

ผลของปุ๋ยไนโตรเจนต่อปริมาณสารโพรลีน ผลผลิต องค์ประกอบผลผลิต คุณภาพเมล็ด และการแสดงออกของยีนในข้าวหอมพันธุ์พื้นเมืองไทย

Effects of Nitrogen Fertilizer on Proline Content, Yield, Yield Components, Grain Quality, and Gene Expression in Thai Fragrant Rice Landrace

นันทนพิน ปันธิ¹ ศันสนีย์ จำจด^{1,2} ชนกานต์ เทโบลต์ พรหมอุทัย^{1,2}
เพ็ญภา จักรสมศักดิ์³ และ ต่อนภา พุสดี^{1,2*}

Nunnaphin Puntti¹, Sansanee Jamjod^{1,2}, Chanakan Thebault Prom-u-thai^{1,2},
Pennapa Jaksomsak³ and Tonapha Pusadee^{1,2*}

¹ภาควิชาพืชศาสตร์และปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

¹Department of Plant and Soil Sciences, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

²ศูนย์วิจัยข้าวล้านนา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

²Lanna Rice Research Center, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

³สาขาวิชาเกษตรเคมี คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ. เชียงใหม่ 50290

³Program in Agricultural Chemistry, Faculty of Agricultural Production, Maejo University, Chiang Mai 50290, Thailand

*Corresponding author: Email: tonapha.p@cmu.ac.th

(Received: 10 November 2021; Accepted: 7 February 2022)

Abstract: Fragrant rice landraces are genetically diverse, have a high ability to adapt to local environments and some varieties are fragrant rice. Aroma is an important characteristic of grain quality and is due to 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) which is derived from proline. Factors such as the environment, cultivation method, and post-harvest management can affect the aroma of fragrant rice. Therefore, the objective of this research was to evaluate effects of nitrogen (N) application rate on proline contents in leaves at three growth stages (tillering, booting, and flowering), yield, yield components, seed quality and expression of *badh2* and *TPI* genes in Thai fragrant rice landraces, Buer Ner Moo 4 (BNM4). The pot experiments were conducted in a completely randomized design (CRD) with 6 N fertilizer rate (30, 60, 90, 120, 150, and 180 kgN/rai) and 3 replications. Urea was used as source of N fertilizer. The results demonstrated that application N fertilizer at booting led to the highest proline content at the rate of 180 kgN/rai (2.41 μ mol/g fresh weight) compared to application of N fertilizer at the other growth stages. Furthermore, increasing the rate of N fertilizer increased the yield and yield components of rice. A sensory test for aroma revealed that BNM4 supplied with 60 kgN/rai had the highest aroma, while at 150 kgN/rai is non fragrant. The increase in N fertilizer supply did not affect the softness of rice grain as determined by the alkali test. The expression of *badh2* and *TPI* genes from the samples at the 5 days after the anthesis, the highest at 30 and 120 kgN/rai, respectively. This data could be

useful for cultivation management for enhancing the aroma and productivity of the fragrant rice landraces in the future.

Keywords: Buer Ner Moo 4, nitrogen fertilizer rate, grain quality, fragrant rice

บทคัดย่อ: ข้าวพันธุ์พื้นเมืองมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมตามท้องถิ่นได้ดี บางสายพันธุ์มีกลิ่นหอม ซึ่งเป็นหนึ่งในลักษณะคุณภาพเมล็ดที่สำคัญต่อการบริโภค โดยความหอมเกิดจากสาร 2-acetyl-1-pyrroline ซึ่งมีสารตั้งต้นจากโปรลีน ที่สร้างขึ้นจากการได้รับผลกระทบจากปัจจัยด้านสภาพแวดล้อม วิธีการเพาะปลูก และการจัดการหลังการเก็บเกี่ยวก็มีผลต่อความหอมในข้าวหอม งานวิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินผลของอัตราการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนต่อปริมาณสารโปรลีนในใบที่สามระยะการเจริญเติบโต (ระยะแตกกอ ระยะตั้งท้อง และระยะออกดอก) ต่อผลผลิต องค์ประกอบผลผลิต คุณภาพเมล็ด และการแสดงออกของยีน *badh2* และยีน *TPI* ในข้าวหอมพันธุ์พื้นเมืองพันธุ์บ่อเนอญะ 4 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ จำนวน 3 ซ้ำ ปลูกทดลองในกระถาง ใส่ปุ๋ยไนโตรเจน 6 ระดับ ได้แก่ 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อไร่ โดยใส่ปุ๋ยไนโตรเจนในรูปแบบยูเรีย จากผลการทดลองพบว่า ที่ระดับตั้งท้องการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนที่อัตรา 180 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อไร่ มีปริมาณสารโปรลีนสูงสุดเท่ากับ 2.41 ไมโครโมลต่อกรัม เมื่อเทียบจากระยะการเจริญเติบโตอื่น นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อใช้ปุ๋ยไนโตรเจนในอัตราเพิ่มขึ้นส่งผลให้ผลผลิต และองค์ประกอบผลผลิตของข้าวเพิ่มขึ้น ขณะที่ทดสอบความหอมโดยวิธีดมกลิ่น พบว่า ที่ระดับปุ๋ย 60 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อไร่ ข้าวพันธุ์บ่อเนอญะ 4 ให้กลิ่นหอมมากที่สุด และที่ระดับปุ๋ย 150 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อไร่ ไม่มีกลิ่นหอม ส่วนการทดสอบความอ่อนนุ่มของเมล็ดข้าวโดยวิธีการสลายตัวในด่าง พบว่า การเพิ่มระดับปุ๋ยไนโตรเจนไม่มีผลต่อความอ่อนนุ่มของข้าว และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะความหอม *badh2* และยีน *TPI* ในส่วนของดอกที่ระยะ 5 วันหลังดอกบาน 50 เปอร์เซ็นต์ สูงสุดที่ระดับปุ๋ยไนโตรเจน 30 และ 120 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อไร่ ตามลำดับ จากผลที่ได้สามารถนำไปประยุกต์เพื่อเพิ่มความหอมและผลผลิตของข้าวหอมพื้นเมืองให้ดีขึ้นในอนาคต

คำสำคัญ: บ่อเนอญะ 4 ระดับปุ๋ยไนโตรเจน คุณภาพเมล็ด ข้าวหอม

คำนำ

ข้าวที่มีกลิ่นหอมเป็นกลุ่มข้าวที่ได้รับความนิยม ด้วยคุณสมบัติของความนุ่มและกลิ่นหอม ทำให้มีความต้องการในการบริโภคที่เพิ่มมากขึ้นและส่งเสริมการขยายตัวของตลาดข้าวหอม โดยข้าวหอมที่ประเทศไทยนิยมส่งออก ได้แก่ ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 อย่างไรก็ตาม พบว่า ข้าวหอมบางสายพันธุ์มีผลผลิตต่ำ เนื่องจากไม่ทนทานโรคและแมลง ขณะที่กลุ่มข้าวพันธุ์พื้นเมือง เป็นกลุ่มพืชที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่เป็นเอกลักษณ์ มีความสามารถในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมท้องถิ่นได้ดี (Frankel *et al.*, 1995) ทนทานต่อการเข้าทำลายโรคและ

แมลง และมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงทั้งภายในประชากรและระหว่างประชากร ซึ่งบางกลุ่มของประชากรข้าวพื้นเมืองเป็นกลุ่มข้าวที่มีกลิ่นหอมจากการศึกษาของ Chan-in *et al.* (2019) พบว่า ข้าวหอมพื้นเมืองไทยพื้นที่สูง มีค่าความหลากหลายภายในประชากรต่ำ แต่มีค่าความแตกต่างระหว่างประชากรสูง และยังพบว่า ข้าวหอมพื้นเมืองพื้นที่สูงพันธุ์บ่อเนอญะ 4 มีปริมาณสาร 2AP สูงใกล้เคียงกับข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวหอมที่นิยมปลูกในประเทศไทยปัจจุบัน

กลิ่นหอมของข้าวหอมเป็นหนึ่งในลักษณะคุณภาพเมล็ดที่ถูกควบคุมด้วยพันธุกรรม จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่า กลิ่นหอมของข้าวหอมเกิดจากสาร

หอมระเหยหลายชนิดรวมกัน แต่สารประกอบหลักที่ให้กลิ่นหอม คือ 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) ซึ่งเป็นสารชนิดเดียวกันกับที่พบในใบเตย สามารถพบสาร 2AP ได้ทุกส่วนของต้นข้าว ยกเว้นราก (Buttery *et al.*, 1983) สาร 2AP เกิดขึ้นในวิถีการสังเคราะห์ polyamine มีสารตั้งต้นคือกรดอะมิโนโพรลีน (proline) และมียีน *badh2* ควบคุมลักษณะความหอม ตั้งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 8 โดยเปลี่ยนสาร GABA ไปเป็น 2AP ทำให้ข้าวมีกลิ่นหอม แต่ในกรณียีนเด่น *BADH2* ทำหน้าที่เปลี่ยนสาร GABA ไปเป็นสาร GABA ส่งผลให้ข้าวไม่มีความหอม (Yoshihashi *et al.*, 2002) และยังมีการรายงานเกี่ยวกับยีนความหอมของข้าวอีกหลายชนิด เช่น ยีน *TPI* ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับสารเมทิลไกลออกซาล (methylglyoxal, MG) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของสาร 2AP ในข้าวหอมและสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ได้จากการผ่านกระบวนการไกลโคไลซิส โดย MG มีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อต้นข้าวอยู่ในภาวะเครียด และการเพิ่มขึ้นของ MG มีผลทำให้ 2AP เพิ่มขึ้น (Wakte *et al.*, 2017)

นอกจากปัจจัยทางด้านพันธุกรรมแล้วยังมีปัจจัยจากสภาพแวดล้อม การจัดการต่าง ๆ เช่น การให้ปุ๋ย (Yang *et al.*, 2012) การให้น้ำ (Li *et al.*, 2021) ตลอดจนถึงวิธีการจัดการหลังการเก็บเกี่ยว ที่มีผลต่อความหอมของข้าว จากรายงานของ Itani *et al.* (2004) ที่ศึกษาเกี่ยวกับความแปรปรวนที่เกิดขึ้นกับคุณภาพด้านความหอมของข้าว พบว่า ปริมาณของสารหอม 2AP แปรผันไปตามสภาพแวดล้อมระหว่างฤดูปลูก เช่นเดียวกับ Tejakum *et al.* (2019) ที่ศึกษาอิทธิพลของพื้นที่ปลูกต่อผลผลิต คุณภาพเมล็ด และความหอมของข้าวพื้นเมืองพันธุ์บือเนอโมในสองพื้นที่ปลูกที่มีระดับความสูงเหนือระดับน้ำทะเลต่างกัน พบว่า การปลูกในแปลงทดลองที่ลุ่มให้ผลผลิตมากกว่าปลูกในพื้นที่สูง แต่การปลูกในแปลงทดลองพื้นที่สูงข้าวมีกลิ่นหอมมากกว่าปลูกในพื้นที่ลุ่ม นอกจากนี้ จากการศึกษาของ Zhong and Tang (2014) พบว่า เมื่อใส่ปริมาณปุ๋ยไนโตรเจนเพิ่มขึ้น มีผลให้สาร 2AP ในเมล็ดเพิ่มขึ้น ทำให้ความเข้มข้นของสารโพรลีนในใบและเมล็ดเพิ่มขึ้น และการใส่ปริมาณไนโตรเจนในอัตราที่แตกต่างกันมีผลต่อผลผลิตข้าว

ไนโตรเจนเป็นหนึ่งในธาตุอาหารหลักและส่วนประกอบที่สำคัญของกรดอะมิโน โพรลีน กรดนิวคลีอิก และเอนไซม์สำคัญในส่วนต่าง ๆ ของเซลล์พืชที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในพืช ซึ่งเป็นกระบวนการที่มีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของพืช (Teh *et al.*, 2016) ทั้งในระหว่างการเจริญเติบโตทางราก ลำต้น ใบ (vegetative growth) และการเจริญเติบโตทางการสืบพันธุ์ (reproductive growth) (Slocum, 1991) นอกจากนี้ ไนโตรเจนยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับความหอมของข้าวหอมในด้านการสะสมโพรลีนและสาร 2AP ในข้าวอีกด้วย (Yoshihashi *et al.*, 2002) จากรายงาน Monggoot *et al.* (2014) พบว่า ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ได้รับไนโตรเจนมากทำให้ปริมาณสาร 2AP ในเมล็ดน้อย ในขณะที่การศึกษาของ Mo *et al.* (2018) กลับพบว่าการใช้ไนโตรเจนเพิ่มขึ้นทำให้การสะสมของโพรลีนในใบและเมล็ดเพิ่มขึ้น มีผลทำให้ปริมาณ 2AP ในเมล็ดเพิ่มขึ้น ส่งผลให้กลิ่นหอมในเมล็ดข้าวมากขึ้น ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินผลของการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนต่อปริมาณสารโพรลีน ผลผลิต องค์ประกอบผลผลิต คุณภาพเมล็ด รวมทั้งการแสดงออกของยีนที่ควบคุมลักษณะความหอมในข้าวหอมพื้นเมืองไทย เพื่อนำไปสู่วิธีการจัดการการใช้ไนโตรเจนได้อย่างเหมาะสม ซึ่งอาจช่วยพัฒนาคุณสมบัติความหอมของข้าวหอมให้ดียิ่งขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

แผนการทดลองและการปลูกข้าว

งานวิจัยนี้ทดลองที่สาขาวิชาพืชไร่ ศูนย์วิจัยสาริต และฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในช่วงฤดูฝนตั้งแต่เดือนกรกฎาคม - ธันวาคม พ.ศ. 2561 วางแผนการทดลองแบบ สุ่มสมบูรณ์ (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ ประกอบด้วยการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนในรูปของยูเรีย (46 - 0 - 0) จำนวน 6 ระดับ ได้แก่ 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อไร่ โดยแบ่งใส่ปุ๋ยในอัตราที่เท่ากัน จำนวน 3 ครั้ง คือ

ระยะแตกกอ (15 วันหลังย้ายปลูก) ระยะตั้งท้อง (45 วันหลังย้ายปลูก) และระยะออกดอก (70 วันหลังย้ายปลูก) ใส่ปุ๋ยทวีปเปิดซูเปอร์ฟอสเฟต (0 - 46 - 0) และปุ๋ยโพแทสเซียมซัลเฟต (0 - 0 - 60) ในอัตรา 50 และ 100 กิโลกรัมต่อไร่ ตามลำดับ ก่อนย้ายกล้าปลูก 1 วัน ส่วนข้าวหอมพันธุ์พื้นเมืองไทยที่ใช้ในการทดลอง คือ ข้าวพันธุ์ปิ่นมอญ 4 (BNM4) โดยปลูกในกระถางที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร ความสูง 28 เซนติเมตร บรรจุดิน 13 กิโลกรัม เท่ากันทุกกระถาง ดินที่ใช้ปลูกมีลักษณะเป็นดินร่วนปนทราย (sandy loam) โดยปลูกย้ายกล้าข้าวจำนวน 5 ต้นต่อกระถาง

วิเคราะห์ปริมาณสารโพรลิน

เตรียมตัวอย่างใบข้าวหลังใส่ปุ๋ยไนโตรเจน 7 วัน โดยเก็บจากใบข้าวอ่อนสุดที่แผ่ขยายใบเต็มที่ (youngest emerged blade, YEB) จำนวน 1 ใบ ทำเครื่องหมายกำกับต้นที่เก็บตัวอย่าง ตัวอย่างละ 1 ต้น ต่อกระถาง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารโพรลินใน 3 ระยะ ได้แก่ ระยะแตกกอ ระยะตั้งท้อง และระยะออกดอก วิธีการดัดแปลงมาจากการทดลองของ Bates *et al.* (1973) โดยนำตัวอย่างใบข้าวมาบดด้วยไนโตรเจนเหลว ให้เป็นผงละเอียดน้ำหนัก 0.5 กรัม เติมน้ำละลายโซลโฟซาลิไซลิกแอซิด ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ 4 มิลลิกรัม เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 10 นาที นำออกมาแช่น้ำเย็นก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใส ขึ้นบน 2 มิลลิกรัม เติมน้ำละลายผสมนินไฮดรินแอซิด (ninhydrin 2.5 กรัม + glacial acetic acid 60 มิลลิกรัม + 6M phosphoric acid 40 มิลลิกรัม) 2 มิลลิกรัม และกรดอะซิติก 2 มิลลิกรัม นำไปต้มในน้ำเดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำออกมาหยุดปฏิกิริยาด้วยการแช่น้ำแข็ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที และเติมไทลูอิน 4 มิลลิกรัม เขย่าให้สารเข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ดูดสารละลายใสขึ้นบนไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) โดยใช้ไทลูอินเป็นตัวเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (standard curve) ของสารโพรลิน

วิเคราะห์ผลผลิตและองค์ประกอบผลผลิต

เก็บเกี่ยวผลผลิตและบันทึกองค์ประกอบผลผลิตในระยะสุกแก่ แต่ละตัวอย่างบันทึกข้อมูลความสูงต้นโดยวัดจากพื้นดินถึงปลายใบยอดหรือปลายใบธง จำนวนรวงต่อต้น โดยวัดทุกต้น จากนั้นสุ่มเก็บตัวอย่าง 2 รวง นำมานับจำนวนเมล็ดดีต่อรวง คำนวณเปอร์เซ็นต์เมล็ดดี และชั่งน้ำหนัก 100 เมล็ด เก็บเกี่ยวผลผลิตแยกส่วนเมล็ดกับฟางออกจากกัน โดยนำส่วนฟางไปอบที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำฟางมาชั่งน้ำหนักแห้ง และบันทึกข้อมูล ส่วนของเมล็ดที่ได้นำไปตากแดด ชั่งน้ำหนักเมล็ด บันทึกความชื้นเพื่อคำนวณผลผลิตเมล็ดที่ความชื้น 14 เปอร์เซ็นต์ ก่อนนำไปเก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการทดสอบความหอม

ตรวจสอบความหอมของเมล็ดข้าว

ทดสอบความหอมเบื้องต้นด้วยการดมกลิ่น (ดัดแปลงจากวิธีการของ Sood and Siddiq, 1978) โดยสุ่มเมล็ดข้าวที่ระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยาจากแต่ละข้า้ละ 10 เมล็ด รวมทั้งสิ้น 30 เมล็ด นำมาแกะเปลือกเป็นข้าวกล้องใส่ในหลอดทดลอง ขนาด 1.5 มิลลิกรัม เติมน้ำละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 1.7 เปอร์เซ็นต์ 850 ไมโครลิตร ปิดฝาแช่ทิ้งไว้ 10 นาที นำไปให้ผู้ทดสอบจำนวน 20 คน ดมกลิ่นและบันทึกข้อมูล โดยมีเกณฑ์การให้ระดับความหอมดังนี้ ไม่มีกลิ่นหอม = 0 คะแนน กลิ่นหอมอ่อนหรือหอมน้อย = 1 คะแนน และมีกลิ่นหอมมากดมแล้วขึ้นจมูกมีกลิ่นหอมคล้ายใบเตย = 2 คะแนน

ทดสอบความอ่อนนุ่มของเมล็ดข้าว

ทดสอบความอ่อนนุ่มของเมล็ดข้าวด้วยวิธีการสลายตัวในด่าง (alkali test) (ดัดแปลงจากวิธีการของ Little *et al.* 1958) โดยนำเมล็ดจากแต่ละข้า้ละ 10 เมล็ด รวมทั้งสิ้น 30 เมล็ด แกะเปลือกเป็นข้าวกล้องและหักเมล็ด ใส่ลงในจานหลุมพลาสติก (microwell plate) หลุมละ 1 เมล็ด เติมน้ำละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1.7 เปอร์เซ็นต์

350 ไมโครลิตรต่อหลอด ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 23 ชั่วโมง จากนั้นประเมินระดับของการสลายตัวในต่าง โดยแบ่งระดับการสลายตัวของเมล็ดเป็น 7 ระดับ (Table 1)

วิเคราะห์การแสดงออกของยีน

การสกัด RNA และการสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA)

เก็บตัวอย่างดอกข้าวจำนวน 7 - 10 ดอกที่ระยะ 5 วันหลังดอกบาน 50 เปอร์เซ็นต์ มาบดด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียดเพื่อนำไปสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA) ด้วย NucleoZOL จากนั้นนำ RNA ที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพความเข้มข้นด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer นำ RNA ที่สกัดได้มากำจัดดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วย DNase I, RNase-free (1 U/ไมโครลิตร) (Thermo Scientific) ที่ 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย RNA 1 ไมโครกรัม, 10x reaction buffer 2 ไมโครลิตร, DNase1 1 ไมโครลิตร และ DEPC-treated water 9 - 15 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที แล้วเติม 50 mM EDTA 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 10 นาที แล้วสังเคราะห์ cDNA จาก RNA 40 ไมโครลิตร โดยวิธีการทำปฏิกิริยา reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ด้วย RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) โดยทำในหลอด microtube ขนาด 0.2 มิลลิกรัม ประกอบด้วย RNA (treated-DNase I) 1 ไมโครกรัม, Primer Oligo (dT)

1 ไมโครลิตร, 5x RT buffer 4 ไมโครลิตร, RiboLock RNase Inhibitor (20 U/ไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร, 10mM dNTP mix 2 ไมโครลิตร, RevertAid RT (200 U/ไมโครลิตร) 1 U/ไมโครลิตร และ DEPC-treated water 1 U/ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส 60 นาที และ 70 องศาเซลเซียส 5 นาที เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสิ้นแล้วนำไปแช่ที่ตู้ -20 องศาเซลเซียส ทันที และตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วย 1.5 เปอร์เซ็นต์ agarose gel electrophoresis

การประเมินการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR

นำ cDNA ที่ได้มาประเมินการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR โดยใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ในการเพิ่ม ปริมาณ ใช้ primer ที่เฉพาะเจาะจงกับยีน *badh2* และ *TPI* (Table 2) และตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วย 1.5 เปอร์เซ็นต์ agarose gel electrophoresis และวิเคราะห์ข้อมูลการแสดงออกของยีนด้วยโปรแกรม ImageJ เวอร์ชัน 1.50i (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA) โดยวัดค่าความเข้ม (intensity) ของแถบดีเอ็นเอ ซึ่งจะเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนที่ศึกษากับ actin (housekeeping gene) เพื่อหาค่า relative intensity เปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยใช้ค่า least significant difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

Table 1. The criterion used to determine scores of alkali test

Score*	Morphological changes of rice grain	Gelatinization temperature
1	Grain not affected	High (>75 °C)
2	Grain swollen	
3	Grain swollen and collar incomplete and narrow	
4	Grain swollen and collar incomplete and wide	Medium (70 - 74 °C)
5	Grain split or segmented and collar complete and wide	
6	Grain dispersed and merging with collar	Low (< 69 °C)
7	Grain completely dispersed and intermingled	

*Score 1 - 3 = grain quality is hard texture, score 4 - 5 = grain quality is intermediate texture, score 6 - 7 = grain quality is soft texture

Table 2. Primers used for study gene expression of 3 genes

Genes	Forward sequence	Reverse sequence
<i>actin</i>	5'-GACTATGGTGATGGTGTCTAGC-3'	5'-GGCTGGAAGAGGACCTCAGG-3'
<i>badh2</i>	5'-TGTGCTAAACATAGTGACTGG-3'	5'-CTTAACCATAGGAGCAGCT-3'
<i>TPI</i>	5'-ATCAGATGAACTGAAAGTGCCGTT-3'	5'-GACTACGAAAACAAGTAATCAT-3'

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลโดยวิธี analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยหาค่า LSD ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ (Statistic version 8.0) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ($P < 0.05$)

ผลการศึกษา

ปริมาณสารโพสลินในใบข้าว

อัตราปุ๋ยไนโตรเจนและระยะการเจริญเติบโตของข้าวมีปฏิสัมพันธ์ร่วมกันต่อปริมาณสารโพสลินในใบข้าว BNM4 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (Figure 1) โดยพบว่า การใส่ปุ๋ยไนโตรเจนเพิ่มขึ้นจาก 30 ถึง 180 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อไร่ ไม่มีผลต่อปริมาณสารโพสลินในใบข้าวที่ระยะแตกกอ โดยมีค่าเฉลี่ยของปริมาณโพสลินเท่ากับ 0.13 ไมโครโมลต่อกรัมของน้ำหนักสด และระยะออกดอก มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.63 ไมโครโมลต่อกรัมของน้ำหนักสด ขณะที่ระยะตั้งท้องพบว่า การใส่ปุ๋ยไนโตรเจนจาก 30, 60, 90 และ 120 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อไร่ ไม่มีผลต่อปริมาณสารโพสลินในใบข้าว โดยมีค่าเท่ากับ 0.34, 0.40, 0.71 และ 0.88 ไมโครโมลต่อกรัมของน้ำหนักสดตามลำดับ แต่เมื่อเพิ่มการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนที่อัตรา 150 และ 180 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อไร่ ทำให้ปริมาณสารโพสลินในใบเพิ่มขึ้น และมีค่ามากที่สุดเมื่อใส่ไนโตรเจนอัตรา 180 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อไร่ เท่ากับ 2.41 ไมโครโมลต่อกรัมของน้ำหนักสด

ผลผลิตและองค์ประกอบผลผลิต

จากผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ ผลผลิต และองค์ประกอบผลผลิตของข้าวพันธุ์ BNM4 พบอิทธิพลของระดับปุ๋ยในทุกลักษณะที่ศึกษาโดยรายละเอียดของแต่ละลักษณะที่ศึกษามีดังต่อไปนี้ (Table 3)

น้ำหนักเมล็ดต่อน้ำหนักของ BNM4 ไม่แตกต่างกันเมื่อเพิ่มอัตราปุ๋ยไนโตรเจนจาก 30 เป็น 60 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อไร่ มีค่าเท่ากับ 3.2 กรัมต่อน้ำหนักเมล็ด แต่เมื่อเพิ่มอัตราปุ๋ยไนโตรเจนเป็น 90 ถึง 180 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อไร่ ผลผลิตที่ได้เพิ่มขึ้นโดยเฉลี่ยเป็น 3.5 กรัมต่อน้ำหนักเมล็ด น้ำหนักแห้งฟางเพิ่มขึ้นตามอัตราปุ๋ยไนโตรเจนและมีปริมาณสูงสุดที่อัตราปุ๋ยไนโตรเจน 180 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อไร่ เท่ากับ 19.7 กรัมต่อกระถาง ส่วนความสูงต้นไม่แตกต่างกันที่อัตราปุ๋ยไนโตรเจน 30 และ 60 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อไร่ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 103.4 เซนติเมตร แต่เมื่อเพิ่มปุ๋ยไนโตรเจนเป็น 90 ถึง 180 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อไร่ ความสูงต้นเพิ่มขึ้นมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 124.6 เซนติเมตร จำนวนรวงต่อต้นเพิ่มขึ้นตามอัตราปุ๋ยไนโตรเจนและที่ระดับปุ๋ย 150 และ 180 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อไร่ มีจำนวนรวงต่อต้นเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 4 รวง จำนวนเมล็ดดีต่อรวงมีค่าเพิ่มขึ้นตามอัตราปุ๋ยไนโตรเจนที่เพิ่มขึ้นและมีจำนวนเมล็ดดีต่อรวงเฉลี่ยสูงสุดที่ 120 ถึง 180 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อไร่ เท่ากับ 119 เมล็ด เช่นเดียวกับ เปอร์เซนต์เมล็ดดีของ BNM4 ที่เพิ่มขึ้นตามอัตราปุ๋ยไนโตรเจนที่เพิ่มขึ้นและที่ระดับ 120 ถึง 180 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อไร่ มีเปอร์เซนต์เมล็ดดีเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 91.6 เปอร์เซนต์ ส่วนน้ำหนัก 100 เมล็ดของ BNM4 ไม่ต่างกันเมื่อใส่ปุ๋ยไนโตรเจน

ที่ระดับ 30, 60 และ 120 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อไร่
มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.8 กรัม แต่เมื่อใส่ปุ๋ยไนโตรเจน

เป็น 90, 150 และ 180 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อไร่ น้ำหนัก
100 เมล็ดเพิ่มขึ้นสูงสุดเฉลี่ยเท่ากับ 4.4 กรัม

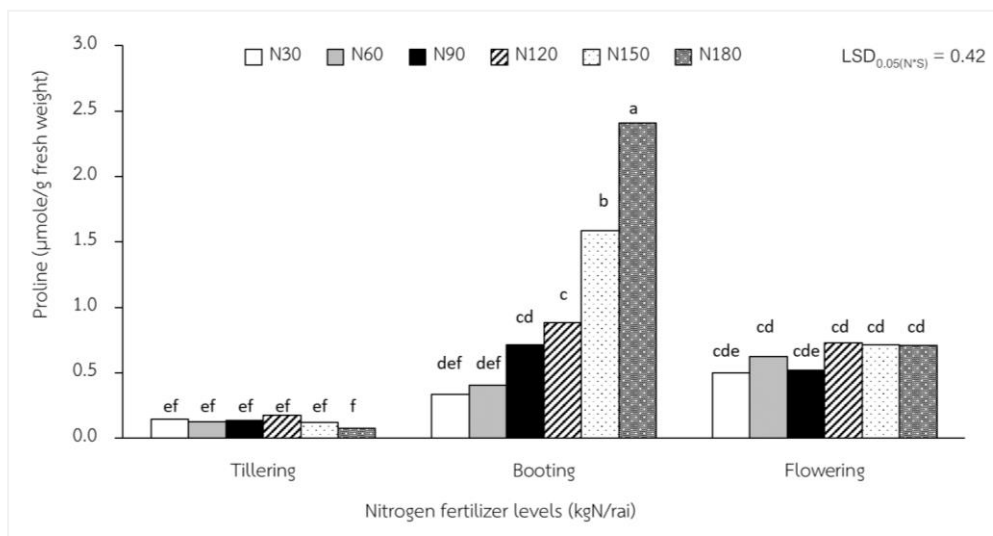


Figure 1. Effects of N rates on proline in rice variety Buer Ner Moo 4. The values are means of three replications. The different letters indicate significant differences by $LSD_{0.05}$ (N = nitrogen rate, S = growth stages, N*S = interaction effects between nitrogen rate and growth stages)

Table 3. Analysis of variances on the effects of yield and yield components on 6 N fertilizer rates in rice variety Buer Ner Moo 4

N rate (kgN/rai)	Grain yield (g/plant)	Straw dry weight (g/plant)	Plant height (cm)	No. of panicles/ plant	No. of spikelets/ panicle	Filled grain (%)	100 grain weight (g)
30	3.2c	7.8e	103.4b	2.7d	74.8c	69.0c	3.8b
60	3.2c	8.8de	103.4b	3.0cd	78.9c	73.4c	3.9b
90	3.5ab	11.3cd	120.3a	3.0cd	102.6b	84.2b	4.4a
120	3.3bc	13.1bc	118.9ab	3.7bc	108.4ab	89.4ab	4.0b
150	3.5ab	15.3bc	126.5a	4.0ab	120.3ab	92.3a	4.4a
180	3.6a	19.7a	132.6a	4.7ab	129.6a	93.3a	4.4a
F-test	**	***	**	***	***	***	**
CV (%)	3.5	13.7	7.8	14.8	11.7	5.2	3.9

** and *** indicate the significant at $P < 0.01$ and 0.001 , respectively, while ns is not significant. Means in the same column followed by different letters indicate significant differences at $P < 0.05$

ความหอมของข้าว

จากการทดสอบความหอมของเมล็ดข้าว โดยวิธีการดมกลิ่น จากผู้ร่วมทดสอบจำนวน 20 คน (Table 4) พบว่า อัตราปุ๋ยไนโตรเจนที่ 30 กิโลกรัม ไนโตรเจนต่อไร่ ทำให้เมล็ดข้าวมีกลิ่นหอมอ่อน และที่ 60 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อไร่ มีกลิ่นหอมมากถึง หอมอ่อน แต่เมื่อเพิ่มอัตราปุ๋ยไนโตรเจนเป็น 90 ถึง 180 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อไร่ กลิ่นหอมของเมล็ดข้าว ที่ได้กลับมีกลิ่นหอมลดลงจนไม่มีกลิ่น

ความอ่อนนุ่มของเมล็ดข้าว

จากการทดสอบความอ่อนนุ่มของเมล็ดข้าว โดยวิธีการสลายตัวในด่าง (Table 4) พบว่า การใส่อัตรา ปุ๋ยไนโตรเจนในข้าวพันธุ์ BNM4 มีค่าเฉลี่ยการสลายตัว ในด่างอยู่ระหว่าง 4.2 - 4.5 ซึ่งเป็นช่วงอุณหภูมิแบ่งสุก ปานกลาง

การแสดงออกของยีน

การแสดงออกของยีน *badh2* ในข้าว BNM4 มีความแตกต่างกันทางสถิติภายใต้การจัดการปุ๋ย ไนโตรเจนที่แตกต่างกัน (Figure 2a) โดยพบว่าการแสดงออกของยีน *badh2* มีค่ามากที่สุด เมื่อให้ปุ๋ยไนโตรเจนที่อัตรา 30 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อไร่ มีค่าเท่ากับ 2.14 รองลงมาได้แก่ที่ 60, 120, 180 และ 150 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อไร่ มีค่าเท่ากับ 1.60, 1.37, 0.98 และ 0.87 ตามลำดับ เมื่อให้ปุ๋ยไนโตรเจน ที่อัตรา 90 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อไร่ พบว่า มีการแสดงออกของยีน *badh2* น้อยที่สุด เท่ากับ 0.40 ส่วนการแสดงออกของยีน *TPI* (Figure 2b) พบว่า การให้ปุ๋ยไนโตรเจนที่ 120 กิโลกรัมไนโตรเจน ต่อไร่ มีค่าการแสดงออกของยีนมากที่สุดเท่ากับ 2.67 ส่วนการให้ปุ๋ยไนโตรเจน 150 และ 180 กิโลกรัม ไนโตรเจนต่อไร่ มีการแสดงออกของยีน *TPI* น้อยที่สุด โดยมีค่าเท่ากันคือเท่ากับ 1.40

วิจารณ์

จากการทดลอง พบว่า ปริมาณสารโพรลิน ในใบมีค่ามากที่สุดที่ระยะตั้งท้องและมีค่าเพิ่มขึ้น ตามอัตราการให้ปุ๋ยไนโตรเจนที่เพิ่มขึ้น โดยมีค่ามากที่สุดที่อัตราปุ๋ยไนโตรเจน 180 กิโลกรัมไนโตรเจน ต่อไร่ ซึ่งสารโพรลินเป็นสารตั้งต้นของ 2AP สอดคล้อง กับ Hinge *et al.* (2016) ที่พบว่าปริมาณ สาร 2AP เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ระยะต้นกล้าจนถึง ระยะตั้งท้อง โดยมีปริมาณสาร 2AP มากที่ระยะ ตั้งท้อง เป็นไปได้ว่าระยะตั้งท้องเป็นช่วงที่เริ่ม กระบวนการสังเคราะห์และสะสมสารที่สำคัญต่อ การเจริญเติบโตของต้นข้าว โดยการใส่ปุ๋ยไนโตรเจน และน้ำช่วงระหว่างระยะการเจริญเติบโตและการพัฒนา ของข้าวหอมเป็นช่วงที่มีความสำคัญมาก (Ren *et al.*, 2017) จากการศึกษาที่ผ่านมา มีรายงาน ว่า โพรลิน มีบทบาทสำคัญในการพัฒนาระบบสืบพันธุ์โดย เฉพาะอย่างยิ่งในช่วงระหว่างการพัฒนาดอกและยัง ทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงานในละอองเกสร (Lehmann *et al.*, 2010) นอกจากนี้ มีรายงานว่าไนโตรเจนมีผลต่อ การสะสมของสารโพรลินและสาร 2AP ในข้าว โดย Yang *et al.* (2012) ศึกษาความสัมพันธ์ของความหอม กับปริมาณไนโตรเจนในดิน พบว่า โพรลินมีค่าสูงใน เมล็ดข้าวหอมที่ปลูกในแปลงนาที่มีไนโตรเจนสูง โดย ยิ่งค่าโพรลินสูงมีส่วนช่วยในการสะสมกลิ่นหอม ในเมล็ดให้มากขึ้น เนื่องจากโพรลินเป็นแหล่งไนโตรเจน ของสารหอมในข้าวหอม (Yoshihashi *et al.*, 2004) จากการศึกษาของ Zhong and Tang (2014) พบว่า ปริมาณของโพรลินในใบและเมล็ดเพิ่มขึ้นจาก การเพิ่มขึ้นของปริมาณไนโตรเจน และค่าโพรลินที่ สูงขึ้นสามารถช่วยให้มีการสะสมกลิ่นหอมในเมล็ด มากขึ้น ดังนั้น การใส่ปุ๋ยไนโตรเจนเพิ่มขึ้นจึงทำให้ ปริมาณสารโพรลินในใบที่เพิ่มขึ้นด้วย แต่อย่างไรก็ตาม บทบาทของสารโพรลินนอกจากเป็นสารตั้งต้นที่ ทำให้เกี่ยวข้องกับความหอมแล้วยังมีความเกี่ยวข้อง กับ การปรับตัวของพืชเมื่อพืชเกิดความเครียดก็มีผลทำ ให้ปริมาณสาร 2AP เพิ่มขึ้นได้ (Lutts *et al.*, 1996) สอดคล้องกับงานของ Gay *et al.* (2010) ที่กล่าวถึง

Table 4. Sensory and alkali test on 6 N fertilizer rates in rice variety Buer Ner Moo 4

N rate (kgN/rai)	Sensory test*	Alkali test	
		Spreading value	Gelatinization temperature
30	Moderate fragrant	4.2	Medium
60	Moderate fragrant to high fragrant	4.2	Medium
90	Non fragrant to moderate fragrant	4.3	Medium
120	Non fragrant to moderate fragrant	4.4	Medium
150	Non fragrant	4.3	Medium
180	Non fragrant to moderate fragrant	4.5	Medium

*Sensory test from 20 testers

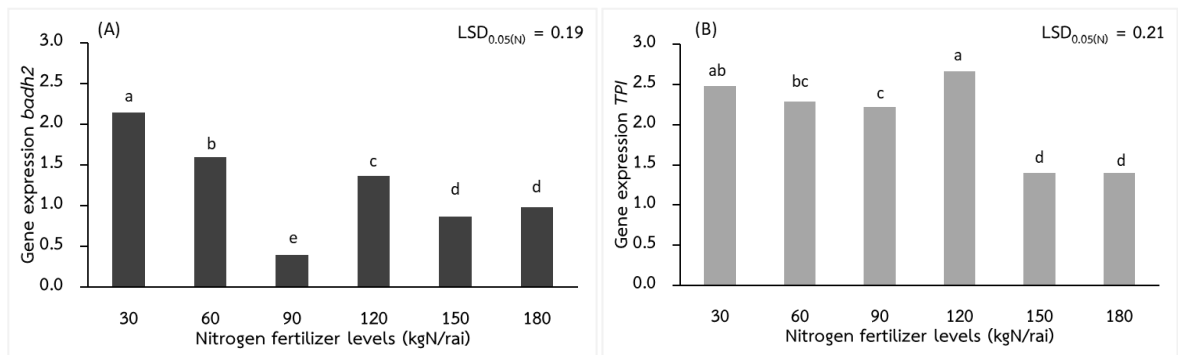


Figure 2. Effects of N rates on genes expression of *badh2* (A) and *TPI* (B) in rice variety Buer Ner Moo 4. The different letters indicate significant differences by LSD_{0.05}. (N = nitrogen rate)

คุณภาพของเมล็ดข้าวว่าความหอมสามารถแปรผันตามปัจจัยสภาพแวดล้อมและวิธีการจัดการดูแล โดยความเค็มมีผลในทางบวกต่อค่า 2AP โดยความเค็มจากความเค็มระยะก่อนออกดอก มีผลทำให้ปริมาณสาร 2AP เพิ่มขึ้น และผลการตอบสนองต่อการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนต่อความเข้มข้น 2AP ในเมล็ดยังขึ้นอยู่กับพันธุ์ข้าวที่ใช้ด้วย (Kongpun and Thebault Prom-uthai, 2021) ผลผลิตและองค์ประกอบผลผลิต พบว่าปริมาณผลผลิตที่ได้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามอัตราปุ๋ยไนโตรเจนที่ใส่เพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากปุ๋ยไนโตรเจนมีผลต่อการเพิ่มความสูง จำนวนรวงต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อรวง เปอร์เซ็นต์เมล็ดดี น้ำหนัก 100 เมล็ด และน้ำหนัก

แห้งฟางของข้าว จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าไนโตรเจนมีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ และระยะสีบนพันธุ์ในข้าว (Guindo *et al.*, 1992) สอดคล้องกับ Tayefe *et al.* (2014) ที่พบว่า การใส่ปุ๋ยไนโตรเจนช่วยเพิ่มผลผลิตและองค์ประกอบผลผลิตของข้าวอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเป็นไปในทางเดียวกับการศึกษาของ Channoey *et al.* (2020) พบว่า การใส่ปุ๋ยไนโตรเจนอัตราที่สูงขึ้นไม่ทำให้ความเข้มข้นของไนโตรเจนในเนื้อเยื่อข้าวส่วนต่าง ๆ เพิ่มขึ้น แต่ส่งผลให้ข้าวมีน้ำหนักแห้งของราก ลำต้น ใบ และรวงมากขึ้น แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของไนโตรเจนในเนื้อเยื่อของข้าวไม่มีความสัมพันธ์กับผลผลิตของข้าว

ความหอมของเมล็ด พบว่า การใส่ปุ๋ยไนโตรเจนในอัตราเพิ่มขึ้นมีผลทำให้กลิ่นหอมของเมล็ดข้าวลดลง แต่จากการศึกษาของ Thonglem (2014) รายงานว่าการจัดการไนโตรเจนและแคลเซียมไม่มีผลต่อปริมาณสารหอม 2AP ในเมล็ดข้าวหอม และ Prachayavirojana (2014) พบว่า การจัดการปุ๋ยไนโตรเจนและการใช้สารโพแทสเซียมไฮโดรไซด์ ไม่มีผลต่อปริมาณสารหอม 2AP ของข้าวหอม จากผลที่ได้ก่อนหน้านี้ พบว่า ปริมาณของสารโพโรลินในใบเพิ่มขึ้นตามระดับปุ๋ยไนโตรเจนที่เพิ่มขึ้น แต่ความหอมในเมล็ดที่ประเมินด้วยวิธีการดมกลิ่นกลับมีความหอมลดลง คาดว่าสาเหตุอาจเกิดจากในช่วงเวลาที่ทำ การเก็บเกี่ยวผลผลิตมีอุณหภูมิสูง จึงทำให้ความหอมของข้าวลดลง (Itani *et al.*, 2004) หรือเกิดจากความคลาดเคลื่อนของคะแนนความหอมจากผู้ร่วมทดสอบที่มีประสาทสัมผัสในการดมกลิ่นแตกต่างกัน

จากการทดสอบการสลายตัวของเมล็ดข้าวในต่าง ซึ่งเป็นการตรวจสอบลักษณะด้านคุณภาพความอ่อนนุ่มของเมล็ดข้าวที่มีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิแบ่งสูง โดยข้าวที่มีอุณหภูมิแบ่งสูงต่ำมีความอ่อนนุ่มมากกว่าข้าวที่มีอุณหภูมิแบ่งสูงสูง (Kuntawong *et al.*, 2015) ผลการทดลองนี้ พบว่า การจัดการปุ๋ยไนโตรเจนไม่มีผลต่อความอ่อนนุ่มของเมล็ดข้าว โดยข้าวพันธุ์ป้อนเอนู 4 เป็นข้าวที่มีความอ่อนนุ่มปานกลาง สอดคล้องกับ Tejakum *et al.* (2019) ที่รายงานว่าคุณภาพข้าวหุงสุกของข้าวหอมพื้นเมืองพันธุ์ป้อนเอนู เป็นข้าวที่มีความอ่อนนุ่มในระดับปานกลาง ซึ่งมีความอ่อนนุ่มของเมล็ดข้าวน้อยกว่าข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 สอดคล้องกับการศึกษาของ Tayefe *et al.* (2014) พบว่า การใช้ปุ๋ยไนโตรเจนในปริมาณที่ต่างกันไม่มีผลต่ออุณหภูมิแบ่งสูง ซึ่งแตกต่างจาก Huang *et al.* (2020) ที่ศึกษาผลของปุ๋ยไนโตรเจนต่อคุณภาพในการบริโภคและการหุงต้มของข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Nanjing 9108 และ Huaidao 5 พบว่า คุณภาพด้านการบริโภคของข้าวทั้งสองพันธุ์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญภายใต้การใส่ปุ๋ยไนโตรเจนที่มากเกินไป เป็นผลจากความเหนียว (stickiness) ที่ลดลงและการเสื่อมสภาพ (retrogradation) ของข้าวหุงสุก ซึ่งอาจ

เป็นผลจากปริมาณโปรตีนที่เพิ่มขึ้น และโครงสร้างของอะไมโลเพคติน (amylopectin) ที่เปลี่ยนแปลงไป นอกจากนี้ การสังเคราะห์อะไมโลเพคตินยังได้รับอิทธิพลมาจากปุ๋ยไนโตรเจนและลักษณะพันธุกรรมของพันธุ์ข้าวอีกด้วย

จากการประเมินผลการแสดงออกของยีนที่ระยะ 5 วันหลังดอกบาน 50 เปอร์เซ็นต์ มีการแสดงออกของยีน *badh2* และยีน *TPI* สูงสุดเมื่อใส่ปุ๋ยไนโตรเจนที่ระดับ 30 และ 120 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อไร่ตามลำดับ จากรายงานที่ผ่านมาพบว่า สารโพโรลินมีบทบาทสำคัญช่วงระยะออกดอก (Lehmann *et al.*, 2010) สอดคล้องกับ Hinge *et al.* (2016) ที่พบว่า การแสดงออกยีน *badh2* มีความสัมพันธ์เชิงลบกับการสะสมสาร 2AP ในข้าวหอม และการแสดงออกของยีน *TPI* มีปริมาณน้อยในช่วงระยะออกดอกถึงระยะแบ่งอ่อน นอกจากนี้ยังพบว่า ปริมาณสารโพโรลินมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อถึงระยะออกดอกและลดลงในระยะเต็มเต็มเมล็ด จากการศึกษาศึกษาของ Mo *et al.* (2016) พบว่า โพโรลินอาจถูกแปลงเป็นสาร 2AP ในเยื่อหุ้มลำต้นและใบก่อนถูกลำเลียงไปยังรวงหรือเมล็ดพืชซึ่งมีกลไกเดียวกัน และโพโรลินที่เหลือจากกระบวนการเมตาบอลิซึมเบื้องต้นอาจถูกนำไปสังเคราะห์เป็น 2AP ดังนั้น แม้มีปริมาณสารโพโรลินมากแต่ปริมาณสาร 2AP ที่ได้อาจมีปริมาณน้อยในช่อดอก (Hinge *et al.*, 2016) นอกจากนี้ ยังมีปัจจัยที่ส่งเสริมการดูดซึมไนโตรเจน การลำเลียงสาร และการสะสมของไนโตรเจนในเนื้อเยื่อพืช อาจเป็นตัวแปรในการเพิ่มความเข้มข้นสาร 2AP ในเมล็ดของข้าวหอมอีกด้วย (Kongpun and Prom-u-thai, 2021) ดังนั้น จึงต้องพิจารณาอัตราการใส่ปุ๋ยและการจัดการให้เหมาะสมกับพันธุ์ข้าวชนิดนั้น ๆ ด้วย

สรุป

จากการศึกษาอิทธิพลของปุ๋ยไนโตรเจนที่มีผลต่อปริมาณสารโพโรลิน ผลผลิต องค์ประกอบผลผลิต และคุณภาพเมล็ดในข้าวหอมพื้นเมืองพันธุ์ป้อนเอนู 4 พบว่า การจัดการปุ๋ยไนโตรเจนในอัตราที่ต่างกันมีผล

ทำให้ปริมาณสารโพรสลินในส่วนของใบในแต่ละระยะการเจริญเติบโตแตกต่างกันและมีค่าสูงที่ระยะตั้งท้องขณะที่ผลผลิตและองค์ประกอบผลผลิตนั้น พบว่ามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามอัตราปุ๋ยไนโตรเจนที่สูงขึ้น ส่วนคุณภาพเมล็ด จากการทดสอบความหอม พบว่าการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนที่ระดับ 60 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อไร่ ให้กลิ่นหอมมากที่สุด และจากการทดสอบความอ่อนนุ่มของเมล็ดข้าวพบว่า การใส่ปุ๋ยไนโตรเจนเพิ่มขึ้นไม่ส่งผลต่อความอ่อนนุ่มของเมล็ดข้าว สำหรับการประเมินผลการแสดงออกของยีน *badh2* และยีน *TPI* พบว่า มีการแสดงออกของยีนสูงสุดเมื่อใส่ปุ๋ยไนโตรเจนที่ระดับ 30 และ 120 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อไร่ ตามลำดับ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้อาจเป็นแนวทางการจัดการปุ๋ยไนโตรเจนให้เหมาะสม เพื่อประสิทธิภาพสูงสุดของการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนในการเพิ่มผลผลิต และคุณภาพเมล็ดของข้าวหอมพันธุ์พื้นเมืองไทยให้ดีขึ้นในอนาคต แต่อย่างไรก็ตามก็ควรมีการทดลองที่คล้ายคลึงกันเพิ่มเติมอีกเพื่อยืนยันผลการตอบสนองต่อปุ๋ยไนโตรเจนในข้าวหอมพันธุ์พื้นเมืองไทย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณงบประมาณในการวิจัยจากโครงการ Nutrient management, next generation sequencing technology and breeding for improving grain yield and nutritional quality in Thai local fragrant rice สนับสนุนโดย The Royal Society, United Kingdom และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

เอกสารอ้างอิง

Bates, L.S., R.P. Waldren and I.D. Teare. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39(1): 205-207.

Buttery, R.G., L.C. Ling, B.O. Juliano and J.G. Turnbaugh. 1983. Cooked rice aroma and 2-acetyl-1-pyrroline. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 31(4): 823-826.

Channoey, T., S. Khempet, A. Shutsrirung, Y. Chromkaew and S. Jongkaewwattana. 2020. Nitrogen use efficiency and partitioning in relation to growth and yield of rice cv. Khao Dawk Mali 105 and cv. Homnil. *Journal of Agriculture* 36(1): 113-121. (in Thai)

Chan-in, P., S. Jamjod, N. Yimyam and T. Pusadee. 2019. Diversity of *BADH2* alleles and microsatellite molecules in highland fragrant rice landraces. *Journal of Agriculture* 35(1): 23-35. (in Thai)

Frankel, O.H., A.H.D. Brown and J.J. Burdon. 1995. *The Conservation of Plant Biodiversity*. Cambridge University Press, Cambridge. 316 p.

Gay, F., I. Maraval, S. Roques, Z. Günata, R. Boulanger, A. Audebert and C. Mestres. 2010. Effect of salinity on yield and 2-acetyl-1-pyrroline content in the grains of three fragrant rice cultivars (*Oryza sativa* L.) in Camargue (France). *Field Crops Research* 117(1): 154-160.

Guindo, D., B.R. Wells, C.E. Wilson and R.J. Norman. 1992. Seasonal accumulation and partitioning of nitrogen-15 in rice. *Soil Science Society of America Journal* 56(5): 1521-1527.

Hinge, V.R., H.B. Patil and A.B. Nadaf. 2016. Aroma volatile analyses and 2AP characterization at various developmental stages in Basmati and Non-Basmati scented rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Rice* 9: 38, doi:10.1186/s12284-016-0113-6.

Huang, S.J., C.F. Zhao, Z. Zhu, L.H. Zhou, Q.H. Zheng and C.L. Wang. 2020. Characterization of eating quality and starch properties of two *Wx* alleles

- japonica* rice cultivars under different nitrogen treatments. *Journal of Integrative Agriculture* 19(4): 988-998.
- Itani, T., M. Tamaki, Y. Hayata, T. Fushimi and K. Hashizume. 2004. Variation of 2-acetyl-1-pyrroline concentration in aromatic rice grains collected in the same region in Japan and factors affecting its concentration. *Plant Production Science* 7(2): 178-183.
- Kongpun, A. and C. Thebault Prom-u-thai. 2021. Effects of nitrogen fertilizer on grain yield and fragrant contents in two Thai rice varieties. *OnLine Journal of Biological Sciences* 21(3): 206-212.
- Kuntawong, W., S. Jamjod, N. Yimyam and C. Thebault Prom-u-thai. 2015. Genotypic variation of cooking qualities in local rice varieties from Chiang Mai, Chiang Rai and Mae Hong Son Provinces. *Khon Kaen Agriculture Journal* 43(4): 687-698. (in Thai)
- Lehmann, S., D. Funck, L. Szabados and D. Rentsch. 2010. Proline metabolism and transport in plant development. *Amino Acids* 39(4): 949-962.
- Li, Y., Z. Mo, Y. Li, J. Nie, L. Kong, U. Ashraf, S. Pan, M. Duan, H. Tian and X. Tang. 2021. Additional nitrogen application under different water regimes at tillering stage enhanced rice yield and 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) content in fragrant rice. *Journal of Plant Growth Regulation*, doi: 10.1007/s00344-021-10351-0.
- Little, R.R., G.B. Hilder and E.H. Dawson. 1958. Differential effect of dilute alkali on 25 varieties of milled white rice. *Cereal Chemistry* 35(2): 111-126.
- Lutts, S., J.M. Kinet and J. Bouharmont. 1996. Effects of various salts and of mannitol on ion and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in rice (*Oryza sativa* L.) callus cultures. *Journal of Plant Physiology* 149(1-2): 186-195.
- Mo, Z., U. Ashraf, Y. Tang, W. Li, S. Pan, M. Duan, H. Tian and X. Tang. 2018. Nitrogen application at the booting stage affects 2-acetyl-1-pyrroline, proline, and total nitrogen contents in aromatic rice. *Chilean Journal of Agricultural Research* 78(2): 165-172.
- Mo, Z., J. Huang, D. Xiao, U. Ashraf, M. Duan, S. Pan, H. Tian, L. Xiao, K. Zhong and X. Tang. 2016. Supplementation of 2-AP, Zn and La improves 2-acetyl-1-pyrroline concentrations in detached aromatic rice panicles *in vitro*. *PLoS One* 11(2): e0149523, doi: 10.1371/journal.pone.0149523.
- Monggoot, S., P. Sookwong, S. Mahatheeranont and S. Meechoui. 2014. Influence of single nutrient element on 2-acetyl-1-pyrroline contents in Thai fragrant rice (*Oryza sativa* L.) cv. Khao Dawk Mali 105 grown under soilless conditions. pp. 642-647. *In: Proceedings of the 26th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference*. Mae Fah Luang University, Chiang Rai.
- Prachayavirojana, K. 2014. Relationship among growth, yield and grain quality of aromatic rice cv. KDML105 and RD15 under nitrogen and potassium iodide management. M.S. Thesis. Chiang Mai University, Chiang Mai. 78 p. (in Thai)

- Ren, Y., U. Ashraf, L.X. He, Z.W. Mo, F. Wang, X.C. Wan, H. Kong, X.L. Ran and X.R. Tang. 2017. Irrigation and nitrogen management practices affect grain yield and 2-acetyl-1-pyrroline content in aromatic rice. *Applied Ecology and Environmental Research* 15(4): 1447-1460.
- Slocum, R.D. 1991. Polyamine biosynthesis in plants. pp. 23-40. *In*: R.D. Slocum and H.E. Flores (eds.). *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants*. CRC Press, Boca Raton.
- Sood, B.C. and E.A. Siddiq. 1978. A rapid technique for scent determination in rice. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding* 38(2): 268-275.
- Tayefe, M., A. Gerayzade, E. Amiri and A.N. Zade. 2014. Effect of nitrogen on rice yield, yield components and quality parameters. *African Journal of Biotechnology* 13(1): 91-105.
- Teh, C.Y., N.A. Shaharuddin, C.L. Ho and M. Mahmood. 2016. Exogenous proline significantly affects the plant growth and nitrogen assimilation enzymes activities in rice (*Oryza sativa*) under salt stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 38: 151, doi: 10.1007/s11738-016-2163-1.
- Tejakum, P., S. Khumto, S. Jamjod, N. Yimyam and T. Pusadee. 2019. Yield, grain quality and fragrance of a highland fragrant rice landrace variety, Bue Ner Moo. *Khon Kaen Agriculture Journal* 47(2): 317-326. (in Thai)
- Thonglem, P. 2014. Effects of nitrogen and calcium management on milling quality and 2-acetyl-1-pyrroline concentration in rice cv. KDML105 and RD15. M.S. Thesis. Chiang Mai University, Chiang Mai. 102 p. (in Thai)
- Wakte, K., R. Zanan, V. Hinge, K. Khandagale, A. Nadaf and R. Henry. 2017. Thirty-three years of 2-acetyl-1-pyrroline, a principal basmati aroma compound in scented rice (*Oryza sativa* L.): a status review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97(2): 384-395.
- Yang, S., Y. Zou, Y. Liang, B. Xia, S. Liu, M. Ibrahim, D. Li, Y. Li, L. Chen, Y. Zeng, L. Liu, Y. Chen, P. Li and J. Zhu. 2012. Role of soil total nitrogen in aroma synthesis of traditional regional aromatic rice in China. *Field Crops Research* 125: 151-160.
- Yoshihashi, T., T.T.H. Nguyen and H. Inatomi. 2002. Precursors of 2-acetyl-1-pyrroline, a potent flavor compound of an aromatic rice variety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(7): 2001-2004.
- Yoshihashi, T., T.T.H. Nguyen and N. Kabaki. 2004. Area dependency of 2-acetyl-1-pyrroline content in an aromatic rice variety, Khao Dawk Mali 105. *Japan Agricultural Research Quarterly* 38(2): 105-109.
- Zhong, Q. and X. Tang. 2014. Effect of nitrogen application on aroma of aromatic rice and their mechanism. *Guangdong Agricultural Sciences* 41(4): 85-87.