Improving Hybrid Rice Seed Production by Better Understanding of Diversity in the Breeding System and Boron Nutrition

Executive summary

Hybrid seed technology has been successfully deployed to increase rice yield in many Asian countries e.g. China, India and Vietnam. The primary target in the development of hybrid seed technology is high yield of the F_1 hybrid seed. The higher yield will translate into lower cost per kg of the seed, which will in turn help to lower farmers' input cost. However, the key process in hybrid seed production in self pollinated crop such as rice is the pollination, fertilization and environmental factors. Common wild rice, the progenitor of cultivated rice is predominately outcrossing. In addition, a major constraint to successful pollination and seed set in cereals is boron deficiency. This project has contributed to knowledge in genotypic variation in breeding system and boron response to improve outcrossing in hybrid seed production, in four sets of objectives as follows.

1. **To identify genotypic variation in traits promote outcrossing in cultivated rice**

Rice is a self-pollinated crop. Up to 7% of outcrossing has been reported in specific varieties or conditions. Genotypic variation for floral morphology relation to outcrossing was evaluated in modern, popular, high yielding rice varieties released in Thailand. For traits require for the female parents, Pathumtani 1 (PTT1) and Neaw Phrae 1 (NP1) were the varieties with the longest stigma. Extents of stigma exertion were between 49-100%, with RD10, RD7 and Sakonakorn 1 (SKN1) showed 100% stigma exertion. NP1 and PTT1 exhibited the longest stigma among all varieties but turn out to possessed the lowest rate of stigma exertion. Among the modern varieties, RD7 and SKN1 had higher potential of outcrossing than the others. For traits require for male parents, R258 and PTT1 exhibited the largest anthers. Number of pollen grains per anther was highest in PTT1. Fertilization was depended on number of pollen deposited on stigma. Most of varieties deposited more than 40 pollen grains per stigma and ensured fertilization. The highest pollen grain per stigma (79) was found in SKN1. For flowering behavior, opening of the spikelet or blooming duration, the period from opening to closing of floret, was varied with genotypes and within the range of 35-50 min. For the long duration genotypes, RD10, R258 and PTT1 lasted for 50 min. Pollen viability test by agar method was developed and can be used to screen for pollen viability in breeding program or other physiological and biological studies in rice.

2. **To identify genotypic variation in B response rice**

Three rice genotypes, KDML 105, Suphanburi 1 (SPR1) and Chianat 1 (CNT1), were evaluated for response to B in sand culture for two seasons. Genotypic variation in response to B was found. B deficiency depressed pollen viability and grain set in rice but no effect on any vegetative part was observed. Concentrations of B in anther and flag leaf can be used to indicate B status that affected grain set in rice. Between the three genotypes, SPR1 was the most efficient and CNT1 was the most inefficient and KDML 105 was intermediate between the former two genotypes. For response of hybrid rice to B levels, four varieties were tested at two B treatments (with and without B) in sand culture. Genotypic variation in hybrid rice was found in B requirement for pollen germination in

agar media. Low germination of pollen in media without added B indicated external B was required for pollen germination. B deficiency reduced average grain set at about 12%.

3. To identify genotypic variation in grain set under high temperature

Variation in grain set was evaluated in 12 rice varieties at three planting dates in dry season (mid-January, late January and mid- February 2009) at two locations, Chiang Mai and Suphanburi. There were genotypic differences in response to high temperature. Differential genotype response to high temperature was attributed to grain set failure and unfilled grain. At mid-February planting date, grain set of the sensitive genotypes, SPT1, RD4, RD10 and RD21 were reduced to 75-78% at The smallest decrease in grain set with planting dates in both locations were found in RD29, SPR1 and PTT1 suggested that they were tolerant to high temperature in this study.

4. To evaluate and select for traits promote outcrossing

Evaluation and selection for traits promote outcrossing, by the method developed from objective 1, were conducted in two sets of crosses: (1) F_4 generation from common wild rice x SPR1 (2) Backcross populations derived from common wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) x local rice and then backcrossed to Suphanburi 1 (*O. sativa* L., cv SPR 1). For the first set, selection and evaluation were carried on until F_6, selected lines showed desirable recombination of many traits, e.g. photoperiod insensitivity, semi-dwarf plant type, large panicle, high number of spikelets/panicle and high seed fertility. However, seed shattering were found in all lines when compared with SPR1 parent. For the second set, backcrossing, evaluation and selection were practiced until BC_2F_4. Sixteen lines with non-seed shattering type, large anther/stigma and desirable agronomic traits were selected. These lines can be used as parents in breeding for male or female parents in hybrid seed production.

Implication of main research findings

1. From variation in floral characteristics in rice the project has contribute to the extent of variation found in rice varieties commonly grown in Thailand. This will help to set the goal of improvement, source of variation and correlation of traits, to be used in breeding program.
2. Selection and screening method for pollen viability has been developed.
3. B deficiency affected rice yield via pollen germination and grain set. Pollen germination of sensitive genotypes were affected by both internal B in pollen and external B in stigma. Applying B in soil has a potential to improve rice yield in areas with low B soil. The results have led to the foliar B application study in hybrid rice evaluation at Bayer research station.
4. Critical value for B established for reproductive development and can be used to diagnose for B status and possibility of B deficiency in rice.
5. Grain set, number of filled grain can be used as screening tools for heat tolerance during reproductive phase. Results on genotypic variation in response to high temperature have led to further research on response to high temperature in rice. This was part of the project funded by TRF and a PhD scholarship funded by The Office of the Higher Education Commission.
6. Advanced lines with large anther and/or large pistil, transferred from common wild rice to cultivated, high yielding rice variety, were developed. They can be used as parents in breeding for large anther or large stigma in hybrid seed production.

การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวลูกผสมด้วยการสร้างความเข้าใจในความหลากหลายของกระบวนการสืบพันธุ์ด้วยเมล็ดและการใช้ธาตุอาหารโบรอน

Executive summary

การใช้เมล็ดพันธุ์ลูกผสม (F_1 hybrids) เป็นเทคโนโลยีเพิ่มผลผลิตข้าว ที่ได้ผลมาแล้วในหลายประเทศ อาทิ จีน อินเดีย และเวียดนาม การได้ผลผลิตสูงของเมล็ดพันธุ์ในชั่วแรก เป็นเป้าหมายสำคัญของการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสม เพราะจะส่งผลประโยชน์ให้แก่เกษตรกรผู้ปลูกไม่ต้องซื้อเมล็ดพันธุ์ในราคาแพง แต่ข้อจำกัดของการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมในพืชที่ตามธรรมชาติเป็นชนิดผสมตัวเอง จึงทำให้มีอัตราการผสมข้ามต่ำและขึ้นกับปัจจัยภายนอกด้วย ข้าวปลูกปกติเป็นพืชผสมตัวเอง แต่บรรพบุรุษของมันคือข้าวป่านั้นเป็นพืชชนิดผสมข้าม ดังนั้น ลักษณะการผสมเกสรที่เอื้อต่อการผสมข้ามที่นำไปใช้ประโยชน์ได้สามารถคัดเลือกจากลูกผสมข้าวปลูก x ข้าวป่า ส่วนปัจจัยภายนอกที่เป็นตัวจำกัดการผสมเกสรและการติดเมล็ดในธัญพืชที่แพร่หลายที่สุดปัจจัยหนึ่งคือการขาดธาตุอาหารโบรอน เพราะโบรอนมีบทบาทสำคัญต่อพัฒนาการของละอองเรณูและการผสมเกสร งานวิจัยนี้ได้การสร้างความเข้าใจในความหลากหลายของกระบวนการสืบพันธุ์ด้วยเมล็ดและการใช้ธาตุอาหารโบรอน และนำไปใช้ประโยชน์ในการเพิ่มอัตราการผสมข้ามในการสร้างลูกผสมโดยแบ่งตามวัตถุประสงค์ย่อยแต่ละข้อดังนี้

1. บ่งชี้ความแตกต่างทางพันธุกรรมของลักษณะที่เอื้อต่อการผสมข้ามในข้าวปลูก

ข้าวปลูกเป็นพืชผสมตัวเอง แต่มีรายงานว่าในบางเงื่อนไขหรือบางพันธุ์พบว่าข้าวปลูกมีอัตราการผสมข้ามสูงได้ถึง 7% งานทดลองนี้จึงได้ศึกษาพบความแตกต่างทางพันธุกรรมของลักษณะดอกที่เกี่ยวกับโอกาสการผสมข้ามในข้าวปลูกพันธุ์ไทยที่เป็นพันธุ์สมัยใหม่ ไม่ไวต่อช่วงแสง ในลักษณะเกสรตัวเมียพบว่าข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 และเหนียวแพร่ 1 มีขนาดยอดเกสรตัวเมียใหญ่ที่สุด บางพันธุ์ขณะผสมเกสรมียอดเกสรตัวเมียโผล่ออกมานอกกลีบดอกโดยพันธุ์ กข 10 กข 7 และสกลนคร 1 มียอดเกสรตัวเมียโผล่ออกมาทั้งหมด 100% ส่วนลักษณะเกสรตัวผู้นั้นพบว่าข้าวพันธุ์ R258 และปทุมธานี 1 มีอับละอองเรณู (anther) ใหญ่ที่สุด พันธุ์ปทุมธานี 1 มีจำนวนละอองเรณูต่อ anther มากที่สุด ทุกพันธุ์ที่ติดเมล็ดเป็นปกติพบว่ามีการโปรยละอองเรณูบนยอดเกสรตัวเมียไม่น้อยกว่า 40 ละอองเรณูขึ้นไป พันธุ์สกลนคร 1 รับละอองเรณูได้สูงสุดถึง 79 ละอองต่อยอดเกสรตัวเมีย สำหรับพฤติกรรมการบานดอกพบว่ากลีบดอกจะบานแยกออกจากกันประมาณ 35-50 นาทีโดย กข 10 R258 และปทุมธานี 1 บานดอกนานที่สุด ได้พัฒนาวิธีการตรวจสอบความมีชีวิตของละอองเรณูโดยการเพาะในวุ้นและเป็นประโยชน์ในการศึกษาทางด้านสรีรวิทยาและปรับปรุงพันธุ์

2. บ่งชี้ความแตกต่างทางพันธุกรรมของการตอบสนองต่อธาตุอาหารโบรอนในข้าว

ศึกษาในข้าวปลูก 3 พันธุ์คือขาวดอกมะลิ 105 สุพรรณบุรี 1 และชัยนาท 1 ทำซ้ำ 2 ฤดู ปลูกปลูกในกระถางบรรจุทรายรดด้วยสารละลายธาตุอาหารครบแต่ผสมโบรอนให้เพียงพอ (B10) และไม่ให้ (B0) ในสารละลายพบว่าการขาดโบรอนมีผลทำให้ลดความมีชีวิตของละอองเรณูส่งผลให้ลดการติดเมล็ดในข้าวแต่ไม่พบผลกระทบใดๆ ต่อการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ การวัดความเข้มข้นของโบรอนในอับละอองเรณูและในใบธงสามารถใช้บ่งชี้สถานะของโบรอนที่มีผลต่อการติดเมล็ดได้ พบความแตกต่างระหว่างพันธุ์ในการตอบสนองต่อโบรอนในการติดเมล็ดของพันธุ์ที่ศึกษา โดยพันธุ์สุพรรณบุรี 1 มีสมรรถนะการใช้โบรอนได้สูงสุด รองลงมาได้แก่ขาวดอกมะลิ 105 และต่ำสุดได้แก่ชัยนาท 1 นอกจากนั้นยังได้ศึกษาในข้าวพันธุ์ลูกผสม 4 พันธุ์พบว่าการขาดโบรอนในสารละลายที่ให้ทางรากทำให้อัตราการติดเมล็ดลดลงประมาณ 12% มีความแตกต่างระหว่างพันธุ์ในความต้องการโบรอนในการงอกของละอองเรณูเมื่อเพาะในวุ้น แสดงว่าการงอกของละอองเรณูนั้นนอกจากต้องการโบรอนภายในตัวละอองเรณูเองแล้ว ยังต้องการโบรอนภายนอกในยอดเกสรตัวเมียให้เพียงพออีกด้วย

3. บ่งชี้ความแตกต่างทางพันธุกรรมของการติดเมล็ดในสภาพอุณหภูมิสูง

ประเมินการติดเมล็ดของข้าวปลูก 12 พันธุ์โดยจัดวันปลูก 3 ช่วงในฤดูนาปรัง เพื่อให้ระยะเวลาออกดอกกระทบอุณหภูมิสูง ศึกษาในแปลงทดลองที่มหาวิทยาลัยเชียงใหม่และแปลงทดลองของภาคเอกชนที่สุพรรณบุรี จากผลการทดลองทั้งสองแห่งพบความแตกต่างระหว่างพันธุ์ในการตอบสนองต่ออุณหภูมิโดยเมื่อปลูกกลางเดือนกุมภาพันธุ์พบว่าพันธุ์ที่ไม่ทนร้อน ได้แก่สันป่าตอง 1 กข 4 กข 10 และกข 21 ติดเมล็ดเพียง 75-78% ผลกระทบต่อการติดเมล็ดในข้าวหรือการเกิดเมล็ดลีบเป็นผลมาจากการไม่ผสมเกสรในระยะออกดอกหรือถึงแม้ผสมเกสรได้แต่เกิดเมล็ดลีบไม่เต็มเมล็ดเป็นผลต่อการสะสมแป้งในเมล็ด พันธุ์กข 29 สุพรรณบุรี 1 และปทุมธานี 1 ถูกจัดเป็นพันธุ์ทนร้อนและติดเมล็ดเป็นปกติ

4. ประเมินและคัดเลือกลักษณะที่เอื้อต่อการผสมข้าม

ดำเนินงานจากคู่ผสม 2 ชุด คือ (1) ลูกผสมชั่วที่ 4 ระหว่างข้าวป่าสามัญกับข้าวปลูก (2) ลูกผสมกลับจากคู่ผสมระหว่างข้าวป่าสามัญ x สุพรรณบุรี 1 แล้วผสมกลับไปยังสุพรรณบุรี 1 ได้ใช้วิธีการที่พัฒนามาจากวัตถุประสงค์ที่ 1 ในการคัดเลือก ในชุดแรกได้ประเมินและคัดเลือกได้ลูกที่มีลักษณะใหม่ๆ จนถึงชั่วที่ 6 สายพันธุ์ที่คัดเลือกมีขนาดเกสรใหญ่และมีลักษณะอื่นๆ ดีตามต้องการแต่ยังพบว่ามีอัตราการร่วงของเมล็ดสูงอยู่ ในชุดที่ 2 ได้คัดเลือก ประเมิน ผสมกลับจนถึงผสมกลับครั้งที่ 2 ชั่วที่ 4 ได้คัดเลือกสายพันธุ์ที่มีขนาดเกสรใหญ่และมีลักษณะอื่นๆ ดีตามต้องการและเมล็ดไม่ร่วงได้ 16 สายพันธุ์ ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อคัดเลือกลักษณะที่เอื้อต่อการผสมข้ามได้ต่อไป

การใช้ประโยชน์จากผลงานวิจัย

1. จากงานศึกษาความแตกต่างระหว่างพันธุ์ข้าวปลูกในลักษณะที่เกี่ยวข้องกับการผสมเกสรทำให้ทราบถึงขอบเขตความสามารถของพันธุ์ต่างๆ สามารถกำหนดเป้าหมายของงานปรับปรุงพันธุ์ลักษณะที่ต้องการปรับปรุง ความสัมพันธ์ของลักษณะต่างๆ จะช่วยให้ทราบถึงทิศทางของการตอบสนองต่อการคัดเลือกเพื่อปรับปรุงลักษณะดอกต่างๆ ให้ไปในทางที่ต้องการ

2. ได้พัฒนาวิธีการตรวจสอบความมีชีวิตของละอองเรณูอย่างง่าย รวดเร็ว แม่นยำ สามารถใช้ในงานศึกษาผลกระทบจากสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้อย่างกว้างขวางรวมทั้งช่วยในการคัดเลือกพันธุ์

3. งานศึกษาการตอบสนองต่อธาตุอาหารโบรอนนำไปสู่ความเข้าใจในผลกระทบของการขาดโบรอนต่อผลผลิตข้าวผ่านทางการลดการงอกของละอองเรณูส่งผลให้การผสมเกสรล้มเหลว และลดการติดเมล็ดในที่สุด ในพื้นที่ที่มีโบรอนในดินต่ำการใส่โบรอนในดินมีโอกาสช่วยลดผลกระทบต่อผลผลิตข้าว ในพันธุ์ที่มีสมรรถนะการใช้โบรอนต่ำยังพบว่าการงอกของละอองเรณูต้องการโบรอนภายในตัวมันเองและโบรอนภายนอกในบริเวณเกสรตัวเมียด้วย ผลการทดลองนำไปสู่งานวิจัยเรื่องการจัดการธาตุโบรอนในการผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวลูกผสมในภาคเอกชน

4. นอกจากนั้นงานศึกษาด้านโบรอนยังได้ทราบและกำหนดค่าวิกฤตของความเข้มข้นโบรอนที่มีผลต่อพัฒนาการด้านสืบพันธุ์และสามารถใช้ระบุสถานะของธาตุอาหารโบรอนและการขาดโบรอนในข้าว

5. งานศึกษาการตอบสนองต่ออุณหภูมิสูงในข้าวทำให้เข้าใจและสามารถใช้ลักษณะการติดเมล็ดจำนวนเมล็ดเต็มในการคัดเลือกพันธุ์เพื่อปลูกในสภาพอากาศร้อน ผลจากการศึกษาความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้พัฒนาต่อไปเป็นส่วนหนึ่งของงานวิจัยข้าวไทยเพื่อโลกร้อน (ทุนสนับสนุนจากสกว.) และโครงการวิจัยเรื่องการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของการตอบสนองต่ออุณหภูมิสูงในข้าว (ทุนวิจัยระดับปริญญาเอกจากสกอ.)

6. ใช้ความเข้าใจและวิธีการตรวจสอบที่พัฒนาในการคัดเลือกและผสมพันธุ์ข้าว ได้ลูกผสมสายพันธุ์ก้าวหน้าที่มีลักษณะเอื้อต่อการผสมข้ามที่พัฒนามาจากข้าวป่าสามัญและข้าวปลูก สายพันธุ์เหล่านี้สามารถนำไปใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์เพื่อสร้างพ่อแม่ในการเพิ่มผลผลิตเมล็ดลูกผสมได้