว่าข้าวไวแสง ซึ่งสอดคล้องกับคำแนะนำในการใช้ปุ๋ยของกรมการข้าวที่แนะนำให้ใส่ปุ๋ยข้าวไม่ไวแสงในอัตรา 30-35 กิโลกรัม/ไร่ ซึ่งมากกว่าข้าวไวแสงซึ่งแนะนำไว้ที่ 20-25 กิโลกรัม/ไร่ (สำนักวิจัยและพัฒนา กรมการข้าว, 2563)

ภาพที่ 4.1 การทดลองศึกษาระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนที่ทำให้ข้าวไทยเจริญเติบโตเต็มที่ในระบบ Hydroponic ของข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 (ซ้าย) และพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (ขวา)

การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของระดับของปุ๋ยไนโตรเจนที่ให้ในระยะสั้นๆ (nitrogen priming) ก่อนสภาวะขาดน้ำต่อการทนแล้งของข้าวไทย

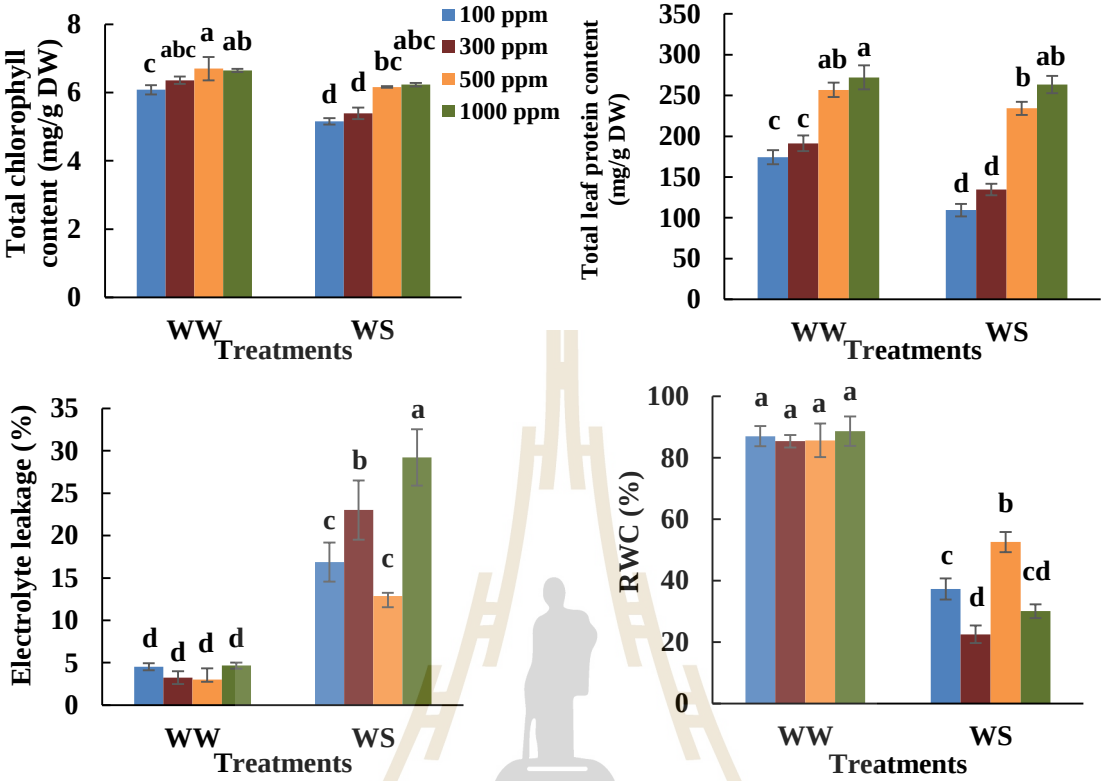
เมื่อใช้อัตราการสังเคราะห์ด้วยแสง ค่าปริมาณน้ำสัมพัทธ์ ปริมาณการรั่วไหลของอิเล็กโตรไลท์ และปริมาณคลอโรฟิลล์เป็นตัวชี้วัดในการทนแล้งของต้นข้าว พบว่า ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ซึ่งเป็นข้าวไม่ไวแสง และข้าวขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นข้าวไวแสงมีการตอบสนองในทิศทางเดียวกันเมื่อได้รับปริมาณไนโตรเจนในระดับที่สูงขึ้น โดยการให้ปริมาณปุ๋ยไนโตรเจนที่ระดับความเข้มข้น 500 ppm ในระยะสั้นๆ ก่อนสภาวะขาดน้ำสามารถเพิ่มอัตราการสังเคราะห์แสงและประสิทธิภาพการใช้น้ำขณะหนึ่งของข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ได้ แต่เพิ่มเฉพาะอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการใช้น้ำขณะหนึ่ง (ภาพที่ 4.2)



ภาพที่ 4.2 การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 (Pathum Thani 1) และขาวดอกมะลิ 105 (KDML 105) เมื่อรับ nitrogen priming ที่ระดับต่างๆ ก่อนการขาดน้ำ แถบแสดงค่าความคลาดเคลื่อนแสดงค่า standard error อักษรที่ต่างกันบนกราฟแต่ละแท่งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p \leq 0.05$ ด้วย one-way ANOVA และ Duncan's test

เนื่องจากข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 มีการตอบสนองทางสรีรวิทยาที่ชัดเจนกว่าข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 จึงนำตัวอย่างใบของข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 มาวิเคราะห์ตัวแปรเสริมอื่นๆ ทางด้านชีวเคมี เช่น ปริมาณคลอโรฟิลล์ ปริมาณโปรตีนทั้งหมดในใบ และการรั่วไหลของอิเล็คโตรไลท์ ซึ่งผลที่ได้มีความสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาต่างๆ อีกด้วย โดยที่ความเข้มข้น 500 ppm N สามารถเพิ่มปริมาณคลอโรฟิลล์ ปริมาณโปรตีนทั้งหมดในใบ และปริมาณน้ำสัมพัทธ์ในใบ (ภาพที่ 4.3) ซึ่งเป็น

ตัวแปรเสริมที่บ่งชี้ถึงการทนแล้งที่เพิ่มขึ้นของข้าวที่ได้รับปุ๋ยไนโตรเจนที่ระดับความเข้มข้น 500 ppm ในระยะสั้นๆ (nitrogen priming) ก่อนสภาวะขาดน้ำ



ภาพที่ 4.3 การเปลี่ยนแปลงทางด้านชีวเคมีและปริมาณน้ำสัมพัทธ์ในใบของข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 เมื่อรับ nitrogen priming ที่ระดับต่างๆ ก่อนการขาดน้ำ กราฟแต่ละแท่งแสดงค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลอง แถบแสดงค่าความคลาดเคลื่อนแสดงค่า standard error อักษรที่ต่างกันบนกราฟแต่ละแท่งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p \leq 0.05$ ด้วย one-way ANOVA และ Duncan's test

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

อภิปรายผลการทดลอง

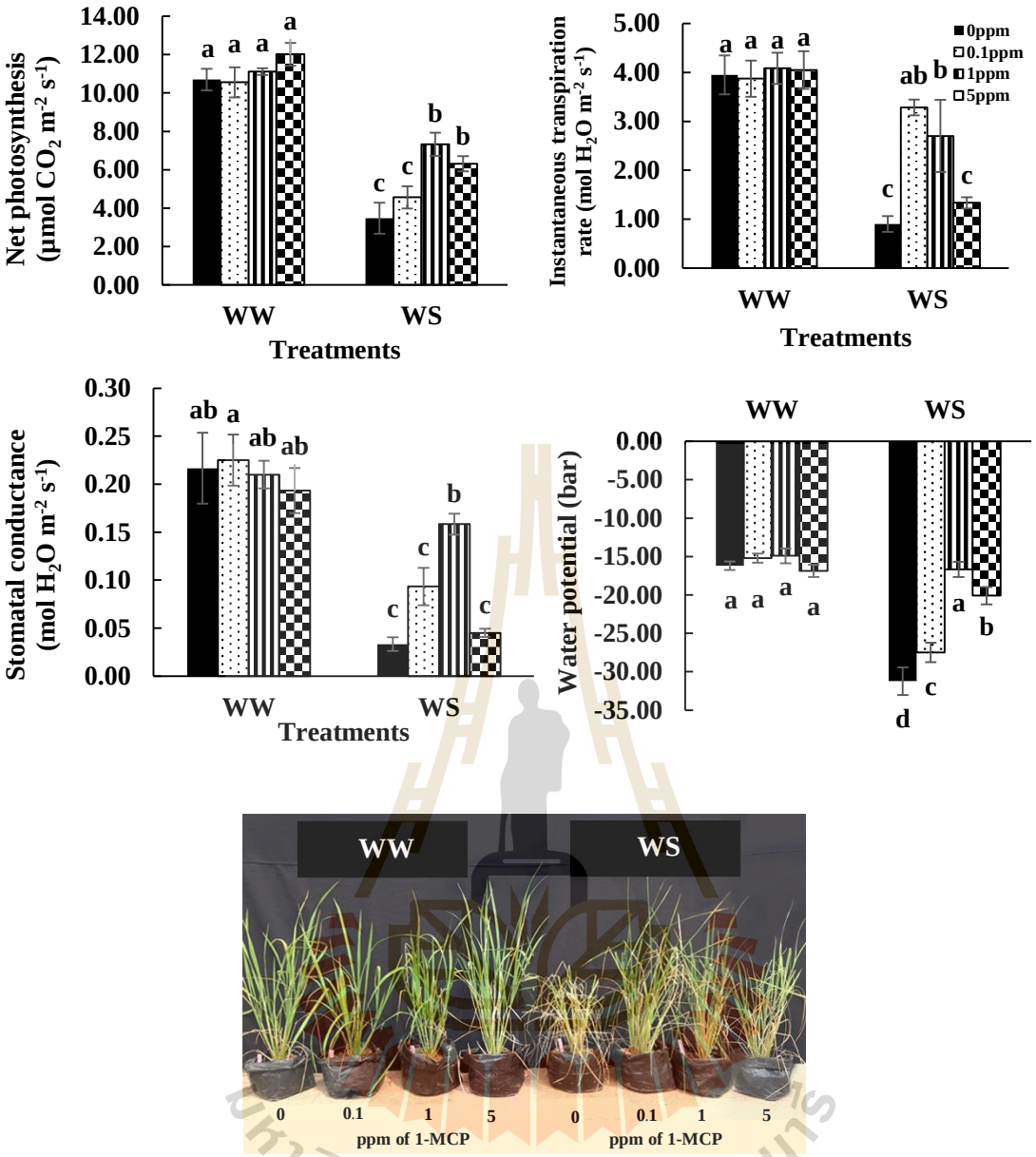
ในระหว่างสภาวะแห้งแล้งต้นข้าวจะมีการตอบสนองในด้านต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นทางด้านสรีรวิทยา ชีวเคมี และการแสดงออกของยีน โดยปกติแล้วในสภาวะขาดน้ำต้นข้าวจะมีการเปลี่ยนแปลงปฐมภูมิการลดความเต่งของใบซึ่งในข้าวนั้นจะเห็นได้ชัดจากการเหี่ยวและม้วน (rolling) ค่าชลศักดิ์ที่ลดลงของใบ และปริมาณน้ำสัมพัทธ์ (relative water content) ของใบที่ลดลง (ภาพที่ 4.2) นอกจากนี้การขาดน้ำยังเหนี่ยวนำให้เกิดการปิดปากใบดังเห็นได้จากค่าเหนี่ยวนำปากใบ (stomata conductance) ที่ลดลง (ภาพที่ 4.2) และการขยายขนาดของใบที่ลดลง ซึ่งจะส่งผลทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อการลดลงของอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสง (ภาพที่ 4.2) การที่ปากใบปิดจะทำให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เข้าสู่เซลล์ได้อย่างจำกัดส่งผลโดยตรงต่อการลดอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสง

รวมทั้งเมื่อต้นข้าวขาดน้ำยังทำให้เกิดการขาดธาตุอาหารจากการดูดซึมด้วยรากที่ลดลงส่งผลทางอ้อมต่อการลดลงของการสังเคราะห์ด้วยแสง (Wang et al., 2018) แต่จากผลการทดลองของโครงการวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าต้นข้าวที่ได้รับปุ๋ยไนโตรเจนความเข้มข้น 500 ppm สามารถชะลอการลดลงของอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงและปริมาณน้ำสัมพัทธ์ในใบ (ภาพที่ 4.2) และมีผลเพิ่มประสิทธิภาพการใช้น้ำในขณะหนึ่งในข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ภายในสภาวะขาดน้ำ แต่ไม่ส่งผลต่อปัจจัยเดียวกันนี้ในข้าวขาวดอกมะลิ 105 ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะอัตราความต้องการปุ๋ยไนโตรเจนในข้าวขาวดอกมะลิ 105 ต่ำกว่าในข้าวปทุมธานี 1 อยู่แล้วดังอภิปรายแล้วในการทดลองที่ 1 จึงทำให้ในสภาวะแล้งการใช้เทคนิค nitrogen priming จึงให้ผลไม่ชัดเจนเท่ากับในข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1

นอกจากนี้ต้นข้าวยังมีการตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำโดยการย่อยอาหารสะสม และโครงสร้างต่างๆ ในเซลล์ เพื่อนำมาใช้เป็นพลังงานและสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารที่จำเป็นต่อการปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อม เช่น การย่อยสลายโปรตีนและคลอโรฟิลล์เพื่อให้ได้พลังงงานและสารประกอบที่มีไนโตรเจนต่างๆ เพื่อนำไปใช้ในการสร้างสารอื่นๆ ที่จำเป็นต่อการปรับตัวในสภาวะขาดน้ำ ซึ่งปริมาณไนโตรเจนที่พบเป็นองค์ประกอบของโปรตีนที่พบในคลอโรพลาสและคลอโรฟิลล์นี้คิดเป็นมากกว่า 70% ของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในใบ (Sade et al., 2017) ดังนั้นการใช้ nitrogen priming ด้วย 500 ppm N จึงเป็นเทคนิคที่ช่วยชะลอการสลายตัวของคลอโรฟิลล์และโปรตีนในใบได้เมื่อเทียบกับต้นข้าวที่ได้รับ high nitrogen priming (ได้ 300 ppm N ซึ่งจัดเป็นชุดควบคุม) (ภาพที่ 4.3) ทั้งนี้ในสภาวะขาดน้ำยังชักนำให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มต่างๆ ภายในเซลล์ดังเห็นได้จากปริมาณการรั่วไหลของสารอิเล็กโตรไลท์ (electrolyze leakage) ซึ่ง high nitrogen priming มีผลชะลอการรั่วไหลนี้ลงเช่นกัน โดยอาจจะเป็นผลจากการเหนี่ยวนำให้มีกระบวนการต้านออกซิเดชั่น (antioxidant defense mechanism) ที่จะช่วยควบคุมการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วของสารกลุ่ม reactive oxygen species เช่นเดียวกับที่มีรายงานว่าการให้ไนโตรเจนสูงแก่ต้นฝ้ายจะชักนำกลไกดังกล่าว (Iqbal et al., 2020)

การทดลองที่ 3 การศึกษาผลของสารยับยั้งการส่งสัญญาณของฮอร์โมนเอทิลีน 1-methylcyclopropene (1-MCP) ต่อการทนแล้งของข้าวไทย

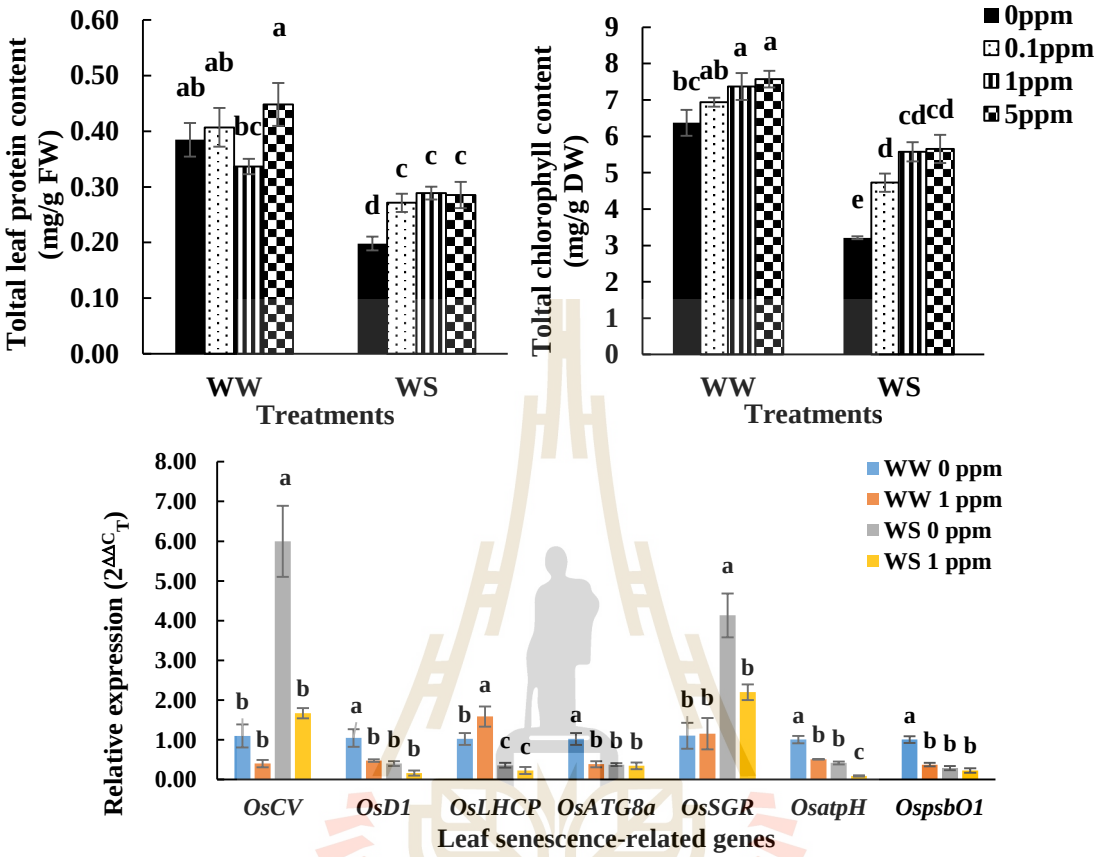
การรมต้นข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ที่เริ่มแสดงอาการขาดน้ำด้วย 1-MCP ซึ่งเป็นสารยับยั้งการตอบสนองต่อเอทิลีนที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 5 ppm ทำให้ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ปรับตัวต่อสภาวะขาดน้ำได้ดีขึ้นโดยมีอัตราการสังเคราะห์แสง ค่าการเหนี่ยวนำปากใบและประสิทธิภาพการใช้น้ำขณะหนึ่งเพิ่มสูงขึ้น รวมทั้งต้นข้าวที่รมด้วย 1 ppm 1-MCP ยังมีค่าชลศักย์ในใบที่ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม (ภาพที่ 4.4)



ภาพที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 (Pathum Thani 1) เมื่อรับ 1-MCP ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ก่อนการขาดน้ำ กราฟแต่ละแท่งแสดงค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลอง แถบแสดงค่าความคลาดเคลื่อนแสดงค่า standard error อักษรที่ต่างกันบนกราฟแต่ละแท่งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p \leq 0.05$ ด้วย one-way ANOVA และ Duncan's test

นอกจากนี้ยังพบว่าการรมด้วยสารยับยั้งการส่งสัญญาณของเอทิลีน 1-MCP ทั้ง 3 ความเข้มข้นมีผลเพิ่มปริมาณโปรตีนและคลอโรฟิลล์ในใบของข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ที่อยู่ในสภาวะขาดน้ำ (WS) แต่

ในสภาวะได้รับน้ำเต็มที่ 1-MCP ไม่มีผลเพิ่มปริมาณโปรตีนในใบของข้าวปทุมธานี 1 แต่ 1-MCP ความเข้มข้น 1 และ 5 ppm สามารถเพิ่มปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดในใบได้ (ภาพที่ 4.5)



ภาพที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีและการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องการการชราของใบของข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 (Pathum Thani 1) เมื่อรับ 1-MCP ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ก่อนการขาดน้ำ แต่ละแท่งแสดงค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลอง แถบแสดงค่าความคลาดเคลื่อนแสดงค่า standard error อักษรที่ต่างกันบนกราฟแต่ละแท่งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p \leq 0.05$ ด้วย one-way ANOVA และ Duncan's test

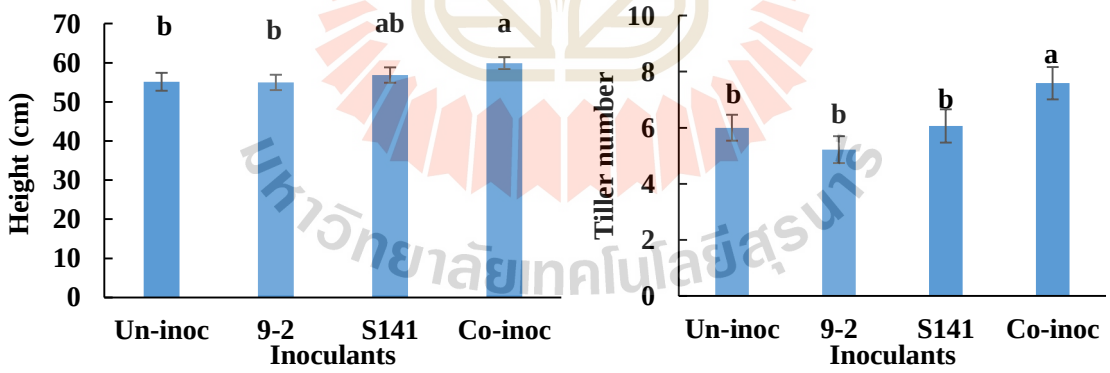
อภิปรายผลการทดลอง

จากการศึกษาผลของ 1-MCP ต่อสภาวะทนแล้งในข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 โดยใช้สาร 1-MCP ความเข้มข้นที่ต่างกัน เปรียบเทียบระหว่างข้าวที่ได้รับน้ำกับข้าวที่ขาดน้ำ ในการวัดการตอบสนองทางสรีรวิทยาพบว่า 1-MCP ที่ความเข้มข้น 1.0 ppm มีผลทำให้อัตราการคายน้ำ ปริมาณโปรตีน และปริมาณคลอโรฟิลล์ มีความใกล้เคียงกับข้าวที่ได้รับน้ำ แต่ในการวัดอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงกับการวัดการเหนี่ยวนำปากใบ 1-MCP ไม่มีผลทำให้ข้าวสามารถสังเคราะห์ด้วยแสงได้ดีและการเหนี่ยวนำปาก

ใบเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวที่ได้รับน้ำ จากงานวิจัยที่ 1-MCP ในการชะลอการเสื่อมสภาพผักกาดขาวปลี โดย 1-MCP จะชะลอการสลายโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ด้วยแสงและการย่อยสลายคลอโรฟิลล์ (Wang et al., 2014) ซึ่งอาจส่งผลให้ข้าวที่ขาดน้ำที่ได้รับ 1-MCP ความเข้มข้น 1 และ 5 ppm สามารถสังเคราะห์แสงได้ในอัตราที่สูงกว่าต้นข้าวที่ไม่ได้รับ 1-MCP (ภาพที่ 4.4) รวมทั้ง 1-MCP ยังมีผลช่วยยับยั้งการปิดปากใบจากสภาวะขาดน้ำ ดังเห็นได้จากค่า stomatal conductance ที่ไม่แตกต่างจากชุดที่ได้รับน้ำตามปกติ (ภาพที่ 4.4) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองใน Arabidopsis ฝ้ายและไม้กระถางที่แสดงให้เห็นว่าการใช้ 1-MCP สามารถยับยั้ง ethylene-induced stomatal closure ได้ (Besufkad and Woltering, 2015; Desikan et al., 2006; Kawakami et al., 2010) โดย Desikan et al. (2006) แสดงให้เห็นว่ากลไกดังกล่าวเกิดผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ในเซลล์คุมด้วยเอนไซม์ nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen (NADPH) oxidase หรือที่เรียกสั้นๆ ว่า AtrbohF

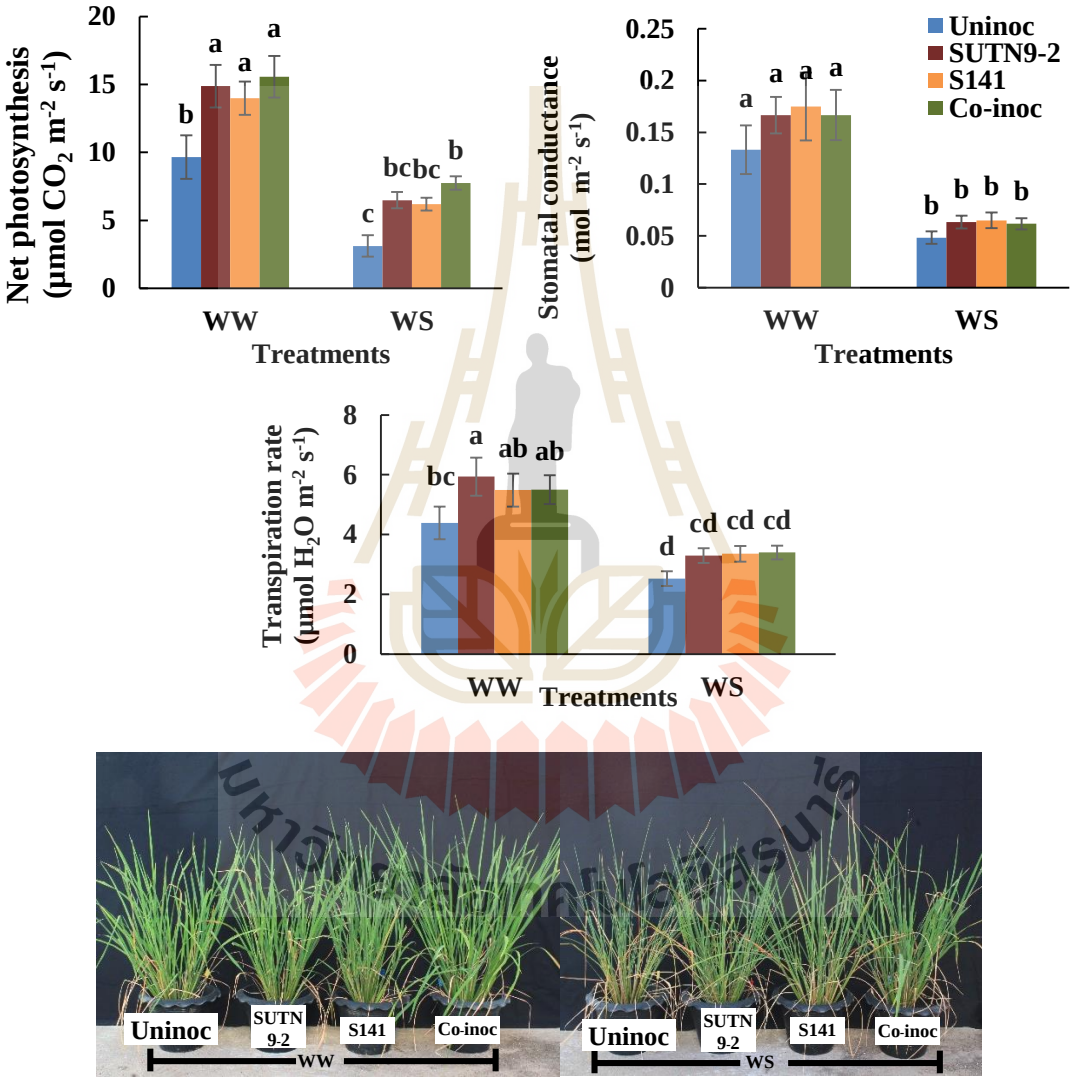
การทดลองที่ 4 การศึกษาผลของแบคทีเรียที่พบในบริเวณรากพืชต่อการทนแล้งของข้าวไทย

จากการทดสอบเบื้องต้นในสภาวะได้รับน้ำเต็มที่พบว่าการปลูกเชื้อด้วยแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดมีผลส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 แต่เมื่อปลูกเชื้อเพียงแค่ชนิดเดียวกลับไม่พบว่าการเจริญเติบโตของต้นข้าวมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับต้นข้าวที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ (ภาพที่ 4.6)



ภาพที่ 4.6 การเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 (Pathum Thani 1) อายุ 8 สัปดาห์ภายหลังการปลูกเชื้อ (inoculated) *Bradyrhizobium* sp. SUTN 9-2 อย่างเดียว (9-2) *Bacillus velezensis* S141 อย่างเดียว (S141) ปลูกเชื้อ SUTN 9-2 และ S141 ร่วมกัน (co-inoc) และไม่ผ่านการปลูกเชื้อ (Uninoc) ในสภาวะที่ได้น้ำสมบูรณ์และสภาวะขาดน้ำ แต่ละแท่งแสดงค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลอง แถบแสดงค่าความคลาดเคลื่อนแสดงค่า standard error อักษรที่ต่างกันบนกราฟแต่ละแท่งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p \leq 0.05$ ด้วย one-way ANOVA และ Duncan's test

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตและการตอบสนองทางสรีรวิทยาพบว่าการปลูกเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN 9-2 อย่างเดียว (SUTN 9-2) *Bacillus velezensis* S141 อย่างเดียว (S141) และการปลูกเชื้อ SUTN 9-2 และ S141 ร่วมกัน (co-inoc) มีผลเพิ่มอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงของข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ที่ไม่ผ่านการปลูกเชื้อ (Uninoc) ในสภาวะที่ได้รับน้ำอุดมสมบูรณ์ แต่ภายใต้สภาวะการขาดน้ำมีเพียงแค่การปลูกเชื้อร่วมของ SUTN 9-2 และ S141 ที่มีผลเพิ่มอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสง (ภาพที่ 4.7)



ภาพที่ 4.7 การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของใบของข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 (Pathum Thani 1) อายุ 12 สัปดาห์ (ระยะสร้างช่อดอก) ภายหลังการปลูกเชื้อ (inoculated) *Bradyrhizobium* sp. SUTN 9-2 อย่างเดียว (SUTN 9-2) *Bacillus velezensis* S141 อย่างเดียว (S141) ปลูกเชื้อ SUTN 9-2 และ S141 ร่วมกัน (co-inoc) และไม่ผ่านการปลูกเชื้อ (Uninoc) ในสภาวะที่ได้น้ำสมบูรณ์และสภาวะขาดน้ำ แต่ละแท่งแสดงค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลอง แถบแสดงค่า

ความคลาดเคลื่อนแสดงค่า standard error อักษรที่ต่างกันบนกราฟแต่ละแท่งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p \leq 0.05$ ด้วย one-way ANOVA และ Duncan's test

อภิปรายผลการทดลอง

การนำแบคทีเรียที่มี ACC deaminase activity มาใช้ในการเพิ่มผลผลิตและเพิ่มความทนทานต่อสภาวะเครียดของพืชนั้นมีการศึกษามาแล้วหลายสิบปี โดยแบคทีเรียที่อยู่มาใช้ในการทดลองนี้คือ *Bradyrhizobium* sp. strain SUTN 9-2 (SUTN 9-2) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบในนาข้าวของประเทศไทยและมีความสามารถในการเข้าสู่รากของต้นข้าวและอาศัยอยู่ทั้งในบริเวณ intercellular space และบริเวณผนังเซลล์ของข้าว ซึ่งจัดเป็น endophyte ที่พบมากในบริเวณกาบใบและราก (Piromyou et al., 2015a) และส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวได้เป็นอย่างดีโดยเฉพาะช่วง 7 วันแรกหลังจากปลูกเชื้อแล้ว (Greetatorn et al., 2019) ซึ่งจากผลการทดลองในโครงการนี้ที่วัดการเจริญเติบโตที่ 8 สัปดาห์จากความสูงและจำนวนต้นต่อกอ พบว่าการเจริญเติบโตของข้าวที่ได้รับการปลูกเชื้อ SUTN 9-2 เพียงชนิดเดียวไม่มีความแตกต่างจากชุดควบคุมซึ่งไม่มีการปลูกเชื้อ ความแตกต่างนี้อาจจะเป็นเพราะผลของความแตกต่างที่เกิดจาก SUTN 9-2 ไม่ว่าจากการตรึงไนโตรเจนหรือปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตมีผลชัดเจนเพียงระยะแรกของการเจริญเติบโตเท่านั้น ส่วน *Bacillus velezensis* strain S141 (S141) ยังไม่มีการทดลองในข้าว ส่วนการทดลองในถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 นั้น Sibponkrung et al. (2020) พบว่าเมื่อปลูกเชื้อ S141 ร่วมกับ *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 ซึ่งเป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงและใช้กันอย่างกว้างขวางในถั่วเหลือง ถั่วเหลืองมีการสร้างปมรากมากขึ้น ปมรากมีขนาดใหญ่ขึ้น มีการตรึงไนโตรเจนมากขึ้นและสามารถเจริญเติบโตได้ดีขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในโครงการนี้ที่เมื่อปลูกเชื้อ S141 ร่วมกับ SUTN 9-2 สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์ด้วยแสงของข้าวได้ดีทั้งในสภาวะควบคุม (ได้รับน้ำ) และสภาวะขาดน้ำ ซึ่งการทดลองนี้ควรมีการทดลองซ้ำและศึกษากลไกที่เกี่ยวข้องต่อไป

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

5.1 สรุปผลการวิจัย

การให้ปุ๋ยไนโตรเจนความเข้มข้นสูงก่อนเข้าสู่สภาวะแล้ง (nitrogen priming) มีผลส่งเสริมความทนแล้ง โดยความเข้มข้นที่ให้ผลดีที่สุดคือ 500 ppm ไนโตรเจน (NH_4:NO_3 ในอัตรา 1:1) ซึ่งจะช่วยรักษาปริมาณคลอโรฟิลล์ ปริมาณโปรตีนและปริมาณน้ำสัมพัทธ์ในใบ ให้ใกล้เคียงกับสภาวะได้รับน้ำอุดมสมบูรณ์ และลดการรั่วไหลของอิเล็กโตรไลท์ ซึ่งแสดงถึงความทนทานต่อสภาวะแห้งแล้งที่มากกว่าเมื่อต้นข้าวไม่ได้รับ nitrogen priming

นอกจากนี้การได้รับสารยับยั้งการส่งสัญญาณของฮอร์โมนเอทิลีนซึ่งเป็นฮอร์โมนที่เร่งการแก่ชราของพืชผักผลไม้ต่างๆ ยังมีฤทธิ์ 1-methylcyclopropene (1-MCP) ในระยะเริ่มต้นของสภาวะแห้งแล้งมีผลส่งเสริมให้ต้นข้าวสามารถทนแล้งได้มากขึ้นโดยอาจจะไปยับยั้งกระบวนการสลายคลอโรฟิลล์และคลอโรพลาสต์ที่สำคัญของเซลล์ โดยการลดการแสดงออกของยีน Stay green (SGR) และ Chloroplast vesiculation (CV)

เมื่อพิจารณาถึงผลการทดลองที่ได้สรุปแล้วข้างต้นจึงเห็นชัดว่าทั้งปริมาณไนโตรเจนที่เพิ่มสูงขึ้นและการลดการตอบสนองต่อฮอร์โมนเอทิลีนจึงมีความสำคัญเป็นอย่างมากในการกระตุ้นให้เกิดการทนแล้งของต้นข้าวซึ่งวิธีหนึ่งที่เป็นการผนวกทั้ง 2 กลวิธีนี้เข้าด้วยกันคือการปลูกเชื้อแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช สามารถตรึงไนโตรเจนและผลิตเอนไซม์ ACC deaminase ซึ่งจะทำหน้าที่ควบคุมการผลิตเอทิลีน เช่น *Bradyrhyzobium* sp. SUTN 9-2 ร่วมกับแบคทีเรียที่สามารถผลิตฮอร์โมนส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เช่น *Bacillus velezensis* S141 ซึ่งการปลูกเชื้อร่วมนี้นอกจากจะส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าวภายใต้สภาวะได้รับน้ำแล้วยังช่วยเพิ่มอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงภายใต้สภาวะขาดน้ำอีกด้วย ซึ่งไม่พบการส่งเสริมนี้ในต้นข้าวที่ได้รับการปลูกเชื้อเดี่ยวหรือไม่ได้รับการปลูกเชื้อ

5.2 ข้อเสนอแนะ

ควรมีการทดสอบในแปลงนาเพื่อให้แน่ใจว่าเป็นวิธีที่ได้ผลจริงในสภาวะที่มีความแปรปรวนสูงขึ้น โดยในการทำ nitrogen priming ให้กับต้นข้าวนั้นถ้ามีการให้ปุ๋ยไนโตรเจนทางใบได้นั้นจะมีความเหมาะสมมากกว่าการให้ปุ๋ยทางรากในงานวิจัยนี้เนื่องจากการปลูกในดินเมื่อใส่ปุ๋ยแล้วปุ๋ยจะตกค้างเป็นระยะเวลานานไม่สามารถเปลี่ยนความเข้มข้นได้ฉับพลันเหมือนในการทดลอง ส่วนการใช้ 1-MCP ซึ่งมีสถานะเป็นแก๊สเช่นเดียวกับการทดลองจะมีความยุ่งยากในการใช้ในแปลงนา การใช้ 1-MCP ในรูปที่ฉีดพ่นในรูปสารละลายได้จะมีความเหมาะสมกว่า แต่ในปัจจุบันนี้ยังไม่มีการผลิตหรือจำหน่าย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ในไทย ส่วนการใช้แบคทีเรีย *Bradyrhyzobium* sp. ร่วมกับแบคทีเรียที่ *B. velezensis* นั้นมีความเหมาะสมมากกว่าในสภาพแปลงนาเนื่องจากง่ายและสะดวกต่อการจัดการแปลงนา รวมทั้งยังให้ผลที่ค่อนข้างดีทั้งต่อการเจริญเติบโตและความทนแล้งของต้นข้าวในระยะก่อนออกดอก การใช้แบคทีเรียที่มีการปรับปรุงประสิทธิภาพในการสลาย ACC ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของเอทิลีนอาจจะทำให้ความทนทานต่อความแห้งแล้งที่พบมีประสิทธิภาพดีขึ้น รวมทั้งควรมีการประเมินผลผลิตจากกลวิธีต่างๆ เหล่านี้ด้วย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บรรณานุกรม

ประชาชาติธุรกิจ. 2561. พืชศก. อ่วม 19จังหวัดวิกฤตแล้ง สุพรรณ-โคราชขาดน้ำ 5 แสนไร่. 5 ตุลาคม 2561.

สถาบันสารสนเทศทรัพยากรน้ำและการเกษตร. 2557. บันทึกเหตุการณ์ภัยแล้งปี 2556/2557.

สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์. 2548. ชีววิทยาพืช. ศูนย์หนังสือมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย. 2561. ผลผลิตข้าว ปี 2556-2561.

สำนักวิจัยและพัฒนา กรมการข้าว. 2563. กิจกรรมหลักที่ 5. การใส่ปุ๋ยและปรับปรุงดิน. ออนไลน์ http://www.ricethailand.go.th/Rkb/manual/index.php-file=content.php&id=47.htm

Bradford, MM (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal. Biochem. 72: 248-254

Beltrano, J., Ronco, M., Montaldi, E., 1999. Drought stress syndrome in wheat is provoked by ethylene evolution imbalance and reversed by rewatering, aminoethoxyvinylglycine, or sodium benzoate. J. Plant Growth Regul. 18:59–64.

Besufkad, A., Woltering, E., 2015. Ethylene , 1-MCP and the Anti-Transpirant Effect of Active Compound-Film Forming Blend. J. Hortic. 2, 2–5. https://doi.org/10.4172/2376-0354.1000153.

Chaintreuil, M., Giraud, E., Prin, Y., Lorquin, J., Ba, A., Gillis, M., Lajudie, P.D.E., Dreyfus, B., 2000. Photosynthetic Bradyrhizobia Are Natural Endophytes of the African Wild Rice Oryza breviligulata 66, 5437–5447.

Chanh, T., Tsutsumi, M., Kurihara, K., 1981. Comparative study on the response of indica and japonica rice plants to ammonium and nitrate nitrogen. Soil Sci. Plant Nutr. 27, 83–92. https://doi.org/10.1080/00380768.1981.10431257.

DaMatta, F., Loos, R.A., Silva, E.A., Loureiro, M.E., Ducatti, C., 2002. Effects of soil water déficit and nitrogen nutrition on water relations and photosynthesis of pot-grown Coffea canephora Pierra. Trees 16, 555-558.

Desikan, R., Last, K., Harrett-williams, R., Tagliavia, C., Harter, K., Hooley, R., Hancock, J.T., Neill, S.J., 2006. Ethylene-induced stomatal closure in Arabidopsis occurs via AtrbohF-mediated hydrogen peroxide synthesis. Plant J. 47, 907–916. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02842.x.

Dimkpa, C., Weinand, T., Asch, F., 2009. Plant – rhizobacteria interactions alleviate abiotic. Plant, Cell Environ. 1682–1694. https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02028.x

Dobermann, A., Fairhurst, T., 1999. Field handbook. Nutritional disorders and nutrient management in Rice. IRRI, PPI/PPIC.

Greetatorn, T., Hashimoto, S., Sarapat, S., Tittabutr, P., Boonkerd, N., Uchiumi, T., Teaumroong, N., 2019. Empowering rice seedling growth by endophytic Bradyrhizobium sp. SUTN9-2. Lett. Appl. Microbiol. 68, 258–266. https://doi.org/10.1111/lam.13114.

Gregersen, P.L., Culetic, A., Boschian, L., Krupinska, K., 2013. Plant senescence and crop productivity. Plant Mol. Biol. 82, 603–622. https://doi.org/10.1007/s11103-013-0013-8.

Hussain, S., Zhong, C., Bai, Z., Cao, X., Zhu, L., Hussain, A., Zhu, C., 2018. Effects of 1-Methylcyclopropene on Rice Growth Characteristics and Superior and Inferior Spikelet Development Under Salt Stress. J. Plant Growth Regul. https://doi.org/10.1007/s00344-018-9800-4.

Iqbal, A., Dong, Q., Wang, X., Gui, H., Zhang, H., Zhang, X., Song, M., 2020. High Nitrogen Enhance Drought Tolerance in Cotton through Antioxidant Enzymatic Activities, Nitrogen Metabolism and Osmotic Adjustment Asif. Plants 9, 1–22.

Jagadish, K.S. V, Kavi Kishor, P.B., Bahuguna, R.N., von Wirén, N., Sreenivasulu, N., 2015. Staying Alive or Going to Die During Terminal Senescence-An Enigma Surrounding Yield Stability. Front. Plant Sci. 6, 1070. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01070.

Kawakami, E.M., Oosterhuis, D.M., Snider, J.L., 2010. Physiological Effects of 1-Methylcyclopropene on Well-Watered and Water-Stressed Cotton Plants. J. Plant Growth Regul. 29, 280–288. https://doi.org/10.1007/s00344-009-9134-3.

Mohammed, A.R., Cothren, J.T., Chen, M., Tarpley, L., 2015. 1-Methylcyclopropene (1-MCP) -Induced Alteration in Leaf Photosynthetic Rate , Chlorophyll Fluorescence , Respiration and Membrane Damage in Rice (*Oryza sativa* L .) Under High Night Temperature 201, 105–116. https://doi.org/10.1111/jac.12096.

Mueller, K.E., 1980. Field Problems of tropical Rice. IRRI. Miley, W.N., Huey, B. and Helms, R. Growing Rice on Alkaline Soils. Cooperative extension Service, Univ. of Arkansas. USDA. EL470.

Piao, Z., Cui, Z., Yin, B., Hu, J., Zhou, C., Xie, G., Su, B., Yin, S., 2005. Changes in acetylene reduction activities and effects of inoculated rhizosphere nitrogen-fixing bacteria on rice. Biol. Fertil. Soils 41, 371–378. https://doi.org/10.1007/s00374-005-0860-9.

Piromyou, P., Greetatorn, T., Teamtisong, K., Okubo, T., Shinoda, R., Nuntakij, A., Ni, L., Thani, P., 2015a. Preferential Association of Endophytic Bradyrhizobia with Different Rice Cultivars and Its Implications for Rice Endophyte Evolution. Appl. Environ. Microbiol. 81, 3049–3061. https://doi.org/10.1128/AEM.04253-14.

Piromyou, P., Greetatorn, T., Teamtisong, K., Okubo, T., Shinoda, R., Nuntakij, A., Tittabutr, P., Boonkerd, N., Minamisawa, K., Teaumroong, N., Ratchasima, N., Equipment, T., Ratchasima, N., 2015b. Preference of endophytic bradyrhizobia in different rice cultivars and the implication of rice endophyte evolution Downloaded from http://aem.asm.org/ on October 29 , 2018 by guest Downloaded from http://aem.asm.org/ on October 29 , 2018 by guest. Appl. Environ. Microbiol. https://doi.org/10.1128/AEM.04253-14.

Sade, N., del Mar Rubio-Wilhelmi, M., Umnajkitikorn, K., Blumwald, E., 2017a. Stress-induced senescence and plant tolerance to abiotic stress. J. Exp. Bot. 1–9. https://doi.org/10.1093/jxb/erx235.

Sade, N., Umnajkitikorn, K., Rubio Wilhelmi, M. del M., Wright, M., Wang, S., Blumwald, E., 2017b. Delaying chloroplast turnover increases water-deficit stress tolerance through the enhancement of nitrogen assimilation in rice. J. Exp. Bot. https://doi.org/10.1093/jxb/erx247

Saneoka, H., Moghaieb, R.E.A., Premachandra, G.S., Fujita, K., 2004. Nitrogen nutrition and water stress effects on cell membrane stability and leaf water relations in *Agrostis palustris* Huds. Environ. Exp. Bot. 52, 131-138.

Sibponkrung, S., Kondo, T., Tanaka, K., Tittabutr, P., Boonkerd, N., Yoshida, K.I., Teaumroong, N., 2020. Co-inoculation of bacillus velezensis strain s141 and bradyrhizobium strains promotes nodule growth and nitrogen fixation. Microorganisms 8. https://doi.org/10.3390/microorganisms8050678.

Silva, E.C. da, Nogueira, R.J.M.C., Silva, M.A. da, Albuquerque, M.B. de, 2011. Drought Stress and Plant Nutrition, in: Plant Stress. pp. 32–41.

Vurukonda, S.S.K.P., Vardharajula, S., Shrivastava, M., SkZ, A., 2016. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. Microbiol. Res. 184, 13–24. https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.12.003.

Wang, Y., Zhang, L., Zhu, S., 2014. Postharvest Biology and Technology associated with changes in Tsai Tai (*Brassica chinensis*) leaves during low temperature storage. Postharvest Biol. Technol. 87, 120–125. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.08.016.

Wang, Z., Li, G., Sun, H., Ma, L., Guo, Y., Zhao, Z., Gao, H., Mei, L., 2018. Effects of drought stress on photosynthesis and photosynthetic electron transport chain in young apple tree leaves. Biol. Open 7, 1–9. https://doi.org/10.1242/bio.035279.

Wu, F.Z., Bao, W.K., Li, F.L., Wu, N., 2008. Effects of water stress and nitrogen supply on leaf gas exchange and fluorescence parameters of Sophora davidii seedlings. Photosynthetica 46, 40-48.

Zhang, Z., Chu, C., 2019. Nitrogen-Use Divergence Between Indica and Japonica Rice: Variation at Nitrate Assimilation. Mol. Plant 13, 6–7. https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.11.011.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก ก

รายชื่อไพรเมอร์ (Primer) และลำดับเบส

ที่ใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วย qPCR

GENE NAME	ACCESION NUMBER	PRIMER	PRIMER SEQUENCE
Autophagy-related protein 8a (ATG8a)	LOC_Os07g32800	Forward	TCGTTGAGAAGGCTGACAAGACC
		Reverse	AGATCAGCAGGGACAAGGTACTTC
ATP synthase C chain H, chloroplastic (atpH)	LOC_Os10g21230.1	Forward	TGCTTCCCGCCCTTTGTTTAGG
		Reverse	CTCGTTTGACCTGTGAAAGACCTC
Chloroplast vesiculation (CV)	LOC_Os05g49940	Forward	GGCTGCTTCTCCCTCTAAACG
		Reverse	CAAATGCCATGCTCGATCGTG
Photosynthetic reaction center protein (D1)	LOC_Os04g16770.1	Forward	TACGTGTGCTTGGGAGTCCTTG
		Reverse	TCGGTGCTAGTTATCCAGTTGCAG
Photosystem II type I chlorophyll a/b-binding protein complex II subunit B1 (LHCP)	LOC_Os09g17740	Forward	TTCTCCATGTTCGGCTTCTT
		Reverse	CAGGCGTTGTTGTTGACG
Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic (PsbO1)	LOC_Os01g31690	Forward	AGAACGTCAAGAACGCCTCGTC
		Reverse	TTGCTCTTGGTGACGCTCAACG

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

GENE NAME	ACCESION NUMBER	PRIMER	PRIMER SEQUENCE
Senescence-inducible chloroplast stay-green protein 1 (SGR)	LOC_Os09g36200	Forward	ACGCATGCAATGTCGCCAAATG
		Reverse	GAGCTGAGCTAAATGCCACTACG
Transcription elongation factor (TEF)	LOC_Os03g08020	Forward	GACCCGTGAGCACGCTCTT
		Reverse	TGGCATCCATCTTGTTGCA

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก ข

อาหารและสภาวะที่ใช้เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus velezensis* strain S141 และ *Bradyrhizobium* sp. strain SUTN 9-2

อาหารและสภาวะที่ใช้เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus velezensis* strain S141

- เลี้ยงในอาหาร LB ที่ 37 องศาเซลเซียส
- องค์ประกอบของอาหาร LB 1 ลิตร
    - Typtone 10 กรัม
    - Yeast extract 5 กรัม
    - NaCl 5 กรัม

    ปรับ pH ให้ได้ 7.4 ด้วย HCl หรือ NaOH

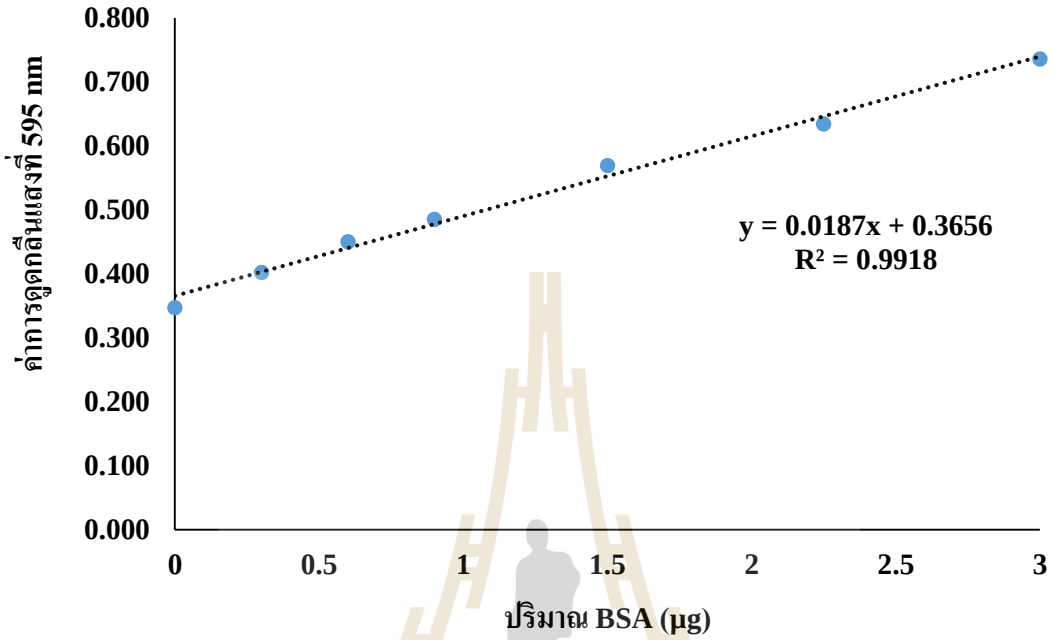
อาหารและสภาวะที่ใช้เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Bradyrhizobium* sp. strain SUTN 9-2

- เลี้ยงในอาหาร YM ที่ 28-30 องศาเซลเซียส
- องค์ประกอบของอาหาร YM 1 ลิตร
    - Mannitol 10 กรัม
    - Yeast extract 1 กรัม
    - Sodium glutamate 0.5 กรัม
    - NaCl 0.5 กรัม
    - K_2HPO_4 0.5 กรัม
    - $MgCl_2 \cdot 7H_2O$ 1 กรัม
    - $CaCl_2 \cdot 7H_2O$ 0.4 กรัม
    - $FeCl_3$ 0.04 กรัม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

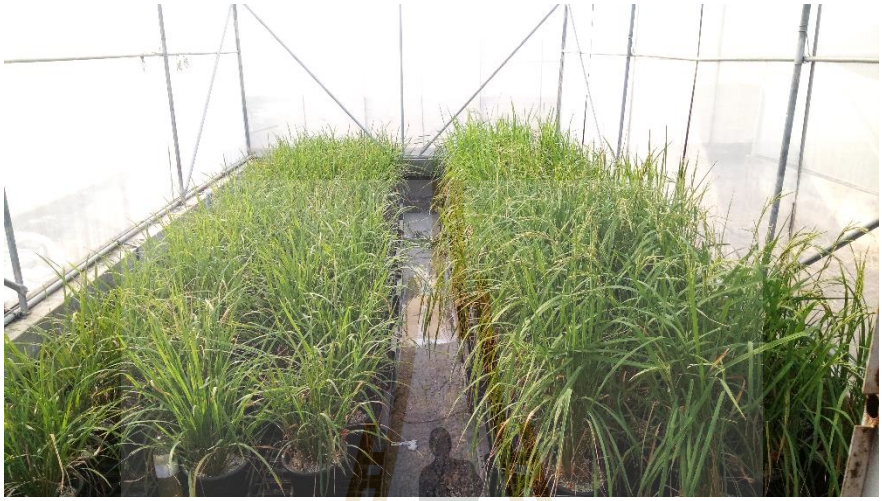
ภาคผนวก ค

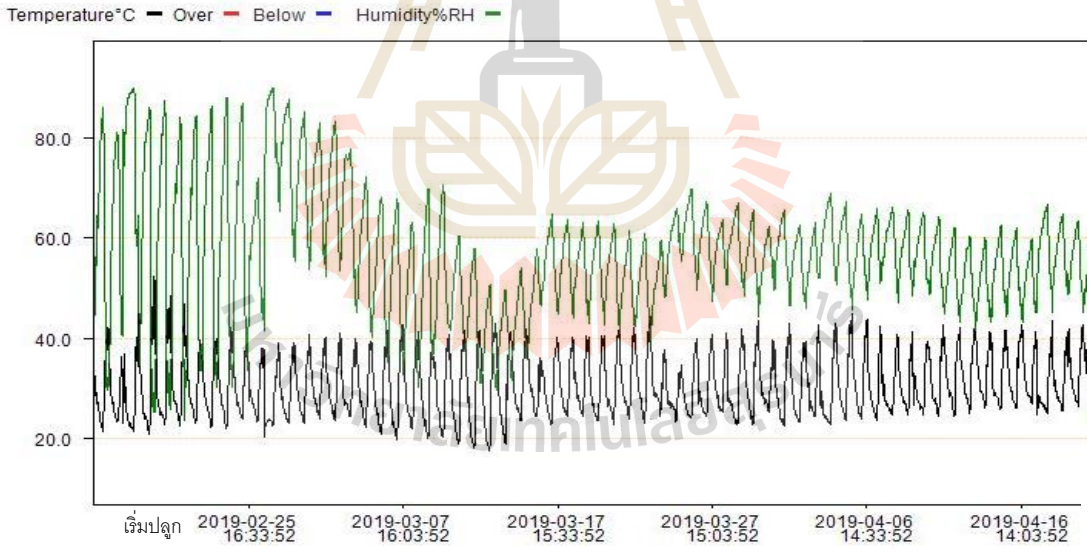
กราฟมาตรฐานปริมาณโปรตีน Bovine serum albumin (BSA)



มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

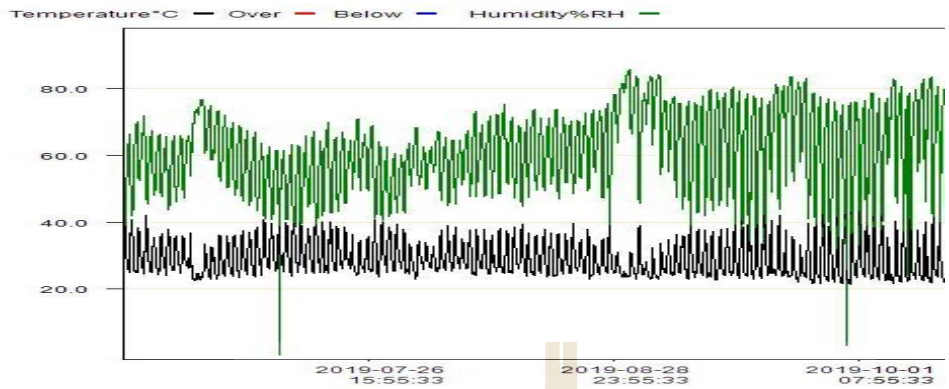
ภาคผนวก ง
สภาวะแวดล้อมภายในโรงเรือนปลูกข้าว
การทดลองที่ 2 ในระยะสร้างช่อดอกของต้นข้าว (2 เดือนหลังย้ายปลูก)



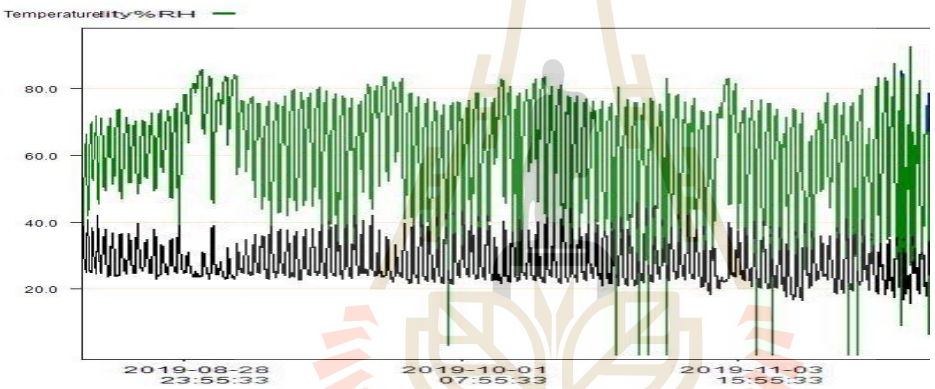


จบการทดลองในระยะออกดอก

ความชื้นและอุณหภูมิภายในโรงเรือนปลูกข้าวการทดลองที่ 3



ความชื้นและอุณหภูมิภายในโรงเรือนปลูกข้าวการทดลองที่ 4



มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวกมลชนก อำนาจกิติกร

   ชื่อ -นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Kamolchanok Umnajkitikorn

2. เลขหมายบัตรประจาตัวประชาชน 1-5299-00392-43-8

3. ตำแหน่งปัจจุบัน

   -ตำแหน่งบริหาร -

   -ตำแหน่งทางวิชาการ อาจารย์

4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

   สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

   111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000

   โทรศัพท์ (044) 223706 โทรสาร (044) 224281

   e-mail k.umnajkitikorn@g.sut.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

   2018 **Ph.D. in Horticulture and Agronomy**, University of California, Davis, USA

   2012 **Bachelor of Science (Biology, First Class Honor)** Chiang Mai University, Chiang Mai, THAILAND

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

   Plant physiology, molecular biology, biochemistry, proteomic analysis

7. ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติและนานาชาติ

   Sarapat S, Songwattana P, Longtonglang A, **Umnajkitikorn K**, Girdthai T, Tittabutr P, Boonkerd N, Teaumroong N (2020) Effects of increasing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase activity in Bradyrhizobium sp. SUTN9-2 on mung bean symbiosis under water deficit condition. *Microbes Environ* 35: ME20024.

   Umnajkitikorn K, Sade N, Rubio Wilhelmi MM, Blumwald, E (2020). Silencing of *OsCV* (*CHLOROPLAST VESICULATION*) Maintained Photorespiration and N-assimilation in Rice Plants Grown under Elevated CO_2. Plant Cell Environ. doi: 10.1111/pce.13723

Umnajkitikorn K*, Sade N*, Rubio Wilhelmi MM, Wright M, Wang S, Blumwald, E (2017). Delaying chloroplast turnover increases water-deficit stress tolerance through the enhancement of nitrogen assimilation in rice. J. Exp. Bot. doi:10.1093/jxb/erx247.

Sade N, Rubio Wilhelmi MM, **Umnajkitikorn K**, Blumwald, E (2017). Stress-induced senescence and plant stress tolerance. J. Exp. Bot. doi:10.1093/jxb/erx235.

Umnajkitikorn K, Faiyue B, Saengnil K (2013) Enhancing Antioxidant Properties of Germinated Thai rice (*Oryza sativa* L.) cv. Kum Doi Saket with Salinity. J Rice Res 1:103. doi: 10.4172/jrr.1000103

8. งานวิจัยที่กำลังทำ :

1. ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย) การจัดการดิน ปุ๋ยและน้ำอย่างแม่นยำสำหรับระบบเกษตรอินทรีย์ที่มีมันสำปะหลังเป็นพืชหลัก

(ภาษาอังกฤษ) Precision soil, fertilizer, and water management for organic farming systems with cassava as the main crop

แหล่งทุน สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) (สวก.)

สถานภาพในการทำวิจัย ผู้ร่วมวิจัย งานวิจัยลุล่วงไปแล้ว 5%

ปีที่เริ่มต้นและสิ้นสุด เมษายน 2563 – เมษายน 2564

2. ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย) การควบคุมแมลงศัตรูข้าวเปลือกและวิเคราะห์คุณภาพในการผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวด้วยคลื่นความถี่วิทยุเพื่อการผลิตข้าวอินทรีย์แปลงใหญ่

(ภาษาอังกฤษ) Insect pest management and rice seed quality evaluation by using the radio frequency for large-scale organic rice production

แหล่งทุน สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) (สวก.)

สถานภาพในการทำวิจัย หัวหน้าโครงการ งานวิจัยลุล่วงไปแล้ว 5%

ปีที่เริ่มต้นและสิ้นสุด พฤษภาคม 2563 – พฤษภาคม 2564