การใช้เชื้อราอาบัสคูลาร์ ไมคอร์ไรซา เพื่อเพิ่มการดูดซับสังกะสีของข้าวภายใต้การปลูกข้าวแบบใช้อากาศ

Using arbucular mycorrhizal fungi for enhancement of zinc uptake of rice under aerobic rice cultivation

ศุภธิดา อ่ำทอง[1*] และ ชฎาพร อุปนันท์[1]

Suphathida Aumtong[1*] and Chadaporn Uppanun[1]

บทคัดย่อ: ปัญหาการขาดแคลนสังกะสี (Zn) ของข้าวที่ปลูกในระบบมีน้ำขัง เป็นปัญหาที่พบได้ทั่วไปในการเพาะปลูกพืชกลุ่มธัญพืช การเพิ่มความเป็นประโยชน์ของ Zn ให้แก่ข้าว ด้วยการใช้ประโยชน์จากเชื้อราอาบัสคูลาร์ ไมโครไรซา (arbuscular mycorrhizal fungi, AMF) เป็นวิธีการหนึ่งที่ช่วยแก้ปัญหาเหล่านี้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของปลูกข้าวพันธุ์สันป่าตอง 1 ภายใต้การให้น้ำที่ระดับความชื้นของดินสองรูปแบบคือท่วมขัง (continuous water-logging) และระดับความชื้น 0.3 bar ของดิน โดยเปรียบเทียบผลระหว่างการไม่ปลูกเชื้อรา AMF และปลูกเชื้อ *Glomus geosporum G. etunicatum* และ *Acaulospora foveata* เมื่อข้าวมีอายุ 60 วัน ตรวจวัดปริมาณ Zn ที่สกัดได้ในดิน น้ำหนักแห้งของต้น การดูดซับ Zn ของข้าว และการเข้าอาศัยในรากของเชื้อรา AMF (Root colonization) พบว่าข้าวที่ปลูกทั้งสองระบบความชื้น ที่มีการใส่หัวเชื้อ AMF ชนิดต่างๆ นั้น มีแนวโน้มน้ำหนักแห้งสูงกว่าดินที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อลงไป โดยเฉพาะการใส่หัวเชื้อ *A. foveata* มีน้ำหนักแห้งของส่วนต้นสูงที่สุดและมีการดูดซับ Zn สูงสุด สำหรับค่าการเข้าอาศัยในรากของเชื้อรา AMF พบว่าการใส่เชื้อ *G. geosporum* มีค่าการเข้าอยู่อาศัยในรากสูงที่สุด คือ 61.53 % ในขณะที่ดินที่ไม่มีการใส่เชื้อ มีการเข้าอาศัยของไมคอร์ไรซา เท่ากับ 5.12 % นอกจากนี้ ยังพบว่าค่า Mycorrhizal responsivness (MR) และ Mycorrhizal Zn responsivness (MZnR) ในดินที่มีความชื้น 0.3 bar ซึ่งปลูกเชื้อรา AMF สูงกว่าดินที่มีน้ำขัง
คำสำคัญ: อาบัสคูลาร์ไมโครไรซ่า, สังกะสี, การปลูกข้าวแบบใช้อากาศ

ABSTRACT: Zinc (Zn) deficiency of rice plant cultivated under aerobic system is a common problem found in growing cereal plant. Enhancing of the availability of Zn to the rice plant employing arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) is one of a good method for solving this problem. Therefore, the objectives of this study is to investigate the effect of AMF on the growth and Zn uptake of rice (cultivar Sanpatowng 1) which cultivated under two different of moisture regimes, flood condition (continuous water-logging) and aerobic condition (0.3 bar). The plants inoculated with three different of AMF species (*Glomus geosporum, G. etunicatum* and *Acaulospora foveata*) and uninoculated control were compared. After 60 day of cultivation, extractable Zn in the soil, shoot dry weight, Zn uptake, and root colonization by AMF were determined. The results revealed that among both of two different water levels, plant inoculated with AMF tended to have biomass higher than uninoculated control, especially plant inoculated with *A. foveata* which gave the highest of shoot dry weight and Zn uptake. For the root colonization by AMF, the plant inoculated with *G. geosporum* exhibited the highest value of 61.53%, while uninoculated control was lowest found (5.12 %). In addition, the value of Mycorrhizal responsivness (MR) and Mycorrhizal Zn responsivness (MZnR) were found in low moisture soil (0.3 bar) higher than those from water-logging soil.
Keywords: arbuscular mycorrhizal fungi, zinc, aerobic rice

[1] สาขาปฐพีศาสตร์ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้
Soil Science Program, Faculty of Agricultural Production, Maejo University

* Corresponding author: supathida@mju.ac.th, suphathidaaumtong@yahoo.com

บทนำ

ข้าวเป็นพืชอาหารหลักของเอเชีย โดยผลผลิตข้าวเพิ่มขึ้นในช่วงปฏิวัติเขียว (green revolution) จะมีบางช่วงเท่านั้นที่ทำให้ผลผลิตลดลง เนื่องจากการแปรปรวนของสภาพภูมิอากาศ เช่น ความแห้งแล้งหรือน้ำท่วม ภาวะความแห้งแล้งถือว่าเป็นขีดจำกัดที่สำคัญในการปลูกข้าวของทวีปเอเชีย โดยพื้นที่ประมาณ 23 ล้านเฮกตาร์ หรือประมาณ 20 % ของพื้นที่ปลูกข้าวกำลังประสบปัญหาแนวโน้มความแห้งแล้ง (Bouman et al., 2005) นอกจากนี้การขาด Zn ในข้าวถือว่าเป็นปัญหาหนึ่งของการขาดจุลธาตุ โดยเฉพาะการปลูกข้าวในสภาพดินนา (Wissuwa et al., 2008) และทำให้ได้ผลผลิตลดลง ซึ่งการจัดการเพื่อแก้ปัญหานี้อาจจะเป็นการปล่อยน้ำเพียงบางเวลา (Neue et al., 1998) การใส่ปุ๋ยหรือการเลือกใช้พันธุ์ข้าวที่ทนต่อการขาด Zn (Ismail et al., 2007) โดยทั่วไปข้าวแสดงอาการขาด Zn ช่วงแรกของการเจริญเติบโต หรือภายหลังหลังการปลูกประมาณ 2-3 สัปดาห์หลังการปลูก และสามารถฟื้นตัวหลังการปลูกในช่วงสัปดาห์ที่ 7-8 (Forno et al., 1975) ข้าวถือว่าเป็นพืชที่ไวต่อการขาด Zn โดยระดับความเข้มข้นของ Zn ในใบอ่อน ช่วงระยะแตกกอมีค่า 20 mg kg^{-1} จึงถือว่าเพียงพอ สำหรับการปลูกข้าวในสภาพการปลูกข้าวแบบน้ำขังนั้น การแก้ไขอาจเป็นการใส่ปุ๋ย Zn ($ZnSO_4$ อัตรา 0.8-1.6 กก./ไร่) (Doberman and Fairhurst, 2000) นอกจากนี้ อาจจะมีการใส่ปุ๋ย Zn ในรูปของปุ๋ยน้ำหรือการหว่านให้กับต้นกล้าข้าว (Rashid et al., 2000) สำหรับประเทศไทยที่ประชากรบริโภคข้าวเป็นแหล่งพลังงานหลัก การเพิ่มสังกะสีในเมล็ดข้าวโดยการใส่ปุ๋ยสังกะสีในดินนาที่มีสังกะสีต่ำหรือปานกลาง จะเพิ่มทั้งผลผลิตข้าวและคุณภาพด้านโภชนาการของข้าว ซึ่งช่วยบรรเทาความรุนแรงของโรคอันเกิดจากการขาดสังกะสี ดินซึ่งมีสังกะสีที่เป็นประโยชน์ต่ำ ได้แก่ ดินที่มีธาตุนี้ทั้งหมดต่ำ pH สูง ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต และฟอสเฟตสูง หรือเป็นดินที่มีอินทรียวัตถุต่ำหรือสูงเกินไป ดินโดยทั่วไปมีสังกะสีทั้งหมด 10 ถึง 300 mg kg^{-1} ความเข้มข้นในสารละลายดินต่ำกว่า 2 ถึง 75 μg kg^{-1} สำหรับดินแคลแคเรียสมีต่ำกว่า 0.8 μg kg^{-1} ระดับวิกฤติของสังกะสีในดินซึ่งสกัดได้ด้วย diethylene triamine pentaacetic acid (DTPA) อยู่ในช่วง 0.5-2.0 mg kg^{-1} และความเข้มข้นวิกฤติคือ 0.8 mg kg^{-1} ปริมาณสังกะสีที่เป็นประโยชน์ในดินสภาพขังน้ำมักต่ำกว่าก่อนการขังน้ำ เป็นเหตุให้รากข้าวดูดสังกะสีจากดินได้น้อยลง สำหรับดินในที่ต่ำของประเทศไทยซึ่งมีสมบัติทางเคมีเข้าข่ายการขาดธาตุนี้ ได้แก่ ชุดดินลพบุรี ชุดดินดำเนินสะดวก และชุดดินบางปะกง ส่วนดินไร่ที่เข้าข่ายดังกล่าวได้แก่ ชุดดินชัยบาดาล ชุดดินกำแพงแสน ชุดดินท่าม่วง ชุดดินบึงชะนัง ชุดดินตาคลี และชุดดินลำนารายณ์ สำหรับชุดดินชัยบาดาล ชุดดินลำนารายณ์ และชุดดินทับกวางมีสังกะสี ซึ่งสกัดได้ด้วย DTPA 0.40, 0.10 และ 0.95 mg kg^{-1} ตามลำดับ (อัญธิชา และคณะ, 2554) แนวทางการเขตกรรมในการเพิ่มความเป็นประโยชน์ของ Zn ให้แก่ข้าวอย่างหนึ่ง คือ การใช้ประโยชน์จากเชื้อราอาบัสคูลาร์ ไมโครไรซ่า (arbuscular mycorrhizal fungi, AMF) เพื่อเพิ่มความเป็นประโยชน์ Zn ที่มีอยู่ต่ำ โดยเฉพาะพืชที่มีความสามารถในการดูใช้ Zn จากดินขึ้นมาใช้ และเนื่องจากปัญหาการขาดน้ำเพื่อการปลูกข้าว จึงได้มีการวิจัยที่เปลี่ยนรูปแบบการจัดการน้ำเพื่อการปลูกข้าว แทนการปลูกแบบดั้งเดิมที่มีน้ำท่วมขังดิน (paddy soil) โดยการปลูกแบบใหม่เป็นการปลูกข้าวที่ประหยัดน้ำ เพื่อต้องการให้เกิดประสิทธิภาพการใช้น้ำสูงขึ้น ซึ่งเรียกว่าการปลูกข้าวแบบใช้อากาศ (aerobic rice) โดยมีลักษณะการปลูกในดินที่แห้งแต่จะมีการให้น้ำในระดับที่ไม่มีการท่วมขังน้ำ และจะไม่มีการเตรียมดินโดยตีดินขณะดินเปียก (ทำเทือก) ในดินที่ความอุดมสมบูรณ์ (Bouman et al., 2005) สำหรับดินที่อยู่ภายใต้สภาพการขังน้ำนั้น อาจจะเกิดการขาด Zn ขึ้นได้ เช่น ดินภายใต้การปลูกข้าวแบบน้ำขังนั้น จะมีปริมาณ Zn ที่สกัดได้ต่ำกว่า 1 mg kg^{-1} (สกัดด้วย DTPA) ทั้งนี้เพราะว่าดินภายใต้การขังน้ำนั้นมี pH และปริมาณคาร์บอนเนตสูง และค่ารีดอกซ์โพเทนเชียลต่ำ (Marschner, 1995) นอกจากนี้ การที่ดินมีความชื้นลดลงนั้นทำให้การ

เคลื่อนที่ของ Zn ไปสู่บริเวณรากพืชลดลง (Yoshida, 1981) ดังนั้น วัตถุประสงค์ของงานวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาผลของการปลูกเชื้อรา AMF ต่อการดูดซับธาตุ Zn และการเจริญของข้าวพันธุ์สันป่าตอง 1 โดยเปรียบเทียบในระบบการให้น้ำแบบน้ำท่วมขัง และการปลูกข้าวแบบใช้อากาศ

วิธีการศึกษา

1. **แผนการทดลอง**: วางแผนการทดลองแบบ RCBD (randomized complete block design) จำนวน 3 ซ้ำ โดยมี 4 ทรีทเมนต์ ดังนี้ ทรีทเมนต์ที่ 1 Control (ไม่ใส่เชื้อไมคอร์ไรซา) ทรีทเมนต์ที่ 2 ใส่หัวเชื้อดิน *G. geosporum* ทรีทเมนต์ที่ 3 ใส่หัวเชื้อดิน *G. etunicatum* ทรีทเมนต์ที่ 4 ใส่หัวเชื้อดิน *A. foveata*

2. **การเพิ่มปริมาณสปอร์ของเชื้อราอาบัสคูลาร์ ไมคอร์ไรซาในสภาพกระถาง** (pot culture): การเพิ่มปริมาณของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ ไมคอร์ไรซา โดยวิธีการเพิ่มปริมาณในกระถาง โดยใช่ข้างฟ่างเป็นพืชอาศัย โดยการนำดินชุดน้ำพองและทรายมาผึ่งลมให้แห้ง แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน180 นาที ติดต่อกัน 3 วัน จากนั้นนำทรายผสมดินชุดน้ำพองอัตรา 1:1 โดยปริมาตร แล้วชั่งดินใส่กระถาง 7 กิโลกรัม ทำการปลูกข้าวฟ่างโดยหยอดเมล็ด รดน้ำด้วยสารละลาย Hoagland 's solution โดยให้สัปดาห์ละครั้งๆ ละ 30 มิลลิลิตร (โดยแต่ละครั้งนั้นมีปริมาณ N =420, P = 927,K = 2,346 และ Zn= 13.6 mg L^{-1}) เมื่อข้าวฟ่างอายุได้ประมาณ 3 เดือนทำการเก็บเกี่ยว โดยการตัดต้นพืชที่เจริญเหนือดินทิ้งไป จากนั้นเก็บดินพร้อมรากนำมาผึ่งลมให้แห้ง แล้วเก็บดินแห้งนี้ไว้ ในถุงพลาสติกที่ปิดสนิทในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิประมาณ 4 – 5 องศาเซลเซียส หรืออาจปล่อยให้ดินในกระถางค่อยๆ แห้ง ที่อุณหภูมิห้อง (ธงชัย, 2550)

3. **การเตรียมดินปลูกและต้นพืชทดลอง**: นำดินชุดหางดง (pH =6.5 ,Available P = 109.9 mg kg^{-1}, Exchage.K = 352.3 mg kg^{-1}, Extrac. Zn = 25.3 mg kg^{-1} , SOC = 1.2 % และเนื้อดินร่วนปนทราย (sandy clay loam)) มาผึ่งให้แห้งด้วยลมแล้วร่อนผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร จากนั้นชั่งดินใส่กระถาง 1.5 กิโลกรัม เติมน้ำประมาณ 300 มิลลิลิตรลงไปแล้วคลุกให้เข้ากันทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นนำดินหัวเชื้อมาใส่รองก้นหลุมตามทรีทเมนต์ อัตรา 500 กรัมต่อกระถาง (โดยมีจำนวนสปอร์ประมาณ 300 สปอร์) จากนั้นนำต้นกล้าข้าวพันธุ์สันป่าตอง 1 อายุ 14 วัน มาปลูกลงในกระถาง เมื่อครบ 14 วัน จึงทำการควบคุมความชื้น โดยแบ่งเป็น 2 ชุด โดยชุดแรกควบคุมความชื้นที่ 0.3 bar ของดินหางดง และชุดที่สองจะขังน้ำเหนือดิน 2 เซนติเมตร เมื่อข้าวอายุได้ 2 เดือน ทำการเก็บเกี่ยว

4. **การตรวจหาเชื้อราอาบัสคูลาร์ ไมคอร์ไรซาในรากข้าว** (Root colonization): การตรวจหาเชื้อราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซานรากด้วยการย้อมสีรากพืชตามวิธีของ McGonigle และคณะ (McGonigle et al., 1990) โดยนำตัวอย่างรากพืชมาล้างน้ำให้สะอาด ตัดเป็นชิ้นขนาดประมาณ 10 เซนติเมตร นำไปต้มในน้ำยาโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (10% KOH) อุณหภูมิประมาณ 121 องศาเซลเซียส นานประมาณ 4 นาที แล้วล้างด้วยน้ำจนไม่มีน้ำยา KOH ติดอยู่ จากนั้นซับพอหมาด นำไปย้อมด้วย 0.05% trypan blue ใน lactoglycerol ที่อุณหภูมิไม่เกิน 121 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที จากนั้นนำรากวางบนสไลด์แล้วส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์

5. **การบันทึกผลการทดลอง**: วัดความสูงของต้น โดยใช้ตลับเมตรวัดทุกๆ 7 วันหลังปลูก (วัดจากโคนลำต้นถึงยอด) วัดความยาวของใบ โดยใช้ตลับเมตรวัดทุกๆ 7 วันหลังปลูก นำต้นข้าวมาชั่งน้ำหนักสด แล้วนำไปอบด้วยอุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาชั่งน้ำหนักแห้ง และทำการวิเคราะห์ธาตุ Zn (HNO_3 + $HClO_4$) (Jackson, 1973)

6. **การคำนวณ**

$$\text{Mycorrhizal responsiveness (MR)} = \frac{[Plant\ dw\ (+AMF) - Plant\ dw\ (-AMF) \times 100]}{\text{Plant dw(-AMF)}}$$

(Hetrick et al., 1992)

$$\text{Mycorrhizal Zn responsivness (MZnR)} = \frac{[Zn\ uptake(+AMF) - Zn\ uptake\ (-AMF) \times 100]}{\text{Zn uptake(-AMF)}}$$

7. **การวิเคราะห์ข้อมูล**: หาความสัมพันธ์ระหว่าง MR และ MZnR แล้วนำไปหาความสัมพันธ์กับค่า Zn uptake โดยคำนวณค่าสหสัมพันธ์ (correlation) และสมการทดถอย และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของทรีทเมนต์โดยใช้วิธี LSD (least significant difference)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

1. การจัดการน้ำและปลูกเชื้ออาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาต่อการเจริญเติบโตของข้าว

การเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์สันป่าตอง1 ที่ปลูกในรูปแบบการจัดน้ำ 2 รูปแบบคือ การขังน้ำ (WL) และรักษาระดับความชื้นของดินไว้ที่ 0.3 bar พบว่าผลของระดับความชื้น มีผลทำให้การเจริญเติบโตในส่วนของน้ำหนักแห้งของข้าว ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยน้ำหนักแห้งอยู่ในช่วง 1.29 - 2.21 กรัม/ต้น แต่อย่างไรก็ตาม พบว่าข้าวที่ปลูกทั้งสองระดับความชื้นที่มีการใส่หัวเชื้อ AMF ชนิดต่างๆ มีแนวโน้มน้ำหนักแห้งสูงกว่าดินที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อลงไป โดยในข้าวที่ปลูกในดินที่รักษาความชื้นที่ 0.3 bar พบว่าการใส่หัวเชื้อ *A. foveata* มีน้ำหนักแห้งของส่วนต้นสูงที่สุด (2.21 กรัมต่อต้น) รองลงมาคือ G. etunicatum (1.42 กรัมต่อต้น) และ G. geosporum (1.32 กรัมต่อต้น) และไม่มีการใส่หัวเชื้อ(1.29 กรัมต่อต้น) ตามลำดับ (Table 1)

Table 1 Shoot dry weight in responsiveness to AMF inoculation and mycorrhizal responsiveness (MR) of San Patowng 1 which were 60-days-old after transplantation (DAT).

Water regime	Mycorrhiza	Shoot dry weight (g/ plant)	Zn in shoot (mg/kg)	Zn uptake (µg/plant)	MR (%)	MZnR (%)
0.3 bar	No Mycorrhiza	1.29	4.47 B	3.53 B	0.00	0.00
0.3 bar	*G. geosporum*	1.34	7.97 AB	6.29 AB	4.15	78.36
0.3 bar	*G. etunicatum*	1.42	10.67 AB	8.43 AB	10.36	138.81
0.3 bar	*A. foveata*	2.21	11.30 AB	8.93 AB	72.02	152.99
WL	No Mycorrhiza	1.33	7.67 AB	6.06 AB	0.00	0.00
WL	*G. geosporum*	1.45	9.13 AB	7.22 AB	9.05	19.13
WL	*G. etunicatum*	1.88	13.00 AB	10.27 AB	41.46	69.57
WL	*A. foveata*	1.97	15.50 A	12.25 A	48.74	102.17

Note: In a column, means followed by the same letter are not significantly different (LSD, $P = 0.05$)

WL= Continuous water logging, **MR** = Mycorrhizal responsiveness, **MZnR** = Mycorrhizal Zn responsivness

2. ผลของรูปแบบของการให้น้ำและการปลูกเชื้อรา AMF ต่อการดูดซับ Zn

ผลของรูปแบบการให้น้ำและการปลูกเชื้อรา AMF ต่อการความเข้มข้นของ Zn ของข้าวพันธุ์สันป่าตอง1 พบว่าการขังน้ำ (WL) และรักษาระดับความชื้นของดินไว้ที่ 0.3 bar โดยการจัดการน้ำมีผลทำให้ความเข้มข้นของ Zn ในข้าวไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่สำหรับผลของการใส่หัวเชื้อ AMF พบว่าข้าวที่ปลูกทั้งสองระบบความชื้น ที่มีการใส่หัวเชื้อ AMF ชนิดต่างๆ มีความเข้มข้นของ Zn ในข้าวสูงกว่าต้นข้าวที่ปลูก โดยไม่มีการใส่หัวเชื้อ AMF พบว่าข้าวที่ปลูกเชื้อรา *A. foveata* มีความเข้มข้นของ Zn ในข้าวสูงสุด 15.50 mg kg^{-1} (WL) และ 11.30 mg kg^{-1} (0.3 bar) รองลงมาคือ *G. etunicatum* 13.00 mg kg^{-1} (WL) และ 10.67 mg kg^{-1} (0.3 bar) และ *G. geosporum* มีการตอบสนองต่อการใส่หัวเชื้อต่ำที่สุด 9.13 mg kg^{-1} (WL) และ 7.97 mg kg^{-1} (0.3 bar) (**Table 1** และ **Figure 1**)

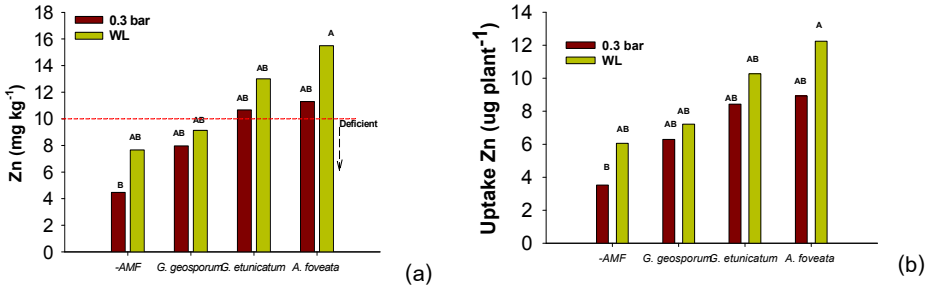

Figure 1 Effect of water managements combined with inoculation of mycorrhizal fungi on (a) Zn concentration in rice and (b) Zn uptake by rice. WL = continuous flooding , - AMF = No inoculation of mycorrhizal fungi.

3. ผลของรูปแบบของการให้น้ำ และการปลูกเชื้อรา AMFต่อปริมาณ Zn ในดิน

ผลของรูปแบบการให้น้ำและการปลูกเชื้อรา AMF ต่อปริมาณ Zn ในดิน พบว่าการขังน้ำ (WL) และรักษาระดับความชื้นของดินไว้ที่ 0.3 bar มีผลทำให้ปริมาณ Zn ในดินไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ 40.75 mg kg^{-1} (WL) และ 36.30 mg kg^{-1} (0.3 bar) และสำหรับผลของการปลูกเชื้อรา AMF พบว่าดินที่ใช้ปลูกข้าวทั้งสองระบบความชื้น และมีการใส่หัวเชื้อรา AMF ชนิดต่างๆ มีปริมาณของ Zn ที่สกัดได้สูงกว่าในดินที่ปลูกข้าวที่ไม่มีการใส่หัวเชื้อ AMF อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยในดิน 0.3 bar การใส่เชื้อ *G. etunicatum* มีปริมาณ Zn ในดินเท่ากับ 49.00 mg kg^{-1} (WL) และ 40.80 mg kg^{-1} (0.3 bar)) และ *G. geosporum* มีปริมาณ Znในดิน คือ 38.90 mg kg^{-1} (WL) และ 45.7 mg kg^{-1} (0.3 bar) สำหรับการใส่หัวเชื้อ *A. foveata* มีปริมาณ Zn ในดินต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับดินที่มีการใส่หัวเชื้อด้วยกันคือ 37.90 mg kg^{-1} (WL) และ 33.40 mg kg^{-1} (0.3 bar)) สำหรับในดินที่ไม่การใส่หัวเชื้อพบว่ามีปริมาณ Zn ต่ำที่สุด 33.70 mg kg^{-1} (WL) และ 25.30 mg kg^{-1} (0.3 bar) (**Figure 2**)

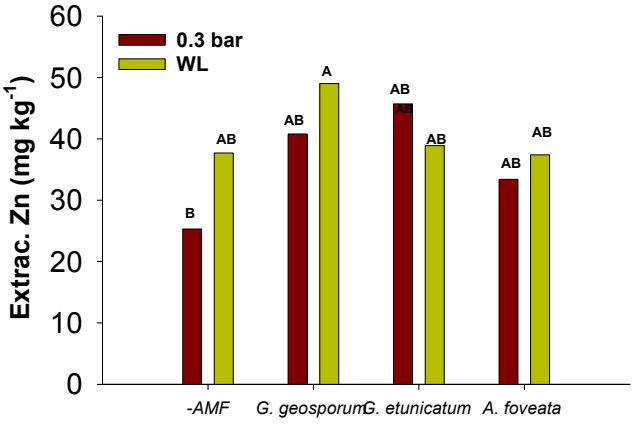

Figure 2 Effect of water managements combined with inoculation of mycorrhizal fungi on Zn concentration in soil. WL = continuous flooding , - AMF= No inocolation of mycorrhizal fungi Note: Bars, means followed by the same letter are not significantly different (LSD, P = 0.05)

สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตและผลของการปลูกเชื้อรา AMF โดยพิจารณาจากค่า Mycorrhizal responsiveness (MR) สามารถบ่งชี้เช่นเดียวกันว่าการปลูกเชื้อราไมคอร์ไรซาในระบบการให้น้ำแก่ข้าวทั้ง 2 รูปแบบ มีผลทำให้ค่า MR เพิ่มขึ้นอย่างเจน (**Table 1**) โดยค่า MR ของข้าวที่มีการปลูกเชื้อรา *A. foveata* สูงสุด (72.02 % (WL) และ 48.74 % (0.3 bar)) รองลงมาคือ *G. etunicatum* (41.46 % (WL) และ 10.36 % (0.3 bar)) และ *G. geosporum* มีการตอบสนองต่อการใส่หัวเชื้อต่ำที่สุด (9.05 % (WL) และ 4.15 % (0.3 bar)) (**Table 1**) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการปลูกเชื้อรา AMF มีผลทำให้น้ำหนักแห้งของพืชสูง และมีการดูดซับ Zn สูงกว่าการไม่ใส่หัวเชื้อรา AMF โดยพิจารณาจากค่า MR และ MZnR นอกจากนี้ผลของการปลูกเชื้อรา *A. foveata* ที่ระดับความชื้นที่ระดับ 0.3 bar มีค่า MR และ MZnR สูงกว่าดิน WL

4. การเข้าอาศัยของเชื้อราอาบัสคูลาร์ ไมคอร์ไรซา ในรากข้าว (Root colonization)

ผลการศึกษาพบว่าการเข้าอาศัยในรากข้าวของเชื้อรา AMF ในดินที่มีระดับความชื้น 0.3 bar มีค่าสูงกว่าดินที่มีระดับความชื้นแบบ WL ในทุกชนิดของ AMF โดยพบการเข้าอยู่อาศัยในรากของเชื้อรา *G. geosporum, A.foveata ,G etunigatum* เท่ากับ 61.53, 43.59, 41.02% ตามลำดับ สำหรับดินที่ไม่มีการใส่เชื้อเท่ากับ 5.12% (**Figure 3**) และยังพบว่า ในดินที่มีน้ำขัง (WL) ไม่พบการเข้าอาศัยของเชื้อราในรากพืชเลย (0%) เนื่องจากเชื้อรา AMF เป็นจุลินทรีย์ที่ต้องใช้ออกซิเจน (obligate aerobes) จึงทำให้ปริมาณเชื้อรา AMF ในข้าวที่ปลูกในดินปลูกข้าวขังน้ำมีชีวิตรอด อีกทั้งในช่วงแรกของปลูกข้าวในระบบน้ำขังนั้นการพัฒนาการของรากข้าวมีไม่มากนัก ทำให้การเข้ารากในช่วงแรกของการเจริญเติบโตของข้าวไม่เกิดขึ้น ทำให้เชื้อรา AMF ขาดพืชอาศัย จึงส่งผลให้เชื้อรา AMF มีการรอดชีวิตลดลงในสภาพการขังน้ำ (Hajiboland et al., 2009)

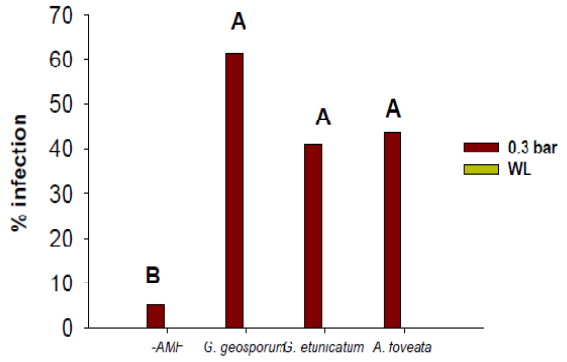

Figure 3 Mycorrhizal root colonization from rice which grown in two moisture regimes.

5. **ความสัมพันธ์ระหว่างการดูดซับ Zn ของข้าวกับการปลูกเชื้อรา** AMF

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการดูดซับ Zn (Zn uptake) และ MR และ MZnR โดยมีการให้น้ำสองรูปแบบจากการทดลองครั้งนี้พบว่าในดิน WL มีสหสัมพันธ์กันทางตรงอย่างมีนัยยิ่งสำคัญทางสถิติ แสดงว่าเมื่อปริมาณ MR และ MZnR เพิ่มขึ้น ปริมาณ Zn uptake จะเพิ่มขึ้นด้วย (**Figure 4 (a)**) และเมื่อนำค่า MR และ MZnR ไปหาความสัมพันธ์กับค่า Zn uptake พบว่าดิน WLเพียงอย่างเดียวนั้น พบว่า MR และ MZnR มีสหสัมพันธ์ทางตรงกับ Zn uptake (p =0.0137 และ< 0.0001 ตามลำดับ) โดยมีค่า r เท่ากับ 0.9539 และ 1.0000 ตามลำดับ (**Figure 4(a)** และ **Figure (b)**) ส่วนดินที่ความชื้น 0.3 bar พบว่า พบว่า MR และ MZnR มีสหสัมพันธ์ทางตรงกับ Zn uptake (p =0.3254 และ< 0.0001 ตามลำดับ) โดยมีค่า r เท่ากับ 0.6746 และ 1.0000 ตามลำดับ (**Figure 4(a)** และ **Figure (b)**) ดังนั้นจากผลการศึกษานี้อาจจะมีการใช้ AMF โดยเฉพาะสายพันธุ์ท้องถิ่นที่ส่งเสริมการใช้ดูดใช้ Zn ของข้าวในการปลูกข้าวแบบประหยัดน้ำ ซึ่งควรมีการศึกษาต่อไป

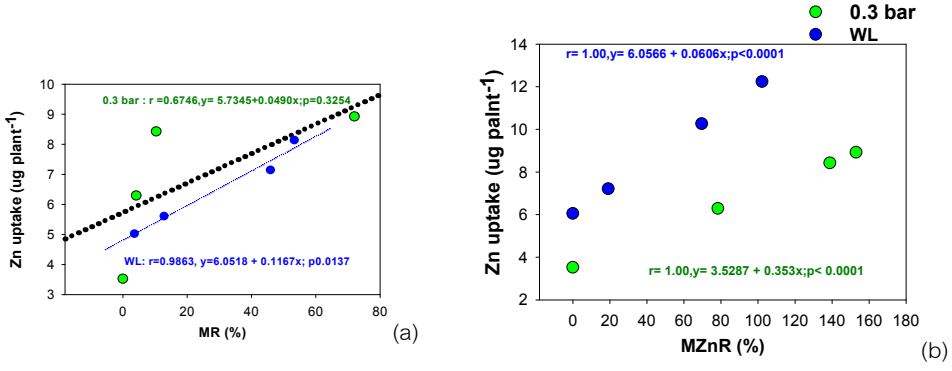

Figure 4 Correlation between Zn uptake of San Patowng 1 (a) mycorrhizal response (b) mycorrhizal Zn response for three species of AMF. **Note**: WL = continuous flooding

จากผลการศึกษาในระดับกระถางครั้งนี้ อาจกล่าวได้ในระดับหนึ่งถึงบทบาทของเชื้อ AMF ที่ใช้ในรูปของหัวเชื้อดินช่วยทำให้ข้าวมีการเจริญเติบโตและการดูดซับ Zn เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะการปลูกข้าวที่ระดับความชื้น 0.3 bar ซึ่งเป็นการปลูกข้าวแบบใช้อากาศ ซึ่งผลที่ได้จากการทดลองนี้อาจนำไปสู่การศึกษาทดลอง ใน

ระบบการปลูกข้าว เพื่อประหยัดน้ำต่อไปได้ Gao et al. (2007) รายงานว่าการปลูกเชื้อรา AMF ในข้าวสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการดูด Zn ได้สูง จะให้ผลที่ชัดเจนและยังชี้ให้เห็นว่ายังมีกลไกอื่นๆ ในส่งเสริมการดูดใช้ Zn ของข้าวด้วย ดังนั้นจากการศึกษาครั้งนี้ อาจจะกล่าวได้ว่าข้าวพันธุ์สันป่าตอง 1 เป็นพันธุ์ที่ตอบสนองต่อการใช้ AMF ในการดูดใช้ Zn โดยเฉพาะ AMF สายพันธุ์ *A. foveata* ซึ่งพิจารณาจากการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักแห้งและดูดซับ Zn แต่อย่างไรก็ตามความเป็นประโยชน์ของ Zn อาจจะมีปัจจัยอื่นเข้ามาเกี่ยวข้อง ซึ่งอาจจะมีผลต่อการดูดซับ Zn ของข้าวต่อไป นอกจากนี้ Gao et al. (2007) ยังรายงานอีกว่าการใส่หัวเชื้อ AMF ไม่มีผลต่อการดูดใช้ Zn อย่างชัดเจน แต่อย่างไรก็ตามขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของข้าวด้วย

จากการศึกษาครั้งนี้เมื่อพิจารณาปริมาณ Zn ที่สกัดได้ในดิน จะเห็นได้ว่าดินในสภาพที่ชื้นและมีอากาศ (0.3 bar) มีปริมาณ Zn ต่ำกว่าดิน WL ซึ่งข้าวจะแสดงอาการขาด Zn ในดินที่มีความชื้นต่ำกว่าดินที่อยู่ในสภาพน้ำขัง (เมื่อ pH = 7.5) (Gao et al., 2006) แต่บ่อยครั้งที่พบว่าดินในสภาพน้ำขังมีปริมาณ Zn ที่เป็นประโยชน์ต่อพืชต่ำกว่าดินที่ในสภาพมีอากาศ และมีรายงานไว้ว่าดินที่ปริมาณ Zn เพียงพอสำหรับการปลูกข้าวสาลี แต่เมื่อนำดินนั้นมาปลูกข้าวภายใต้น้ำท่วมขัง ข้าวอาจจะขาด Zn ได้ (Van Breemen and Castro, 1980)

ดินในสภาพที่มีอากาศ (aerobic soils) อาจจะเปลี่ยนแปลงความเป็นประโยชน์ของ Zn ให้มีค่าลดลงตลอดจนค่า Eh (redox potential) มีค่าเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิด Fe Oxidation พร้อมๆ กับการเกิดกรดของดิน เกิดการตกตะกอนของ $Fe(OH)_3$ และทำให้มีการดูดซับ Zn อีกทั้งสภาพดังกล่าวนี้จะส่งเสริมการเกิดกระบวนการไนตริฟิเคชั่น ทำให้ข้าวดูดใช้ NO_3^- แทนการดูดใช้ NH_4^+ นอกจากนี้ การที่ข้าวมีผลผลิตลดลงในสภาพดินมีอากาศนั้นเนื่องจากสภาพการขาดน้ำในดินเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ผลผลิตข้าวมีการเสียหาย ถึงแม้จะใช้พันธุ์ข้าวทนแล้งก็ตาม (Bouman et al., 2005) และจากสภาพขาดน้ำนี้ ยังทำให้การเคลื่อนที่ของ Zn เข้าสู่รากข้าวลดลงด้วย โดยมีรายงานว่าเมื่อดินมีความชื้นลดลงหรือดินอยู่ในสภาพมีอากาศนั้นความเป็นประโยชน์ของ Zn จะลดลง เป็นผลมาจากปัจจัยหลายประการ เช่น pH ของดินอาจจะมีเพิ่มขึ้นหรือลดลงขึ้นอยู่กับ pH เดิมของดิน (Liu, 1996) Redox potential จะมีค่าสูงขึ้น (Gao et al., 2007) ซึ่งทำให้เกิดเหล็กออกไซด์ $Fe(OH)_3$ เกิดขึ้น พร้อมๆ กับการลดลงของ pH ซึ่งทำให้มีการดูดยึด Zn เกิดขึ้น ซึ่งจะทำให้ข้าวแสดงอาการขาด Zn ในช่วง 2-4 สัปดาห์หลังการขังน้ำ ซึ่งจะมีอาการใบเป็นจุดสีน้ำตาล และเมื่อรุนแรงมากขึ้นจะพบในใบแก่ ต้นเตี้ยแคระ ทำให้ระยะการเวลาการเจริญเติบโตเต็มที่ช้าออกไป (delay maturity) และผลผลิตลดลงในที่สุด แต่อย่างไรก็ตามการปลูกข้าวที่พบได้ทั่วไปยังคงเป็นการปลูกข้าวภายใต้ระบบน้ำขัง หรืออาจจะมีสภาพแห้งของดินเพียงชั่วคราวที่พบได้ในระบบการปลูกข้าวแบบอาศัยน้ำฝน โดยสภาพดินนาน้ำขังนั้นอาจจะเกิดการขาด Zn ในข้าว เช่น ข้อมูลจากดินปลูกข้าวภายใต้ภาวะน้ำขังมีปริมาณ Zn ต่ำกว่า 1 mg kg^{-1} (DTPA-extractable Zn) (Sims and Johnson, 1991) โดยมีสาเหตุมาจากดินมีสภาพ pH สูง ปริมาณคาร์บอนเนตสูง และมีค่า Eh ต่ำ (Mandal et al., 2000) นอกจากนี้ การเกิด Fe oxidation ในอาณาบริเวณรากพืชทำให้ pH ลดลงและยังทำให้ Zn มีความเป็นประโยชน์ลดลง เพราะไม่มีการปลดปล่อยจากส่วนที่ไม่เป็นประโยชน์ (Forno et al., 1975; Kirk and Bajita, 1995)

6. การส่งเสริมการดูดซับ Zn โดยเชื้อรา AMF และระดับของ Zn ในดิน

การที่มีความแตกต่างของค่า MR และ MZnR ซึ่งดูเหมือนว่าจะไม่มีความสัมพันธ์กับการเข้าอาศัยของเชื้อรา AMF ในรากนั้น รวมทั้งเมื่อพิจารณาการดูดซับ Zn ในดินที่ไม่มีการใส่หัวเชื้อ ชี้ให้เห็นว่าสายพันธุ์ข้าวที่ศึกษาครั้งนี้มีความไวหรือการตอบสนองต่อเชื้อ AMF ที่สูง ดังนั้นเมื่อพิจารณาค่า MR ที่ได้จากการทดลองนี้อาจจะมีสาเหตุมาจากความแปรปรวนของพืชในความต้องการธาตุอาหาร โดยพืชดังกล่าวสามารถที่จะเติบโตได้ดีในสภาพที่ดินมีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ (Kaeppler

et al., 2000) ดังนั้นการศึกษาครั้งต่อไปควรศึกษาชนิดและปริมาณของสปอร์ AMF สายพันธุ์ท้องถิ่นเพื่อนำไปใช้เพิ่มการดูดซับธาตุอาหารสำหรับการปลูกข้าวแบบใช้อากาศ

สรุป

ข้าวที่ปลูกทั้งสองระดับความชื้นที่มีการใส่หัวเชื้อ AMF ชนิดต่างๆ มีแนวโน้ม ของน้ำหนักแห้งของต้น ปริมาณธาตุ Zn ในต้น และการดูดซับ Zn สูงกว่าข้าวที่ปลูกดิน ที่ไม่มีการปลูกเชื้อราลงไป โดยในข้าวที่ปลูกในดินที่รักษาระดับความชื้นที่ 0.3 bar พบว่าการใส่หัวเชื้อ *A. foveata* ทำให้ข้าวมีน้ำหนักแห้งต้นสูงที่สุด รองลงมาคือ *G. etunicatum และ G. geosporum* และไม่มีการใส่หัวเชื้อ สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตและผลของใส่หัวเชื้อ AMF โดยพิจารณาจากค่า MR สามารถบ่งชี้เช่นเดียวกันว่า การใส่หัวเชื้อไมคอร์ไรซาในระบบการให้น้ำแก่ข้าวทั้ง 2 รูปแบบมีผลทำให้ค่า MR เพิ่มขึ้นอย่างเจน โดยค่า MR ของข้าวที่มีการใส่หัวเชื้อ *A. foveata* สูงสุด (72.02 % (WL) และ 48.74 % (0.3 bar)) รองลงมาคือ *G. etunicatum* (41.46 % (WL) และ 10.36 % (0.3 bar)) และ *G. geosporum* มีการตอบสนองต่อการใส่หัวเชื้อต่ำที่สุด (9.05 % (WL) และ 4.15 % (0.3 bar)) การใส่หัวเชื้อ AMF มีผลทำให้น้ำหนักแห้งพืชสูงและมีการดูดใช้ Zn สูงกว่าการไม่ใส่หัวเชื้อ AMF โดยพิจารณาจากค่า MR และ MZnR นอกจากนี้ผลของการใส่หัวเชื้อ *A. foveata* ที่ระดับความชื้นที่ระดับ 0.3 bar ทำให้มีค่า MR และ MZnR สูงกว่าดิน WL และผลจากความสัมพันธ์ระหว่างการดูดซับ Zn และ MR และ MZnR โดยมีการให้น้ำสองรูปแบบแสดงว่าเมื่อปริมาณ MR และ MZnR เพิ่มขึ้น ทำให้มีดูดซับ Zn ของข้าวเพิ่มขึ้นด้วย ควรจะศึกษาเพิ่มเติม ถึงการใช้ AMF สายพันธุ์ท้องถิ่นที่ส่งเสริมการดูดซับ Zn ของข้าวในการปลูกข้าวแบบประหยัดน้ำต่อไป

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการ “การจัดการธาตุอาหารและน้ำในระบบการปลูกข้าวเพื่อการประหยัดน้ำ” ขอขอบคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ เครือข่ายภาคเหนือ (สวทช. เครือข่ายภาคเหนือ) ในการให้ทุนการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

ธงชัย มาลา. 2550. ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพ: เทคนิคการผลิตและการใช้ประโยชน์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพ.

อัญธิชา พรมเมืองคุก, อรรถศิษฐ์ วงศ์มณีโรจน์ และยงยุทธ โอสถสภา. 2554. การทดลองปุ๋ยสังกะสีในนาข้าว 2554. รายงานการประชุมวิชาการดินและปุ๋ยแห่งชาติ ครั้งที่ 2. เชียงใหม่, 11-13 พฤษภาคม 2554 ณ ศูนย์การศึกษาและฝึกอบรมนานาชาติ มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

Alloway, B.J. 2009. Soil factors associated with zinc deficiency in crops and humans. Environ Geochem Health. 31: 537-548.

Brown, K.H., and S.E.Wuehler. 2000. Zinc and human health: results of recent trials and implications for program interventions and research. The Micronutrient Initiative, Ottawa, Canada.

Bouman, B.A.M., S. Peng, A.R. Castaneda, and R.M. Visperas. 2005. Yield and water use of irrigated tropical aerobic rice systems. Agricultural Water Management. 74: 87-105.

Bouman, B. A. M., H. Hengsdijk, B. Hardy, P. S. Bindraban, T. P. Tuong, and J. K. Ladha, (Eds. 2002. Water-wise Rice Production. Proceedings of the International Workshop on water-wise Rice Production, 8–11 April 2002, Los Ban˜os, Philippines. p. 356 Los Banos, International Rice Research Institute, Philippines.

Bryla, D.R., and R.T. Koide. 1998. Mycorrhizal response of two tomato genotypes relates to their ability to acquire and utilize phosphorus. Annals of Botany. 82: 849-857.

Cakmak, I., M. Kalayci, H. Ekiz, H.J. Braun, Y. Kilinc, and A. Yilimaz. 1999. Zinc deficiency as a practical problem in plant and human nutrition in Turkey: A NATO-science for stability project. Field Crops Research. 60: 175-188.

Doberman, A., and T. Fairhurst. 2000. Rice: Nutrient Disorders and Nutrient Management. IRRI & PPI & PPIC, Makati City & Singapore.

Forno, D.A., C.J. Asher, and S. Yoshida. 1975. Zinc deficiency in rice. Plant Soil. 42: 551-563.

Gao, X., T. Kuyper, C. Zou and F. Zhang, and E. Hoffland. 2007. Mycorrhizal responsiveness of aerobic rice genotypes is negatively correlated with their zinc uptake when nonmycorrhizal. Plant Soil. 290: 283-291.

Gao, X., C. Zou, X. Fan, F. Zhang, and E. Hoffland. 2006. From Flooded to Aerobic Conditions in Rice Cultivation: Consequences for Zinc Uptake. Plant Soil. 280: 41-47.

Gao, X., C. Zou, F. Zhang, S. Zee, and E. Hoffland. 2005. Tolerance to Zinc Deficiency in Rice Correlates with Zinc Uptake and Translocation. Plant Soil. 278: 253-261.

Geelhoed, J. S., T. Hiemstra, and W. H. Van Riemsdijk. 1998. Competitive interaction between phosphate and citrate on goethite. Environ. Sci. Technol. 32: 2119–2123.

Hajiboland, R., N. Aliasgharzd, and R. Barzeghar. 2009. Phosphorus mobilization and uptake in mycorrhizal rice *(Oryza sativa L.)* plants under flooded and non-flooded conditions. Acta agriculturae Stovennica. 13: 153-161.

Hetrick, B.A.D., G.W.T. Wilson, and T.S. Cox. 1992. Mycorrhizal dependence of modern wheat varieties, landraces, and ancestors. Can. J. Bot. 70: 2032-2040.

Hoffland, E., C. Weia, and M. Wissuwa. 2006. Organic Anion Exudation by Lowland Rice (*Oryza sativa* L.) at Zinc and Phosphorus Deficiency. Plant Soil. 283: 155-162.

Ismail, A., S. Heuer, M. Thomson, and M. Wissuwa. 2007. Genetic and genomic approaches to develop rice germplasm for problem soils. Plant Mol Biol. 65: 547-570.

Jackson, M. L. 1973. Soil Chemical Analysis. Prentice Hall of India, New Delhi.

Kaeppler, S.M., J.L. Parke, S.M. Mueller, L. Senior, C. Stuber, and W.F. Tracy. 2000. Variation among maize inbred lines and detection of quantitative trait loci for growth at low phosphorus and responsiveness to arbuscular mycorrhizal fungi work supported by USDA-Hatch, University of Wisconsin University-Industry relations, and Cargill Fertilizer. Crop Sci. 40: 358-364.

Kirk, G.J.D., and J.B. Bajita. 1995. Root-induced iron oxidation, pH changes and zinc solubilization in the rhizosphere of lowland rice. New Phytologist. 131: 129-137.

Kirk, G.J.D., E.E. Santos, and G.R. Findenegg. 1999. Phosphate solubilization by organic anion excretion from
rice (*Oryza sativa L.*) growing in aerobic soil. Plant and Soil. 211: 11-18.

Liu, Z. 1996. Microelements in Soils of China. Jiangsu Science and Technology Publishing House, Nanjing, China.

McGonigle, T.P., M.H. Miller, D.G. Evans, G.L.Fairchild, and J.A.Swan. 1990. A new method which gives an objective of colonization of root by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytologist. 115: 495- 501.

Mandal, B., G.C. Hazra, and N. Mandal, L. 2000. Soil Management Influences on Zinc Desorption for Rice and Maize Nutrition. Soil Sci. Soc. Am. J. 64: 1699-1705.

Marschner, H. 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, San Diego.

Neue, H.U., C. Quijano, D. Senadhira, and T. Setter. 1998. Strategies for dealing with micronutrient disorders and salinity in lowland rice systems. Field Crops Research. 56: 139-155.

Rashid, A., M.A. Kausar, F. Hussain, and M. Tahir. 2000. Managing zinc deficiency in transplanted flooded rice by nursery enrichment. Tropical Agriculture. 77: 156-162.

Rengel, Z., and V. Romheld. 2000. Root exudation and Fe uptake and transport in wheat genotypes differing in tolerance to Zn deficiency. Plant and Soil. 222: 25-34.

Sims, J. T., and G. V. Johnson. 1991. Micronutrient soil tests. In Micronutrient in Agriculture. Eds. J. J. Mortvedt, F. R. Cox,L. M. Shuman and R. M. Welch,. Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin, USA.

Van Breemen, N., and R. U. Castro. 1980. Zinc deficiency in wetland rice along a toposequence of hydromorphic soils in The Philippines. Plant Soil. 57: 215–221.

Wissuwa,M., A. Ismail, and R. Graham. 2008. Rice grain zinc concentrations as affected by genotype, native soil-zinc availability, and zinc fertilization. Plant Soil. 306: 37-48.

Welch, R.M., and R.D. Graham. 2002. Breeding crops for enhanced micronutrient content. Plant Soil. 245: 205–214.

Yoshida, S. 1981. Fundamentals of rice crop science. IRRI, Philippines, Los Banos.