การคัดเลือกข้าวทนแล้งโดยใช้ปริมาณสาร Malondialdehyde

Utilization of Malondialdehyde Content for Drought Stress Tolerance in Rice Screening

สุพัตรา นราวัฒนะ[1),*] พิทวัส วิขัยดิษฐ[1)] พัณณ์ชิตา เวชสาร[2)]

Supatthra Narawatthana[1),*] Bithawas Vichaidis[1)] Phanchita Vejchasarn[2)]

Abstract

Rice (*Oryza sativa* L.) is a crop that requires a lot of water to grow. However, heat and drought stresses caused by global climate change can adversely affect reproductive organ establishment, seedling morphogenesis, yield, and the quality of rice. Breeding for a drought-tolerant variety, a vital strategy in coping with drought stress, requires multiple tools and indices in the selection of drought-tolerant varieties, as drought tolerance is a complex phenomenon. In this study, we measured malondialdehyde (MDA) content in conjunction with the degree of leaf rolling in rice plants as an indicator of drought tolerance under two water regimes, i.e., well-watered and drought-stress conditions. The total number of 228 rice lines/varieties, which 224 recombinant inbred lines (RILs) population derived from a single cross of IR57514 and Khao Dawk Mali 105 (KDML105), and the other four standard check varieties, i.e., IR57514 (tolerant standard check), IR1552, KDML105 and Khao Pahk Maw 148, was investigated for leaf rolling score and malondialdehyde (MDA) content at Ubon Ratchathani Rice Research Center and Thailand Rice Science Institute during October 2012 to September 2013. The MDA content and leaf rolling score of the rice plants were examined in both well-watered conditions and subjected to drought stress for 20 days during the vegetative stage. The results showed that, under well-watered conditions, the leaf rolling score of all tested rice was at level 1 with the MDA content ranging from 3.56 to 7.00 µmol/g FW and increased up to 8.85 - 30.35 µmol/g FW under drought stress. In addition, under drought stress, the leaf rolling score of most of the rice population was 5, and only seven lines exhibited the rolling score at level 1. These seven lines were PSL99094-350-9-5R-21, PSL99093-108-3-5R-40, PSL99094-72-8-5R-2, PSL99093-108-4-5R-38, PSL99094-13-5R-25, PSL99094-32-1-5R-21, and PSL99094-159-7-5R-21 which not only showed the lowest leaf rolling score of 1 but also contained the lowest MDA content ranged from 8.86 to 11.07 µmol/g FW. The line PSL99094-350-9-5R-21 had superior drought tolerance as it contained the lowest MDA content. It is noted that the MDA content of IR57514, the drought tolerant standard check, was 12.10 µmol/g FW with a leaf rolling score of 2. However, some rice lines which exhibited a low degree of leaf rolling contained MDA content as high as those with a high degree of leaf rolling. This could suggest that the leaf rolling score is not a precise parameter in selecting rice for drought tolerance. While MDA content is closely related to the antioxidant enzyme activity and lipid oxidation which are important mechanisms that enable rice to tolerate drought. Furthermore, the strong correlation between the leaf rolling score and the MDA content is highlighted here, MDA content could be effectively used as a selection parameter in rice breeding for drought tolerance.

Keywords: rice (*Oryza sativa* L.), malondialdehyde, leaf rolling, drought stress, drought tolerance

Received: February 26, 2025/ Revised: April 18, 2025/ Accepted: April 18, 2025

* corresponding author E-mail: supatthra.n@rice.mail.go.th

[1)] สถาบันวิทยาศาสตร์ข้าวแห่งชาติ อ.เมือง จ.สุพรรณบุรี 72000 โทร. 0-3555-5340

Thailand Rice Science Institute, Mueang, Suphan Buri 72000 Tel. 0-3555-5340

[2)] ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี อ.เมือง จ.อุบลราชธานี 34000 โทร. 0-4534-4103

Ubon Rachathani Rice Research Center, Mueang, Ubon Ratchathani 34000 Tel. 0-4534-4103

บทคัดย่อ

ข้าว เป็นพืชที่ใช้น้ำปริมาณมากในการเพาะปลูก แต่ปัจจุบันพื้นที่เพาะปลูกข้าว กำลังประสบปัญหาการเปลี่ยนแปลงสภาพอากาศและขาดแคลนน้ำ สภาพแล้งส่งผลให้เกิดความเครียดในทางกายภาพซึ่งเป็นปัญหาที่สำคัญที่ทำให้ผลผลิตตลอดจนคุณภาพข้าวลดลง การปรับปรุงพันธุ์ข้าวทนแล้งจึงเป็นกลยุทธ์ที่สำคัญในการรับมือกับปัญหาภัยแล้ง ซึ่งการปรับปรุงพันธุ์จะประสบความสำเร็จได้จำเป็นต้องมีเครื่องมือตลอดจนดัชนีชี้วัดความทนแล้งในข้าวที่มีความแม่นยำ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการวิเคราะห์และใช้ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ (Malondialdehyde (MDA)) ควบคู่ไปกับการให้คะแนนการม้วนของใบข้าวเป็นเครื่องมือในการคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวทนแล้ง โดยทำการวิจัยในชุดประชากรข้าวที่ได้จากการผสมพันธุ์เชิงเดี่ยวระหว่างข้าวพันธุ์ IR57514 และพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 จำนวน 224 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับพันธุ์มาตรฐาน พันธุ์ทนแล้ง IR57514 และพันธุ์ทนแล้งปานกลาง IR1552 ขาวดอกมะลิ 105 และขาวปากหม้อ 148 ปลูกข้าวทดสอบในสภาพที่มีการให้น้ำปกติ และสภาพแล้ง วิเคราะห์ปริมาณ MDA ควบคู่กับการประเมินการม้วนของใบข้าวเมื่อทดสอบในสภาพแล้งในข้าวระยะแตกกอ ดำเนินงานที่ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี และสถาบันวิทยาศาสตร์ข้าวแห่งชาติ ระหว่างเดือนตุลาคม 2565 - กันยายน 2566 พบว่า ในสภาพการให้น้ำปกติข้าวทดสอบทั้งหมดมีการม้วนของใบอยู่ในระดับ 1 และมีปริมาณ MDA อยู่ในช่วง 3.56-7.00 μmol/g FW เมื่อข้าวชุดนี้อยู่ภายใต้สภาพแล้ง ปริมาณ MDA จะเพิ่มขึ้นอยู่ในช่วง 8.85-30.35 μmol/g FW และสายพันธุ์ข้าวส่วนใหญ่มีระดับการม้วนของใบอยู่ในระดับ 5 แต่มีสายพันธุ์ PSL99094-350-9-5R-21, PSL99093-108-3-5R-40, PSL99094-72-8-5R-2, PSL99093-108-4-5R-38, PSL99094-13-5-5R-25, PSL99094-32-1-5R-21 และ PSL99094-159-7-5R-21 มีปริมาณสาร MDA อยู่ในช่วง 8.86 ถึง 11.07 μmol/g FW และ มีระดับการม้วนของใบเมื่อขาดน้ำอยู่ที่ระดับ 1 เช่นเดียวกันกับข้าวที่ปลูกทดสอบในสภาพน้ำปกติ ทั้งยังพบว่าพันธุ์มาตรฐานทนแล้ง IR57514 เมื่อเผชิญสภาพแล้งมีปริมาณ MDA 12.10 μmol/g FW และมีการม้วนของใบระดับ 2 ผลการทดลองครั้งนี้ยังชี้ให้เห็นว่า สายพันธุ์ข้าวที่มีการม้วนของใบในระดับต่ำบางสายพันธุ์กลับมีปริมาณ MDA สูงในระดับเดียวกับกลุ่มที่มีระดับการม้วนของใบในระดับสูง ดังนั้น การใช้คะแนนการม้วนของใบข้าวในการคัดเลือกข้าวทนแล้งจึงอาจไม่ใช่วิธีการที่แม่นยำเพียงพอ ในขณะที่ปริมาณ MDA มีความสัมพันธ์โดยตรงกับกลไกการต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นกลไกสำคัญที่ทำให้ข้าวมีความสามารถในการทนแล้ง และยังมีความสัมพันธ์กับระดับการม้วนของใบข้าว ดังนั้น จึงสามารถใช้ปริมาณ MDA เป็นตัวบ่งชี้ความสามารถในทำงานของกลไกต้านอนุมูลอิสระในข้าวที่ปรับตัวในสภาพเครียดจากความแล้งได้ดี และใช้เป็นเครื่องมือในการคัดเลือกเพื่อปรับปรุงพันธุ์ข้าวทนแล้งให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

คำสำคัญ: ข้าว (*Oryza sativa* L.) มาลอนไดอัลดีไฮด์ การม้วนของใบ สภาพแล้ง ความทนแล้ง

คำนำ

ปัจจุบันทั่วโลกกำลังเผชิญกับปัญหาการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ (climate change) ที่ส่งผลกระทบต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์ในด้านต่างๆ รวมทั้งในด้านการเกษตรกรรม เนื่องจากปัญหาสภาพภูมิอากาศที่แปรปรวนเกิดขึ้นนั้นเป็นไปในแนวโน้มที่โลกจะมีอุณหภูมิที่สูงขึ้นและมีปริมาณน้ำฝนที่ลดลง ซึ่งจะส่งผลโดยตรงต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชอาหารที่สำคัญของประชาการโลกอย่างเช่น ข้าว (*Oryza sativa* L.) ซึ่งเป็นพืชที่ต้องใช้น้ำในการเพาะปลูกในปริมาณมากจึงเป็นพืชชนิดหนึ่งที่ได้รับผลกระทบโดยตรงจากปัญหาดังกล่าว การพัฒนาพันธุ์ข้าวทนแล้งหรือข้าวที่ใช้น้ำน้อยในการเพาะปลูก จึงเป็นทางออกหนึ่งที่จะช่วยรักษาความมั่นคงทางอาหารของโลกได้ สภาวะเครียดจากการขาดน้ำ (drought stress) ทำให้เกิดความเปลี่ยนแปลงทั้งทางด้านสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาในทุกระยะการเจริญเติบโตของข้าว (Boonjung and Fukai, 1996; Bunnag and Pongthai, 2013) โดยจะส่งผลกระทบต่อค่าดัชนีพื้นที่ใบ ความสูงของลำต้น ความยาวราก และจำนวนรวง เป็นต้น (Alou *et al.,* 2018) ข้าวที่เผชิญกับสภาวะเครียดจากการขาดน้ำจะเริ่มแสดงอาการโดยเกิดการม้วนของใบข้าว (leaf rolling) ซึ่งเป็นลักษณะที่เกิดขึ้น

เมื่อข้าวพยายามปรับตัวเพื่อลดการสูญเสียน้ำด้วยการลดขนาดพื้นที่ของใบ (Ji *et al.,* 2012) หากมีการขาดน้ำในระดับรุนแรงการลดขนาดพื้นที่ใบข้าวอาจเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการเจริญเติบโตของใบ โดยมีการยับยั้งกระบวนการขยายตัวและเพิ่มจำนวนของ mesophyll cells ในใบทำให้เกิดผลกระทบต่อเนื่องทำให้เกิดกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงที่ลดลง ซึ่งส่งผลโดยตรงทำให้ข้าวมีผลผลิตที่ลดลง (Davatgar *et al*., 2012; Sruthi *et al*., 2024; Wang *et al.,* 2023)

การม้วนของใบข้าวเกิดขึ้นเนื่องจากความเปลี่ยนแปลงของแรงดันเต่ง (turgor pressure) ภายในกลุ่มเซลล์รูปพัด (bulliform cells) ที่อยู่บริเวณชั้นผิว (epidermis) ของใบข้าว (Alvarez *et al*., 2008; Mader *et al*., 2020) โดยค่าแรงดันเต่งในใบข้าวมีความสัมพันธ์โดยตรงกับค่าชลศักย์ (water potential) ในใบ ใบข้าวเกิดการม้วนจากการที่ค่าชลศักย์ และแรงดันเต่ง ในใบมีค่าลดลง (Gunnula *et al*., 2022) และระดับการม้วนของใบข้าวนั้นยังขึ้นอยู่ค่าการนำที่ปากใบ (stomatal conductance) และการนำน้ำ (hydraulic conductance) ของใบข้าว และมีรายงานการวิจัยต่างๆ ที่แสดงให้เห็นว่าระดับการม้วนของใบ (leaf rolling score) นั้น มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับค่าความแล้ง (drought score) โดยใบที่มีระดับการม้วนของใบ เท่ากับ 1 และค่าความแล้งที่ระดับ 1 ใบข้าวจะมีลักษณะปกติ ไม่แสดงอาการเครียดจากความแล้ง และเมื่อ ระดับการม้วนของใบ มีค่าสูงขึ้นค่าความแล้ง ก็มีค่าสูงขึ้นตามไปด้วยและใบข้าวจะมีลักษณะแห้ง ขาดน้ำเพิ่มขึ้น จนในระดับที่ระดับการม้วนของใบ เท่ากับ 5 และค่าความแล้ง ที่ระดับ 5 ใบข้าวร้อยละ 50 ของทั้งต้นที่บริเวณใบลักษณะแห้งประมาณ ¼ ของความยาวใบทั้งหมด และมีใบข้าวร้อยละ 25 ที่ทั้งใบมีสีน้ำตาลและตาย (Fen *et al*., 2015; Wang *et al*., 2023) โดยมีการค้นพบว่าระดับการม้วนของใบข้าวนั้นสัมพันธ์กับปริมาณน้ำสัมพัทธ์ (relative water content) และการรั่วไหลของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane leakage) หากใบข้าวม้วนเข้าหากันยิ่งมากเท่าไหร่ ยิ่งแสดงถึงปริมาณที่ลดลงและมีการสลายของเยื่อหุ้มเซลล์สูงมาก (Sruthi *et al*., 2024) ทั้งนี้ปัจจุบันยังไม่สามารถระบุความทนแล้งได้จากระดับการม้วนของใบ ได้โดยตรง เนื่องจากกลไกความทนแล้งนั้นมีความซับซ้อนเกี่ยวข้องกับการทำงานของกลไกต่างๆ ร่วมกันหลายกลไก ทำให้ต้องอาศัยการประเมินลักษณะทางทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของข้าวลักษณะอื่นๆ ร่วมด้วยในการคัดเลือกข้าวที่มีความทนแล้ง

เมื่อพืชเกิดความเครียดจากการขาดน้ำในระหว่างกระบวนการเติบโตทางใบในระยะแตกกอ จะทำให้มีการพัฒนาการทางใบที่ลดลง ทั้งใบข้าวมีขนาดพื้นที่ใบลดลง การแตกกอน้อย และอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงลดลง เนื่องจากการขาดน้ำจะชักนำให้เกิดการปิดของปากใบ พืชจึงมีการหายใจและการแลกเปลี่ยนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ลดลง ซึ่งยังส่งผลต่อเนื่องทำให้เกิดอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species; ROS) ชนิดต่างๆ เพิ่มมากขึ้นภายในเซลล์ ซึ่ง ROS เหล่านี้จะทำลายส่วนต่างๆ ของเซลล์พืช ทั้งส่วนโครงสร้างของเซลล์ และยังสามารถทำให้ดีเอ็นเอเสียหาย โปรตีนเกิดการเสื่อมสภาพ ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (lipid oxidation) เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย เกิดภาวะการรั่วไหลของเยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลเสียต่อกลไกการทำงานต่างๆ ภายในเซลล์พืช โดยเฉพาะกระบวนการเมแทบอลิซึม จนทำให้พืชตายในที่สุด โดยในระหว่างที่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในเซลล์พืชอันเป็นผลจากการที่ภายในเซลล์ปริมาณอนุมูลอิสระมากเกินไปนี้ พืชจะมีการผลิต malondialdehyde (MDA) ควบคู่กันด้วย

MDA จัดเป็นสารเคมีในกลุ่ม ß-dicarbonyls ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acid) ดังนั้น MDA จึงเปรียบเสมือนเครื่องหมายบ่งชี้ถึงการเสื่อมสลายของเซลล์พืชที่เกิดขึ้นจากความเครียดในสภาพแล้ง (Zhang *et al*., 2021) ซึ่งในพืชทนแล้งจะมีการทำงานของกลไกที่เกี่ยวข้องกับการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) เช่น มีการสังเคราะห์เอนไซม์ superoxide dismutase, peroxidase, catalase ที่ทำหน้าที่สลายอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นในสภาพแล้ง ทำให้ลดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน และมีการสังเคราะห์ MDA ที่ลดลงและทนทานต่อสภาพแล้งได้ดี (Gutiérrez-Martínez *et al.,* 2020*;* Jarin *et al*., 2024; Ma *et al*., 2024) ทำให้ปัจจุบันมีการใช้ปริมาณของ MDA เป็นตัวบ่งชี้ของความทนแล้งในพืชรวมทั้งในข้าวอีกด้วย

งานวิจัยนี้จึงได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณ MDA เพื่อประเมินความสามารถในการทนแล้งในข้าว และศึกษาความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาเป็นอีกวิธีการในการคัดเลือกข้าวพันธุ์ทนแล้ง ทั้งนี้ตั้งแต่ในอดีตจนถึงปัจจุบันได้ใช้วิธีการและมาตรฐานของสถาบันวิจัยข้าวระหว่างประเทศ (The International Rice Research Institute (IRRI)) โดยพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของข้าวเป็นหลัก เช่น การม้วนของใบ ใบแห้งตาย เมล็ดลีบ เป็นต้น อีกทั้งยังมีข้อมูลค่อนข้างจำกัดเกี่ยวกับสาร MDA ในข้าวที่สัมพันธ์กับการทนแล้ง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ MDA ควบคู่ไปกับการให้คะแนนอาการม้วนของใบข้าวในระยะแตกกอ เป็นการพัฒนาวิธีการคัดเลือกข้าวทนแล้งให้มีประสิทธิภาพ สำหรับใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวทนแล้งต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

1. พันธุ์ข้าวและการปลูกข้าวทดสอบ

กลุ่มประชากรข้าวจำนวน 224 สายพันธุ์ ที่ได้จากการผสมพันธุ์เชิงเดี่ยวระหว่างข้าวสายพันธุ์ IR57514 และพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก และพันธุ์มาตรฐานเปรียบเทียบ ได้แก่ พันธุ์ข้าวทนแล้ง IR57514 และพันธุ์ข้าวทนแล้งระดับปานกลาง 3 พันธุ์ได้แก่ IR1552 ขาวดอกมะลิ 105 และขาวปากหม้อ 148

วางแผนการทดลองแบบ factorial in RCBD (Randomized Complete Block Design) 3 ซ้ำ มี 2 ปัจจัย คือ (1) พันธุ์ข้าว และ (2) การให้น้ำ 2 แบบ คือ (1) แบบให้น้ำปกติ (well-watered condition) และ (2) แบบสภาพแล้ง (drought stress condition)

การปลูกข้าวทดสอบดำเนินการที่ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี ระหว่างเดือนกันยายน-พฤศจิกายน 2565 ซึ่งมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 25 ถึง 32 องศาเซลเซียส และมีค่าความชื้นในอากาศอยู่ในช่วง 62-93 เปอร์เซ็นต์ โดยปลูกในสภาพแปลงทดลองขนาด 5x4 เมตร ขนาดของระยะระหว่างต้นและแถว 20x20 เซนติเมตร ปลูกโดยวิธีการหยอดเมล็ดข้าวแห้ง จำนวน 1 เมล็ดต่อหลุม รักษาระดับน้ำไว้ 10 เซนติเมตร โดยข้าวชุดทดสอบในแบบให้น้ำปกติจะมีการขังน้ำตลอดระยะเวลาการทดสอบ และสำหรับชุดข้าวทดสอบในแบบสภาพแล้ง ทำให้เกิดสภาพแล้งโดยระบายน้ำออกจากแปลงเมื่อข้าวอายุได้ 7 สัปดาห์ โดยระบายน้ำออกทันที และปล่อยให้ดินแห้งเป็นเวลา 20 วัน ในระหว่างนี้ทำการวัดความชื้นในดิน (soil moisture content) ทุกๆ 7 วัน ด้วย Soil Moisture Sensor (WatchDog 1000 series, Spectrum Technologies, Illinois, USA) ที่ระดับความลึก 30 เซนติเมตร ค่าชลศักย์ของดินในระหว่างงดให้น้ำมีค่าตั้งแต่ -8 kPa ถึง -26 kPa ในวันที่ 20 ของการงดให้น้ำ

Table 1 Scale of rice leaf rolling at the vegetative stage

Scale	Symptom
0	Leaves healthy
1	Leaves start to fold (shallow)
3	Leaves folding (deep V-shape)
5	Leaves fully cupped (U-shape)
7	Leaf margins touching (0-shape)
9	Leaves tightly rolled (V-shape)

2. การประเมินค่าการม้วนของใบข้าว

ประเมินการตอบสนองต่อสภาพแล้งของข้าวชุดทดสอบในระยะแตกกอโดยการสังเกต (visual score) การม้วนของใบข้าว ตาม Standard Evaluation System for Rice (IRRI, 2014) ภายหลังจากงดให้น้ำแล้วเป็นเวลา 20 วัน โดยให้คะแนนการม้วนใบ 1 ครั้งต่อสัปดาห์ ในช่วงเที่ยงวัน (12.00-14.00 น.) จำนวนสายพันธุ์ละ 10 กอ โดยมีคะแนนระดับการม้วนใบ 6 ระดับ ตั้งแต่ 0 ถึง 9 (Table 1)

3. การวิเคราะห์ปริมาณ Malondialdehyde (MDA)

การวิเคราะห์ปริมาณ MDA จากใบข้าวสด โดยใช้ตัวอย่างใบข้าวในส่วนที่กว้างที่สุดของใบในแต่ละสายพันธุ์/พันธุ์ จำนวน 3 ซ้ำ โดยดัดแปลงจากวิธีของ Velikova และคณะ (2000) โดยบดตัวอย่างใบข้าว 500 มิลลิกรัม ใน 0.10% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

นำสารละลายส่วนใสด้านบน (supernatant) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาผสมกับ 0.5% (w/v) thiobarbituric acid (TBA) ใน 20% (w/v) TCA ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

นำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาแช่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายส่วนบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 และ 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (BioMate 3S, Thermo Scientific, Wisconsin, USA) นำค่าที่วัดได้ไปคำนวนหาปริมาณ MDA จากสูตรคำนวณ ดังนี้

ปริมาณ MDA (µmol/g fresh weight (FW))

$= [((A532-A600)/(155x1)) \times V_f \times (V_e/V_a)] / W$

เมื่อ

A532 = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร

A600 = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

V_f = ปริมาตรสุดท้าย (มิลลิลิตร)

V_e = ปริมาตรสารละลาย TCA ที่ใช้สกัด (มิลลิลิตร)

V_a = ปริมาตรสารสกัดพืชที่ใช้วิเคราะห์ (มิลลิลิตร)

W = น้ำหนักสดตัวอย่างใบข้าว (กรัม)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณ MDA ระหว่างข้าวชุดที่มีการให้น้ำแบบให้น้ำปกติ และชุดที่ทดสอบในสภาพแล้ง ทำโดยใช้การทดสอบ t-test ($P < 0.01$) ส่วนการวิเคราะห์ความแตกต่างของปริมาณ MDA ของข้าวแต่ละกลุ่มที่มีการจัดกลุ่มตามค่าการม้วนใบ ทำโดยใช้วิธี Wilcoxon Signed-Rank test และ Bonferroni test

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ระดับการม้วนของใบข้าว (leaf rolling score) เมื่อทดสอบในสภาพแล้งในระยะแตกกอ

ผลการทดสอบประชากรข้าวจำนวน 228 สายพันธุ์/พันธุ์ ในระยะแตกกอ ภายใต้สภาพแล้งโดยงดการให้น้ำเป็นเวลา 20 วัน พบว่า ข้าวชุดนี้ส่วนใหญ่ (จำนวน 114 สายพันธุ์) มีการม้วนของใบในระดับ 3 และมีพบข้าวจำนวน 7 สายพันธุ์ที่มีการม้วนของใบในระดับ 1 (Fig. 2) ได้แก่ สายพันธุ์ PSL99094-350-9-5R-21, PSL99093-108-3-5R-40, PSL99094-72-8-5R-2, PSL99093-108-4-5R-38, PSL99094-13-5-5R-25, PSL99094-32-1-5R-21 และ PSL99094-159-7-5R-21 ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการทนต่อความแล้งได้ดี โดยเปรียบเทียบกับข้าวชุดทดสอบภายใต้สภาพการให้น้ำปกติ ซึ่งไม่เกิดความเครียดจากการขาดน้ำ ทำให้มีการม้วนของใบอยู่ในระดับ 1 คือ ไม่มีการม้วนของใบข้าวเช่นกัน ส่วนการม้วนของใบข้าวของพันธุ์มาตรฐานเปรียบเทียบ IR57514, IR1552, ขาวดอกมะลิ 105 และขาวปากหม้อ 148 อยู่ในระดับ 3 3 5 และ 5 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยของ Bunnag และ Pongthai (2013) ทำการทดสอบข้าวสายพันธุ์ IR57514 และขาวดอกมะลิ 105 ในระยะแตกกอ ในสภาพแล้งในขณะที่ข้าวมีอายุได้ 40 วัน พบว่า

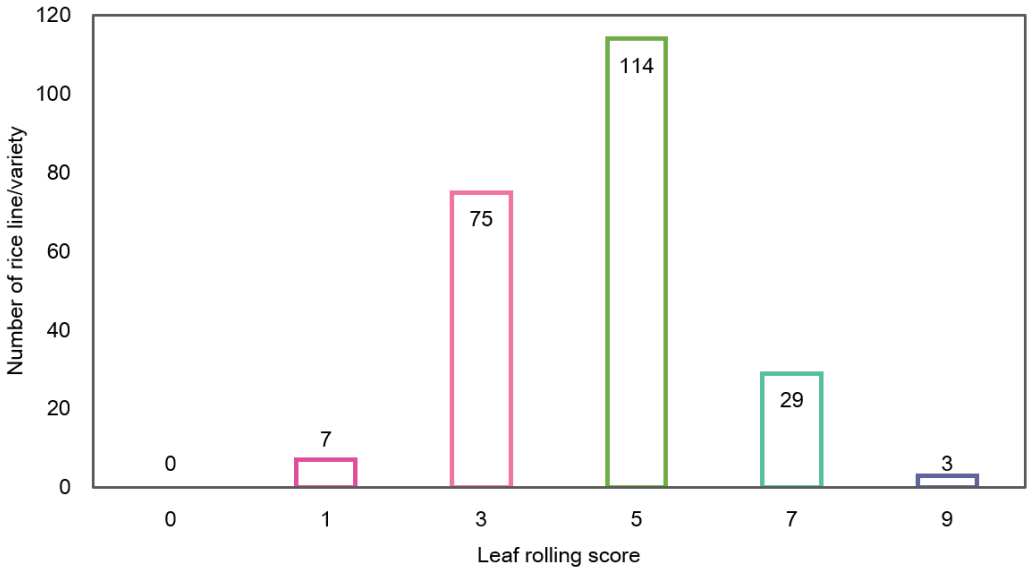

Fig. 1 Leaf rolling score of 228 rice lines/varieties under drought-stress conditions

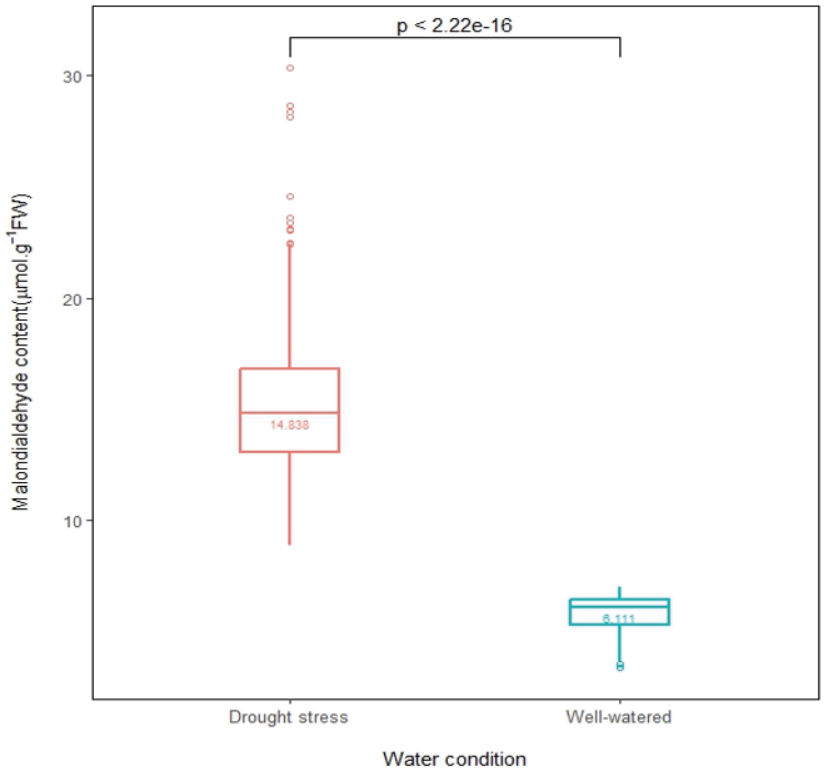

Fig. 2 MDA content in leaves of 7 weeks vegetative stage rice plants under well-watered conditions and treated to drought stress by withholding water for 20 days. The digits inside the boxes indicate the median

มีการม้วนของใบข้าวในระดับ 3

2. ปริมาณ Malondialdehyde (MDA content) เมื่อทดสอบในสภาพแล้งในระยะแตกกอ

ผลการวิเคราะห์ปริมาณ MDA ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นในข้าวทั้ง 228 สายพันธุ์/พันธุ์ เมื่ออยู่ในสภาพแล้งเปรียบเทียบกับการให้น้ำตามปกติ พบว่า ในสภาวะการปลูกทดสอบที่มีการให้น้ำปกติข้าวทั้ง 228 สายพันธุ์/พันธุ์ มีปริมาณ MDA อยู่ในช่วง 3.56-7.00 µmol/g FW และข้าวชุดนี้มีการสังเคราะห์ MDA เพิ่มขึ้นเมื่ออยู่ในสภาพแล้ง โดยปริมาณ MDA ที่พบอยู่ในช่วง 8.85-30.35 µmol/g FW (Fig. 2)

เมื่อทำการแบ่งกลุ่มข้าวในการทดลองทั้งหมดออกเป็น 5 กลุ่มตามคะแนนการม้วนของใบข้าว พบว่า ปริมาณของ MDA ของทั้ง 5 กลุ่มที่ทดสอบในสภาพแล้งนั้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Fig. 3) โดยกลุ่มที่มีระดับคะแนนการม้วนของใบเท่ากับ 1 3 5 7 และ 9 เมื่อเผชิญกับสภาวะเครียดจากการขาดน้ำมีการสังเคราะห์สาร MDA คิดเป็นค่าเฉลี่ยคือ 9.81 13.61 15.48 19.13 และ 26.11 µmol/g FW ตามลำดับ

ผลการวิเคราะห์ปริมาณ MDA ในข้าวที่ปลูกทดสอบในสภาพแล้งทั้ง 228 สายพันธุ์/พันธุ์ พบว่า สายพันธุ์ PSL99094-350-9-5R-21 มีปริมาณ MDA น้อยที่สุด และมีคะแนนการม้วนของใบข้าวในสภาพแล้งระดับ 1 ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการทนแล้งของข้าวสายพันธุ์นี้ ในทำนองเดียวกันยังพบว่า ข้าวทดสอบที่มีปริมาณ MDA มากที่สุดในสภาพแล้ง ได้แก่ สายพันธุ์ PSL99094-162-1-5R-21 ซึ่งมีปริมาณ MDA เท่ากับ 30.35 µmol/g FW และมีระดับการม้วนของใบข้าวในสภาพแล้งระดับ 9 แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ในเชิงบวกของลักษณะการม้วนของใบข้าวและปริมาณ MDA (Fig. 3)

ผลการวิเคราะห์ปริมาณ MDA ในข้าวที่ปลูกทดสอบในสภาพแล้งทั้ง 228 สายพันธุ์/พันธุ์ พบว่า สายพันธุ์ PSL99094-350-9-5R-21 มีปริมาณ MDA น้อยที่สุด และมีคะแนนการม้วนของใบข้าวในสภาพแล้งระดับ 1 แสดงถึงความสามารถในการทนแล้งของข้าวสายพันธุ์นี้ และในทำนองเดียวกันยังพบว่าข้าวทดสอบที่มีปริมาณ MDA

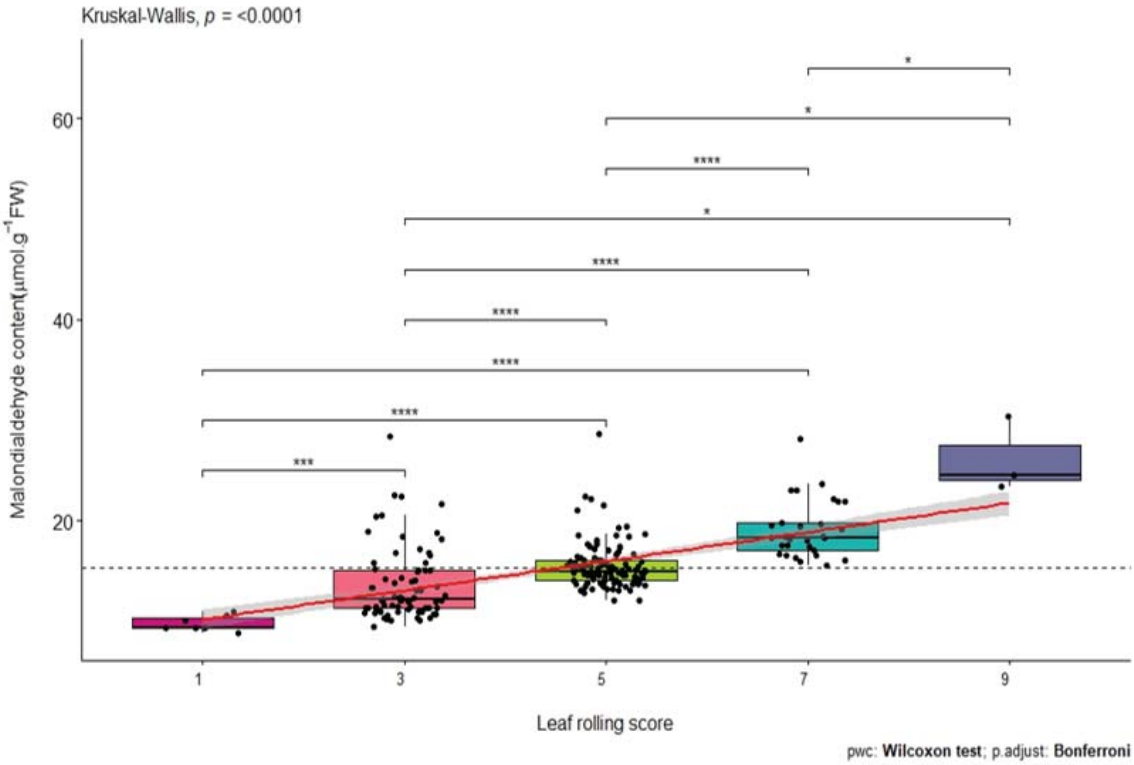

Fig. 3 Malondialdehyde content of 228 rice lines/varieties under drought stress conditions classified by leaf rolling score. Asterisks indicate significant differences between the leaf rolling score groups according to pairwise comparisons using the Wilcoxon signed-rank test with Bonferroni correction (*< 0.01,**<0.001, ***< 0.0001, ****< 0.00001). Red line indicates the linear model trendline

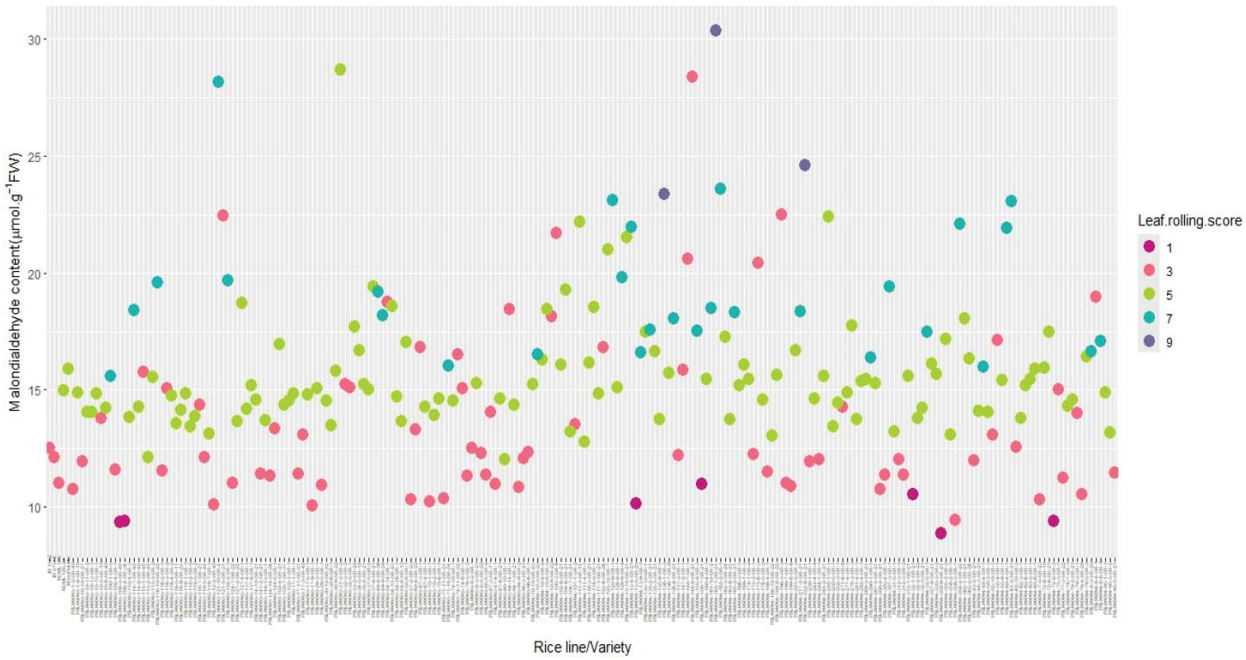

Fig. 4 Malondialdehyde content of 228 rice lines/varieties under drought stress conditions. Different leaf rolling scores are illustrated with different colour dots

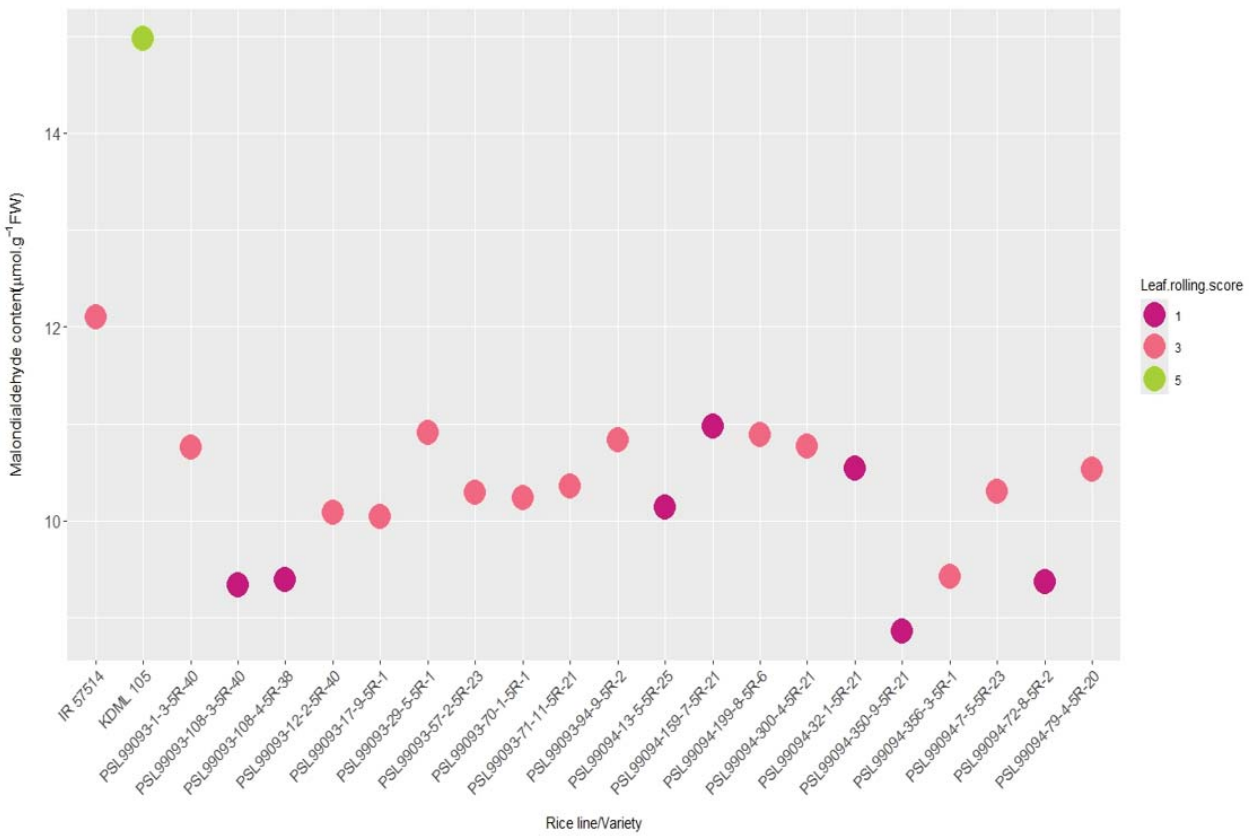

Fig. 5 Selected top 20 rice lines with low MDA content under drought stress conditions, including IR57514 and KDML105

มากที่สุดในสภาพแล้ง ได้แก่สายพันธุ์ PSL99094-162-1-5R-21 ซึ่งมีปริมาณ MDA เท่ากับ 30.35 μmol/g FW และมีระดับการม้วนของใบข้าวในสภาพแล้งระดับ 9 แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ในเชิงบวกของลักษณะการม้วนของใบข้าวและปริมาณของสาร MDA (Fig. 4)

ผลการวิเคราะห์ข้าวที่ปลูกในสภาพแล้ง พบว่าปริมาณ MDA ในข้าวพันธุ์ IR57514 และขาวดอกมะลิ 105 มีค่าเท่ากับ 12.10 และ 15.08 μmol/g FW ตามลำดับ และพบว่า มีข้าวจำนวน 7 สายพันธุ์ได้แก่ สายพันธุ์ PSL99094-350-9-5R-21, PSL99093-108-3-5R-40, PSL99094-72-8-5R-2, PSL99093-108-4-5R-38, PSL99094-13-5-5R-25, PSL99094-32-1-5R-21 และ PSL99094-159-7-5R-21 ที่ไม่เพียงแต่จะมีปริมาณ MDA น้อยเช่นเดียวกับพันธุ์ IR57514 แต่ยังมีค่าการม้วนของใบอยู่ในระดับ 1 อีกด้วย (Fig. 5) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงว่าสายพันธุ์ข้าว 7 สายพันธุ์นี้ มีความสามารถในการปรับตัวในสภาวะเครียดที่เกิดจากการขาดน้ำได้เป็นอย่างดี จากการที่มีปริมาณ MDA น้อยหมายถึงการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันของเซลล์นั้นอยู่ในระดับต่ำ และเยื่อหุ้มเซลล์ยังคงมีเสถียรภาพที่ดี (Zhang *et al*., 2021) โดย PSL99094-350-9-5R-21 เป็นสายพันธุ์ ที่พบว่ามีปริมาณ MDA น้อยที่สุด (8.86 μmol/g FW) เมื่อทำการทดสอบในสภาพแล้งซึ่งเพิ่มขึ้นจากปริมาณ MDA ที่ตรวจพบในข้าวสายพันธุ์นี้เมื่อปลูกข้าวแบบให้น้ำปกติ (6.61 μmol/g FW) คิดเป็นส่วนต่าง 2.25 μmol/g FW แสดงให้เห็นถึงกลไกในการกำจัดอนุมูลอิสระที่ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพส่งผลให้มีการผลิต MDA ในปริมาณไม่มากนักอีกด้วย (Hossen, 2017; Jarin *et al*., 2024)

Pamuta และคณะ (2022) รายงานผลการวิจัยที่ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณ MDA และการทำงานของเอนไซม์ (enzyme activity) ที่ทำหน้าที่ในการสลายอนุมูลอิสระ ได้แก่ superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, และ catalase ในข้าวพันธุ์ DH103 ซึ่งเป็นพันธุ์ทนแล้ง รวมทั้งพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และสายพันธุ์ทนแล้งที่คัดเลือกได้จากการปรับปรุงพันธุ์โดยการผสมระหว่างข้าวพันธุ์ DH103 และพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 จำนวน 4 สายพันธุ์

พบว่า พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เป็นพันธุ์ที่มีปริมาณ MDA มากที่สุดและมีค่าการทำงานของเอนไซม์ของ superoxide dismutase, ascorbate peroxidase และ catalase น้อยที่สุด แสดงถึงความสัมพันธ์แบบ negative correlation ระหว่างปริมาณ MDA กับกลไกการต้านอนุมูลอิสระรวมทั้งความทนแล้งในข้าว

สรุปผลการทดลอง

การประเมินการตอบสนองต่อความเครียดภายใต้สภาพแล้งในกลุ่มประชากรข้าวที่ได้จากการผสมเชิงเดี่ยวระหว่างข้าวสายพันธุ์ IR57514 และพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (IR57514xKDML105) จำนวน 224 สายพันธุ์ และพันธุ์มาตรฐานเปรียบเทียบ พันธุ์ทนแล้ง IR57514 และพันธุ์ทนแล้งระดับปานกลาง IR1552 ขาวดอกมะลิ 105 และขาวปากหม้อ 148 ทดสอบในข้าวระยะแตกกอ โดยการวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ (MDA) ควบคู่กับการประเมินการม้วนของใบข้าว พบว่า ในสภาพการให้น้ำแบบปกติข้าวทุกสายพันธุ์/พันธุ์ไม่แสดงอาการม้วนของใบ คือมีการม้วนของใบระดับ 1 แต่เมื่อทำการทดสอบในสภาพแล้งโดยงดการให้น้ำเป็นเวลา 20 วัน พบว่า พันธุ์ทนแล้งมาตรฐานเปรียบเทียบ ได้แก่ IR57514 และ IR1552 มีการม้วนของใบในระดับ 3 ส่วนพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และขาวปากหม้อ 148 มีการม้วนของใบในระดับ 5 จากผลการศึกษาครั้งนี้ เป็นที่น่าสนใจที่พบว่า มีข้าวจำนวน 7 สายพันธุ์แสดงลักษณะการม้วนของใบในระดับ 1 และจำนวน 75 สายพันธุ์ มีการม้วนของใบในระดับ 3 แต่เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์ปริมาณ MDA ของสายพันธุ์ข้าวที่มีการม้วนใบระดับ 3 พบว่า มีหลายสายพันธุ์ที่มีปริมาณ MDA มากกว่า 20 μmol/g FW ซึ่งใกล้เคียงกับปริมาณ MDA ที่พบในกลุ่มที่มีคะแนนการม้วนใบเท่ากับ 9 แสดงให้เห็นว่าการใช้เพียงคะแนนการม้วนของใบข้าวอาจไม่สามารถใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวทนแล้งได้อย่างแม่นยำ ที่น่าสนใจคือประชากรข้าวชุดนี้ประกอบด้วยสายพันธุ์ PSL99094-350-9-5R-21, PSL99093-108-3-5R-40, PSL99094-72-8-5R-2, PSL99093-108-4-5R-38, PSL99094-13-5-5R-25, PSL99094-32-1-5R-21 และ PSL99094-159-7-5R-21 แสดงลักษณะการม้วนของใบข้าวในระดับ 1 และมีการผลิต MDA ในปริมาณน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์/สายพันธุ์อื่นๆ เมื่อทำการทดสอบในสภาพแล้ง โดย PSL99094-350-9-5R-21 เป็นสายพันธุ์ที่มีปริมาณ MDA น้อยที่สุด (8.86 μmol/g FW) ซึ่งเพิ่มขึ้นจากค่า MDA ที่ตรวจพบเมื่อปลูกข้าวแบบให้น้ำปกติ (6.61 μmol/g FW) คิดเป็นส่วนต่าง 2.25 μmol/g FW อย่างไรก็ตาม หากเปรียบเทียบปริมาณ MDA ในข้าวชุดที่ปลูกโดยมีการให้น้ำปกติจะพบว่าข้าวทุกพันธุ์/สายพันธุ์ในการวิจัยนี้มีการผลิต MDA เพิ่มขึ้นเมื่อเกิดความเครียดจากถูกทดสอบในสภาพแล้ง แต่ข้าวพันธุ์ทนแล้งนั้นมีแนวโน้มที่จะผลิต MDA เพิ่มขึ้นในอัตราส่วนที่น้อยกว่าข้าวพันธุ์ที่ไม่ทนแล้ง ดังเช่น ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เมื่อปลูกในสภาพน้ำปกติและสภาพแล้ง พบว่ามีปริมาณ MDA เท่ากับ 6.27 และ 15.08 μmol/g FW ตามลำดับ

จากผลการทดลองครั้งนี้ แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่จะใช้ปริมาณ MDA เป็นดัชนีบ่งชี้ความทนแล้งของข้าวได้ และช่วยให้การคัดเลือกข้าวทนแล้งมีความแม่นยำและมีประสิทธิภาพมากขึ้นกว่าการใช้เพียงลักษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถนำไปปรับใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวทนแล้งได้อย่างประสิทธิภาพอีกวิธีการหนึ่ง ทั้งนี้จำเป็นต้องมีการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณ MDA ให้ดียิ่งขึ้นโดยวิธีการเพิ่มขั้นตอนการกำจัดสารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตเข้าไปในกระบวนการสกัด MDA จากใบข้าว เป็นต้น

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณผู้ร่วมดำเนินงานวิจัย และเจ้าหน้าที่สถาบันวิทยาศาสตร์ข้าวแห่งชาติ และศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานีทุกท่าน ที่ร่วมกันดำเนินงานทั้งในแปลงทดลองและห้องปฏิบัติการ และอำนวยความสะดวกในงานวิจัยนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

Alou, I.N., J.M. Steyn, J.G. Annandale and M. Van Der Laan. 2018. Growth, phenological, and yield response of upland rice (*Oryza sativa* L. Cv. Nerica 4) to water stress during different growth stages. Agricultural Water Management 198 (February): 39-52.

Alvarez, J.M., J.F. Rocha and S.R. Machado. 2008. Bulliform cells in *Loudetiopsis Chrysothrix* (Nees)

conert and *Tristachya Leiostachya* Nees (Poaceae): structure in relation to function. Brazilian Archives of Biology and Technology 51(1): 113-19.

Boonjung, H. and S. Fukai. 1996. Effects of soil water deficit at different growth stages on rice growth and yield under upland conditions. 2. Phenology, biomass production and yield. Field Crops Research 48(1): 47-55.

Bunnag, S. and P. Pongthai. 2013. Selection of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars tolerant to drought stress at the vegetative stage under field conditions. American Journal of Plant Sciences 04(09): 1701-1708.

Davatgar, N., M.R. Neishabouri, A.R. Sepaskhah and A. Soltani. 2012. Physiological and morphological responses of rice (*Oryza sativa* L.) to varying water stress management strategies. International Journal of Plant Production 3(4): 19-32.

Fen, L.L., M.R. Ismail, B. Zulkarami, M.S. Rahman and M.R. Islam. 2015. Physiological and molecular characterization of drought responses and screening of drought tolerant rice varieties. Bioscience Journal 31(3): 709-718.

Gunnula, W., N. Kanawapee, P. Somta and P. Phansak. 2022. Evaluating anatomical characteristics associated with leaf rolling in northeastern Thai rice cultivars during drought by decision tree. Acta Agrobotanica 75 (December).

Gutiérrez-Martínez, P.B., M.I. Torres-Morán, M.C. Romero-Puertas, J. Casas-Solís, P. Zarazúa-V, E. Sandoval-Pinto and B.C. Ramírez-Hernández. 2020. Assessment of antioxidant enzymes in leaves and roots of phaseolus vulgaris plants under cadmium stress//Evaluación de enzimas antioxidantes en hojas y raíces de plantas Phaseolus vulgaris bajo estrés de cadmio. Biotecnia 22(2): 110-118.

Hossen, M. 2017. Comparative physiology of salinity and drought stress tolerance in indica and japonica rice seedlings. Sher-e-Bangla Agricultural University.

IRRI. 2014. Standard Evaluation System for rice (SES). 5th eds., International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines. 57 p.

Jarin, A.S., M.M. Islam, A. Rahat, S. Ahmed, P. Ghosh and Y. Murata. 2024. Drought stress tolerance in rice: Physiological and biochemical insights. International Journal of Plant Biology 15(3): 692-718.

Ji, K., Y. Wang, W. Sun, Q. Lou, H. Mei, S. Shen and H. Chen. 2012. Drought-responsive mechanisms in rice genotypes with contrasting drought tolerance during reproductive stage. Journal of Plant Physiology 169(4): 336-344.

Ma, Y., E. Agathokleous, Y. Xu, R. Cao, L. He and Z. Feng. 2024. Cultivar-specific regulation of antioxidant enzyme activity and stomatal closure confer tolerance of wheat to elevated ozone: A two-year open-field study with five cultivars. Plant Stress 12(June): 100479.

Mader, A., M. Langer, J. Knippers and O. Speck. 2020. Learning from plant movements triggered by bulliform cells: The biomimetic cellular actuator. Journal of The Royal Society Interface 17(169): 20200358.

Pamuta, D., M. Siangliw, J. Sanitchon, J. Pengrat, J.L. Siangliw, T. Toojinda and P. Theerakulpisut. 2022. Physio-biochemical traits in improved KDML105 jasmine rice lines containing drought and salt tolerance gene under drought and salt stress. Chilean Journal of Agricultural Research 82(1): 97-110.

Sruthi, P., U. Surendran, H.M. Siddiqui and S. Alamri. 2024. Understanding the leaf rolling of paddy and exploring its management options under aerobic rice. Scientific Reports 14(1): 19335.

Velikova, V., I. Yordanov and A. Edreva. 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. Plant Science 151(1): 59-66.

Wang, X., J. Huang, S. Peng and D. Xiong. 2023. Leaf rolling precedes stomatal closure in rice (*Oryza sativa*) under drought conditions. J. Lunn (ed.). Journal of Experimental Botany 74(21): 6650-6661.

Zhang, Y., Q. Luan, J. Jiang and Y. Li. 2021. Prediction and utilization of malondialdehyde in exotic pine under drought stress using near-infrared spectroscopy. Frontiers in Plant Science 12 (October): 735275.