



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การคัดเลือกข้าวไร่พันธุ์พื้นเมืองที่ทนทานต่อการขาดธาตุฟอสฟอรัส

เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวไร่

Large-scale screening of indigenous upland rice tolerant to phosphorus
deficiency for upland rice improvement

โดย

ดร. สมพงศ์ จันทร์แก้ว และคณะ

มิถุนายน 2561

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การคัดเลือกข้าวไร่พันธุ์พื้นเมืองที่ทนทานต่อการขาดธาตุฟอสฟอรัส
เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวไร่

Large-scale screening of indigenous upland rice tolerant to phosphorus
deficiency for upland rice improvement

ดร. สมพงศ์ จันทร์แก้ว

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ศ.ดร.พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและ
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. และมหาวิทยาลัยขอนแก่น ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
บทสรุปผู้บริหาร	จ
เนื้อหางานวิจัย	1
วัตถุประสงค์โครงการ	1
การดำเนินงานวิจัย	1
ผลการทดลองและอภิปราย	6
สรุปผลการทดลอง	29
Output ที่ได้จากโครงการ	29
เอกสารอ้างอิง	30
ภาคผนวก	32

บทคัดย่อ

การขาดฟอสฟอรัส (P) เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ผลผลิตข้าวลดลงในหลายพื้นที่ทั่วโลก วิธีดั้งเดิมในการบรรเทาการขาดฟอสฟอรัส คือการใส่ปุ๋ยที่มีฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบ อย่างไรก็ตามมากกว่า 90% ของปุ๋ยที่ใส่ลงไปอาจจะเปลี่ยนไปเป็นรูปแบบที่พืชไม่สามารถนำไปใช้ได้หรือถูกตรึงไว้ในดินทำให้พืชประสบกับปัญหาขาดฟอสฟอรัส การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพื้นเมืองในความทนทานต่อการขาดธาตุฟอสฟอรัสและประเมินความสัมพันธ์กับเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับยีน *Pup-1* ที่ทนต่อความการขาดฟอสฟอรัส ในเชื้อพันธุ์กรรมข้าวไร่พื้นเมืองจำนวน 168 สายพันธุ์ภายใต้สภาพเรือนทดลองในระบบการปลูกพืชโดยใช้สารละลายที่มีการเติมและไม่เติมฟอสฟอรัส การเก็บข้อมูลต่าง ๆ เช่น คะแนนอาการขาดฟอสฟอรัส ความสูง จำนวนการแตกกอ และน้ำหนักแห้ง หลังจากนั้นทำการเปลี่ยนเป็นเปอร์เซ็นต์การลดลงของน้ำหนักแห้ง และดัชนีความทนทานต่อการขาดฟอสฟอรัส เพื่อนำมาวิเคราะห์ผลสำหรับการจำแนกระดับความทนทาน ซึ่งผลการทดลอง พบว่า ลักษณะที่ทำการศึกษาในสภาพขาดฟอสฟอรัส ได้แก่ จำนวนหน่อต่อกอ น้ำหนักแห้งต้น น้ำหนักแห้งราก น้ำหนักแห้งรวม อัตราส่วนของน้ำหนักแห้งรากต่อน้ำหนักแห้งต้น การให้คะแนนอาการขาดฟอสฟอรัส และเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งที่ลดลง มีความแตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์และฤดูที่ทดสอบ รวมทั้งมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทั้งสองในลักษณะจำนวนหน่อต่อกอ น้ำหนักแห้งต้น น้ำหนักแห้งราก น้ำหนักแห้งรวม และการให้คะแนนอาการขาดฟอสฟอรัสด้วย โดยผลจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะต่าง ๆ ที่ใช้ในการประเมิน พบว่า ในสภาพขาดฟอสฟอรัส ค่า คะแนนอาการขาดฟอสฟอรัส มีความสัมพันธ์เชิงลบกับ จำนวนการแตกกอ ($r = -0.293^{**}$) น้ำหนักแห้งรวม ($r = -0.291^{**}$) น้ำหนักแห้งต้น ($r = -0.356^{**}$) และน้ำหนักแห้งราก ($r = -0.216^{**}$) ในขณะที่ คะแนนอาการขาดฟอสฟอรัส มีความสัมพันธ์กันในเชิงลบกับเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งที่ลดลง ($r = 0.361^{**}$) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าคะแนนอาการขาดฟอสฟอรัสสามารถใช้คัดเลือกเชื้อพันธุ์กรรมข้าวที่ทนทานต่อการขาดฟอสฟอรัสเบื้องต้นได้นอกจากนั้นสามารถแบ่งเชื้อพันธุ์กรรมข้าวพื้นเมืองได้เป็น 6 กลุ่มตามดัชนีความทนทานต่อการขาดฟอสฟอรัส การใช้คะแนนอาการขาดฟอสฟอรัส ร่วมกับ ดัชนีความทนทานต่อการขาดฟอสฟอรัส สามารถคัดเลือกข้าวไร่ข้าวพื้นเมืองสายพันธุ์ จำนวน 12 สายพันธุ์ได้แก่ ULR031 ULR260 ULR124 ULR305 ULR180 ULR026 ULR145 ULR176 ULR183 ULR185 ULR186 และ ULR213 ที่มีความทนทานในระดับสูง นอกจากนั้นยังมีข้าวนาสวน 1 สายพันธุ์คือพันธุ์ PLD แสดงความทนทานในระดับสูงด้วย

ผลการประเมินความสัมพันธ์กับเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับยีน *Pup-1* ที่ทนต่อความการขาดฟอสฟอรัส จำนวนทั้งหมด 9 เครื่องหมาย ได้แก่ *Pup1-K42*, *Pup1-K43*, *Pup1-K46*, *Pup1-K52*, *Pup1-K41*, *PSTol-1*, *K1*, *K5* และ *K29-1* ผลการทดลองพบว่า เชื้อพันธุ์กรรมข้าวไร่พื้นเมืองแต่ละสายพันธุ์มีการปรากฏแถบดีเอ็นเอที่เป็นเป้าหมาย ตั้งแต่ 0 - 9 ตำแหน่ง อย่างไรก็ตาม

ความสัมพันธ์ระหว่างการปรากฏแถบดีเอ็นเอและระดับความทนทานมีความสัมพันธ์กันค่อนข้างต่ำ โดยเครื่องหมายที่มีประสิทธิภาพในการแยกความแตกต่างได้ดีที่สุดคือเครื่องหมาย ชนิด *K1* และ *K29-1* อย่างไรก็ตามมีข้าวบางสายพันธุ์ที่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเป้าหมายใด ๆ เลย แต่มีความทนทานระดับสูงเช่น ULR183 และ ULR213 ซึ่งอาจเป็นสายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับการนำไปศึกษาต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: ดัชนีความทนทานต่อการขาดฟอสฟอรัส น้ำหนักแห้งราก เครื่องหมายโมเลกุล การวิเคราะห์สหสัมพันธ์

Abstract

Phosphorus (P) deficiency has been identified as major factor limiting rice yield throughout the world. The traditional way to alleviate P deficiency is the application of P fertilizer. However, more than 90% of added P fertilizer may be rapidly transformed to the forms that are not easily available to plant or fixed with soil particles that ledge to P deficiency of plant. The objective of this study is to screening to P deficiency tolerant and validation *Pup-1* gene linked markers in Thai indigenous upland rice germplasm. One hundred and sixty eight upland rice varieties were used as materials for greenhouse screening with solution culture method with and without phosphorus nutrient. Traits related to P-deficiency were recorded such as plant symptom score, leaf dead score, tiller number, root and shoot dry weight. The data were transforming to the percentage of dry weight reduction and phosphorus deficiency tolerance index (PDTI) for varieties classification. The results from non-applied P shown that genotypes and season are causes for different in tiller number, shoot dry weight, root dry weight and total dry weight, root/shoot ratio, % dry weight reduction and plant symptom score. Moreover, the genotypes x season interaction was highly significant in tiller number, shoot dry weight, root dry weight, total dry weight and plant symptom score. The plant symptom score was negative correlated with tiller number ($r = -0.293^{**}$), total dry weight ($r = -0.291^{**}$), shoot dry weight ($r = -0.356^{**}$) and root dry weight ($r = -0.216^{**}$) while positive correlated with dry weight reduction percentage ($r = 0.361^{**}$). The result indicated that plant symptom score can be used as selection criteria for P deficiency tolerance screening in rice. Moreover, indigenous rice germplasm can be derived into 6 groups by PDTI. Based on plant symptom score and PDTI, twelve indigenous upland rice were identified as highest tolerance varieties including ULR031, ULR260, ULR124, ULR305, ULR180, ULR026, ULR145, ULR176, ULR183, ULR185, ULR186 and ULR213 were selected in addition 1 of lowland rice line (PLD) was also identified.

The validation of *Pup-1* linked gene with 9 markers including *Pup1-K42*, *Pup1-K43*, *Pup1-K46*, *Pup1-K52*, *Pup1-K41*, *PSTol-1*, *K1*, *K5* and *K29-1* were demonstrated that each upland rice varieties were appeared the expected band ranged from 0 to 9 markers. However, the relation between markers and tolerance ability were low. The most efficiency markers that can be distinguish between tolerance and susceptible

lines is *K1* and *K29-1*. Moreover, some indigenous upland rice lines such as ULR183 and ULR213 has the high tolerance ability without *Pup-1* linked gene product. Those varieties were suit for future study for P- deficiency genes.

Keywords: Phosphorus deficiency tolerance index, Harvesting index, Root dry weight, Yoshida solution

Executive summary

การคัดเลือกข้าวไร่พันธุ์พื้นเมืองที่ทนทานต่อการขาดธาตุฟอสฟอรัสเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวไร่ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพื้นเมืองในความทนทานต่อการขาดธาตุฟอสฟอรัส และประเมินความสัมพันธ์กับเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับยีน *Pup-1* ที่ทนต่อความการขาดธาตุฟอสฟอรัสในเชื้อพันธุ์กรรมข้าวไร่พื้นเมืองจำนวน 168 พันธุ์ เพื่อใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวไร่ให้ทนทานต่อการขาดธาตุฟอสฟอรัส ภายใต้สภาพเรือนทดลองในระบบการปลูกพืชโดยใช้สารละลายที่มีการเติมและไม่เติมธาตุฟอสฟอรัส ผลทดลองพบว่า มีความแตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์และฤดูที่ทดสอบรวมทั้งมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทั้งสองในลักษณะที่เกี่ยวข้องกับความทนทาน นอกจากนั้นการใช้ลักษณะที่ทำการประเมินได้ง่าย เช่น ค่าคะแนนอาการขาดฟอสฟอรัสที่มีความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะต่าง ๆ ทั้งในทางบวกและทางลบ สามารถนำมาใช้คัดเลือกเชื้อพันธุ์กรรมข้าวไร่จำนวนมากให้ทนทานต่อการขาดฟอสฟอรัสเบื้องต้นได้ ซึ่งหากจะให้ได้ข้อมูลที่น่าเชื่อถือ การใช้คะแนนอาการขาดฟอสฟอรัสร่วมกับดัชนีความทนทานต่อการขาดฟอสฟอรัสจะสามารถคัดเลือกได้อย่างแม่นยำ จากการศึกษาสามารถคัดเลือกข้าวพื้นเมืองจำนวน 13 พันธุ์ ได้แก่ ULR031 ULR260 ULR124 ULR305 ULR180 ULR026 ULR145 ULR176 ULR183 ULR185 ULR186 ULR213 และ PLD ที่มีความทนทานต่อการขาดธาตุฟอสฟอรัสในระดับสูงได้ ผลการประเมินความสัมพันธ์ระหว่างระดับความทนทานกับเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับยีน *Pup-1* พบว่า มีความสัมพันธ์กันค่อนข้างต่ำและมีบางสายพันธุ์ที่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเป้าหมายใด ๆ เลย แต่มีความทนทานระดับสูง ซึ่งอาจเป็นสายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับการนำไปศึกษาต่อไปในอนาคต

เนื้อหางานวิจัย

(1) วัตถุประสงค์ของโครงการ

การทดลองเรื่อง การคัดเลือกข้าวไร่พันธุ์พื้นเมืองที่ทนทานต่อการขาดธาตุฟอสฟอรัสเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวไร่ มีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวไร่พื้นเมืองในความทนทานต่อการขาดธาตุฟอสฟอรัสและประเมินความสัมพันธ์ของความทนทานกับเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับยีน *Pup-1* ที่มีรายงานในการทนทานต่อความการขาดธาตุฟอสฟอรัส

(2) การดำเนินงานวิจัย

2.1. พันธุ์ข้าวที่ใช้

การทดลองในครั้งนี้ ได้ใช้สายพันธุ์ข้าวไร่ และข้าวนาสวนจำนวน 168 สายพันธุ์ประกอบไปด้วย ข้าวไร่พันธุ์การค้า 2 สายพันธุ์คือ สกลนคร (SKN) และ พญาลิ้มแกง (PLK) ข้าวนาสวนพันธุ์การค้า 2 สายพันธุ์ คือ กข6 (RD6) และ หอมมะลิณี (HMLN) และเชื้อพันธุ์กรรมข้าวไร่พื้นเมืองอีก 164 สายพันธุ์ จากแหล่งปลูกข้าวไร่ทั่วประเทศ เช่น จังหวัดเชียงใหม่ เลย เพชรบูรณ์ ชัยภูมิ และ พัทลุง เป็นต้น

2.2. วิธีการประเมินความทนทานต่อการขาดธาตุฟอสฟอรัสในสภาพโรงเรือน (Greenhouse evaluation) ในปี 2559 และ 2560

สายพันธุ์ข้าว ทั้งหมด 168 สายพันธุ์ นำมาประเมินความทนทานต่อการขาดธาตุฟอสฟอรัสในระยะกล้าโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Gregorio et al. (1997) ด้วยการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ในบล็อก (Randomized Complete Block Design; RCBD) จำนวน 3 ซ้ำ โดยใช้โฟมเจาะรูเป็นวัสดุปลูกทรงด้วยกระบะทั้งหมด 6 กระบะต่อหนึ่งซ้ำ กระบะละ 128 หลุม สายพันธุ์ละ 3 หลุม หลุมละ 1 ต้น โดยแต่ละซ้ำ จะมีข้าวพันธุ์สกลนคร ซึ่งเป็นข้าวพันธุ์เปรียบเทียบทุก ๆ กระบะทำการประเมินในช่วงฤดูแล้งมีขั้นตอนดังนี้

2.2.1. คัดเลือกเมล็ดข้าวที่สมบูรณ์นำมาเพาะลงถุง โดยแช่น้ำไว้ 24 ชั่วโมงแล้วทำการเทน้ำออกหลังจากนั้นให้ความชื้นแก่ข้าวจนข้าวมีความยาวประมาณ 5 เซนติเมตร นำต้นกล้าข้าวย้ายไปปลูกในวัสดุปลูกที่ใช้โฟมเจาะรู (styroform) (Gregorio et al., 1997) แช่น้ำให้ข้าวปรับตัวเป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นทำการเปลี่ยนน้ำออก แล้วใส่สารละลายธาตุอาหารตามสูตรของ Yoshida et al. (1976) ดังตารางที่ 1 และทำการเปลี่ยนสารละลายทุก ๆ 3 วันจนครบ 7 วัน หลังจากนั้นเริ่มทำการทดลองโดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุด คือ ชุดควบคุม (เติมสารละลายอาหารปกติ) และ ชุดทดลอง (ไม่มีการเติมสารอาหาร Stock 2; ไม่มีฟอสฟอรัส) (ตารางที่ 1)

2.2.2. ทำการเปลี่ยนสารละลายธาตุอาหารทุก ๆ 3 วัน จนต้นข้าวมีอายุ 21 วัน จากนั้นเริ่มทำการประเมินความทนทานต่อการขาดธาตุฟอสฟอรัส โดยมีวิธีการประเมินลักษณะต่าง ๆ ดังนี้

1) การประเมินความทนทานต่อการขาดธาตุฟอสฟอรัส โดยการขาดธาตุฟอสฟอรัสมีผลกระทบต่อข้าว แบ่งได้เป็นหลายระดับโดยวัดจากผลกระทบที่เกิดขึ้นกับต้นข้าวในการ

ขาดธาตุฟอสฟอรัส แบ่งเป็น 5 ระดับเริ่มต้นจาก 1 3 5 7 9 ตามลำดับ (IRRI, 2002) (ตารางที่ 2) ทำการให้คะแนนกับต้นข้าวแต่ละต้น ของแต่ละซ้ำ ทุก ๆ 5 วันจนเสร็จสิ้นการทดลอง

2) การเก็บข้อมูลลักษณะทางการเกษตร อื่นๆ ได้แก่ จำนวนหน่อตอก (tiller number; TN) ความสูง (plant height; PH) น้ำหนักแห้งต้น (shoot dry weight; SDW) น้ำหนักแห้งราก (root dry weight; RDW) น้ำหนักแห้งรวม (total dry weight; TDW) น้ำหนักแห้งรากต่อน้ำหนักแห้งต้น (root/shoot ratio; R/S) และเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งที่ลดลง (% dry weight reduction; %DWR) ในวันที่เสร็จสิ้นการทดลองและหลังจากชั่งน้ำหนักแห้งเรียบร้อยแล้ว

2.3. ประเมินความสัมพันธ์ของความทนทานกับเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับยีน *Pup-1* ที่มีรายงานในการทนทานต่อความการขาดธาตุฟอสฟอรัส

ทำการตัดตัวอย่างใบข้าว 0.3-0.5 กรัม ที่อายุต้นกล้าประมาณ 2-3 สัปดาห์ บดตัวอย่างด้วยไนโตรเจนเหลวแล้วทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ตามวิธีของ Doyle and Doyle, (1987) จากนั้นตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis ปลั่งจากปรับปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ จึงนำไปทำปฏิกิริยา PCR กับเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับยีน *Pup-1* ที่มีรายงานในการทนทานต่อความการขาดธาตุฟอสฟอรัส (ตารางที่ 3) แล้วทดสอบความแตกต่างของการเกิดแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis แล้วจึงบันทึกผลการเกิดแถบดีเอ็นเอ

2.4. การวิเคราะห์ผลการทดลอง

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบ RCBD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (Duncan's Multiple Range test) และใช้ลักษณะ TN, PH, SDW, RDW, TDW และ R/S จากการทดลองในสภาพปกติและสภาพขาดฟอสฟอรัส เพื่อคำนวณหา ดัชนีความทนทานต่อการขาดฟอสฟอรัส (phosphorus deficiency tolerance index; PDTI) สำหรับใช้จำแนกเชื้อพันธุ์กรรมข้าวไร่พื้นเมืองที่มีค่า PDTI ที่แตกต่างกัน และวิเคราะห์สหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะโดยหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ด้วยโปรแกรม R (R-language and environment for statistical computing and graphics) version 2.13.0 (Venables et al., 2009)

ตารางที่ 1 การเตรียมสูตรอาหาร Yoshida (1976) สำหรับปลูกทดสอบข้าวในสารละลาย

Stock (AR grade)	ชื่อสามัญ	ปริมาณที่ต้องการ	
		500 ml	1000 ml
Stock 1 NH_4NO_3	Ammonium nitrate, N	45.7	91.4
Stock 2 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Sodium phosphate monobasic monohydrate, P	17.8	35.6
Stock 3 K_2SO_4	Potassium sulfate, K	35.7	71.4
Stock 4 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Calcium chloride, dihydrate, Ca	58.6	117.2
Stock 5 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Magnesium sulfate, 7-hydrate	162	324
Stock 6 Micronutrient consist;			

ตารางที่ 1 การเตรียมสูตรอาหาร Yoshida (1976) สำหรับปลูกทดสอบข้าวในสารละลาย

Stock (AR grade)	ชื่อสามัญ	ปริมาณที่ต้องการ	
		500 ml	1000 ml
MgCl ₃ , 4H ₂ O	Manganese chloride,4-hydrate, Mn	0.75	1.5
((NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ,4H ₂ O)	Ammonium molobdate,4-hydrate, Mo	0.037	0.074
ZnSO ₄ ,7H ₂ O	Zinc sulfate,7-hydrate, Zn	0.175	0.35
H ₃ BO ₃	Boric acid, B	0.467	0.934
CuSO ₄ ,5H ₂ O	Cupric sulfate,5-hydrate, Cu	0.155	0.31
FeCl ₃ ,6H ₂ O	Ferric chloride,6-hydrate, Fe	3.85	7.7
C ₆ H ₈ O ₇ ,H ₂ O	Citric acid	5.95	11.9
H ₂ SO ₄	Sulfuric acid	25	50

เมื่อต้องการเตรียมสารละลายอาหาร 50 ลิตร ให้ใส่สารละลายแต่ละ stock ๆ ละ 62.5 มิลลิลิตร ผสมกันและปรับปริมาตรได้ 50 ลิตร แล้วจึงปรับ pH ให้อยู่ในระดับ 4.8 - 5.2 Stock ที่เตรียมไว้สามารถอยู่ได้ไม่เกิน 2 เดือนและสารละลายอาหารที่ผสมเสร็จแล้วสามารถอยู่ได้ไม่เกิน 1 เดือน

ตารางที่ 2 ค่าคะแนนความทนทานต่อการขาดธาตุฟอสฟอรัส ของต้นข้าวตามมาตรฐานของสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ

Score	Observation	Tolerant level
1	Growth and tillering nearly normal	Highly tolerant
3	Growth and tillering nearly normal; older leaves reddish-brown, purple, or orange yellow	Tolerant whitish and rolled
5	Growth and tillering retarded; many leaves discolored	Moderately tolerant Only a few are elongating
7	Growth and tillering ceases; most leaves discolored or dead	Susceptible Some plants drying
9	Almost all plant dead or dying	Highly susceptible

ที่มา: IRRI (2002)

ตารางที่ 3 รายละเอียดเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับยีน *Pup-1* ที่มีรายงานในการทนทานต่อความการขาดธาตุฟอสฟอรัส

No.	Primer names	Sequences (5'-3')		References
1	<i>Pup1-K41</i>	Forward	TgATgAATCCATAggACAgCgT	Chin et al., 2010
		Reverse	TCAggTggTgCTTCgTTggTA	
2	<i>Pup1-K42</i>	Forward	CCCgAgAgTTCATCAgAAggA	Chin et al., 2010
		Reverse	AgTgAgTggCgTTTgCgAT	
3	<i>Pup1-K43</i>	Forward	AggAggATgAgCCTgAAgAgA	Chin et al., 2010
		Reverse	TCgCACTAACAgCAgCAgATT	
4	<i>Pup1-K46</i>	Forward	TgAgATAgCCgTCAAgATgCT	Chin et al., 2010
		Reverse	AAggACCACCATTCCATAgC	
5	<i>Pup1-K52</i>	Forward	ACCGTTCCCAACAgATTCCAT	Chin et al., 2010
		Reverse	CCCGTAATAgCAACAACCCAA	
6	<i>K1</i>	Forward	AgTCTggATggACAACCTCTgCCTg	Chin et al., 2011
		Reverse	TgCTAgCTCATTgCCgTTACgTCg	
7	<i>K5</i>	Forward	ATTCAgACATCgACggCgAC	Chin et al., 2011
		Reverse	TCCTCgTAAACATggCTTgC	
8	<i>K29-1</i>	Forward	ATggCCAACggggTAgAg	Chin et al., 2011
		Reverse	gTCCAggTAACCACgAggAA	
9	<i>PSTOL1</i>	Forward	ATgCTgCTCTgTCAAaggCAT	Mukherjee et al., 2014
		Reverse	CAAgCTCAAAGCCCTTTTggTg	

(3) ผลการทดลองและอภิปราย

งานทดลองนี้ ได้ทำการประเมินเชื้อพันธุกรรมข้าวไร่พื้นเมืองต่อความทนทานต่อการขาดธาตุฟอสฟอรัสในระยะกล้า ด้วยการทดสอบในสารละลาย โดยทำการทดสอบใน 2 ปี คือ 2559 และ 2560 จากนั้นเก็บข้อมูลและวิเคราะห์ความแตกต่างของลักษณะที่ศึกษา ได้แก่ จำนวนหน่อตอกอ (tiller number; TN) ความสูง (plant height; PH) น้ำหนักแห้งต้น (shoot dry weight; SDW) น้ำหนักแห้งราก (root dry weight; RDW) น้ำหนักแห้งรวม (total dry weight; TDW) อัตราส่วนของน้ำหนักแห้งรากต่อน้ำหนักแห้งต้น (root/shoot ratio; R/S) การให้คะแนนอาการขาดฟอสฟอรัส (plant symptom score; SS) และ เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งที่ลดลง (dry weight reduction percentage; %DWR) ได้ผลการทดลองดังนี้

การทดลองในปีที่หนึ่ง (2559) พบว่า ลักษณะ TN PH RDW SDW และ TDW มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งในการทดลองในสภาพปกติและขาดฟอสฟอรัส ในขณะที่ R/S ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสภาพปกติ แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในสภาพขาดฟอสฟอรัส ขณะที่ SS และ DWR มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในสภาพขาดฟอสฟอรัส โดยในการทดลองครั้งนี้ ต้นข้าวที่ปลูกในสภาพขาดฟอสฟอรัสมีการลดลงของน้ำหนักแห้งถึง 47.74 % เมื่อเทียบกับสภาพปกติ (ตารางที่ 4)

การทดลองในปีที่สอง (2560) พบว่า ลักษณะ TN PH RDW SDW และ TDW มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งในการทดลองในสภาพปกติและขาดฟอสฟอรัส ในขณะที่ R/S ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในสภาพปกติและในสภาพขาดฟอสฟอรัส ขณะที่ SS และ DWR มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในสภาพขาดฟอสฟอรัส โดยในการทดลองครั้งนี้ ต้นข้าวที่ปลูกในสภาพขาดฟอสฟอรัสมีการลดลงของน้ำหนักแห้ง 34.14% เมื่อเทียบกับสภาพปกติ (ตารางที่ 4)

ผลการทดลองทั้งสองปี พบว่า มีความแตกต่างกันระหว่างปีที่ทำการทดลอง ซึ่งจะเห็นได้ว่าในปีแรก พืชจะแสดงความรุนแรงของการขาดฟอสฟอรัสสูงกว่า จากค่าซึ่งสังเกตได้จากค่า SS ที่มีค่าเท่ากับ 4.04 และ 3.28 ตามลำดับ ซึ่งผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนรวม (combined analysis) พบว่า พันธุ์ข้าว (G) และปีที่ทำการศึกษา (S) มีส่วนทำให้เกิดความแตกต่างกันของทุกลักษณะที่ทำการวิเคราะห์ นอกจากนั้น ยังมีผลของปฏิสัมพันธ์ (G × S) ในทุกลักษณะยกเว้น R/S ในสภาพปกติ TN R/S และ DWR ในสภาพขาดฟอสฟอรัส (ตารางที่ 4) จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าสายพันธุ์ข้าวมีผลต่อลักษณะต่าง ๆ ค่อนข้างสูงโดยเฉพาะในสภาพขาดฟอสฟอรัสซึ่งมีค่าความแปรปรวน (CV) อยู่ระหว่าง 7.3 ถึง 15.9 เปอร์เซ็นต์

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า การแสดงอาการต่อการขาดฟอสฟอรัสแตกต่างกันในหลาย ๆ ลักษณะ ทั้งนี้เนื่องจากช่วงเวลาทำการทดลองทั้ง 2 ครั้งแตกต่างกันโดยพบว่า มีอุณหภูมิเฉลี่ยในโรงเรือนแตกต่างกันถึง 4 องศาเซลเซียส (32 องศาเซลเซียสในปีที่หนึ่ง และ 28 องศาเซลเซียส ในปีที่สอง) ส่งผลให้ความรุนแรงของการแสดงอาการของใบแตกต่างกัน นอกจากนั้นยังจะเห็นได้จากค่าน้ำหนักแห้งรวม (TDW) ในสภาพขาดฟอสฟอรัสในปีแรกมีค่าน้อยกว่าปีที่สองเนื่องมาจากปัจจัยด้านอุณหภูมิทำให้ข้าวโตช้า นอกจากนั้นผลของการขาดฟอสฟอรัสยังส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืช

(Marschner, 2012) ส่งผลให้เกิดการชะลอการเจริญเติบโต ใบมีขนาดเล็กลง และลดการแตกกอ (Dobermann and Fairhurst, 2000) นอกจากนั้นจะเห็นได้ว่าน้ำหนักแห้งต้น (SDW) ในสภาพขาดฟอสฟอรัสมีการลดลงแตกต่างจากสภาพปกติ ดังนั้นการใช้ SDW เป็นลักษณะที่สำคัญลักษณะหนึ่งที่จะสามารถใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความทนทานต่อการขาดฟอสฟอรัสได้ (Aluwihare et al., 2016)

อย่างไรก็ตามการประเมินเชื้อพันธุกรรมจำนวนมาก อาจมีข้อจำกัดเรื่อง งบประมาณ และพื้นที่สำหรับการทดลอง โดยที่ใช้ลักษณะที่ซับซ้อนหรือทำการวัดและประเมินยากเกินไปอาจเป็นอุปสรรคในการทดลอง ดังนั้นจึงควรหาลักษณะที่มีความสัมพันธ์กันเพื่อใช้เป็นตัวช่วยคัดเลือกทางอ้อมซึ่งจะทำให้สามารถทำการทดลองกับเชื้อพันธุกรรมจำนวนมากได้

ในการทดลองครั้งนี้ ได้ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะต่าง ๆ ที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น ในสภาพปกติและขาดฟอสฟอรัส ผลการวิเคราะห์ พบว่า ในสภาพขาดฟอสฟอรัสค่าคะแนน (SC) มีความสัมพันธ์เชิงลบกับจำนวนหน่อต่อกอ ($r = -0.293^{**}$) น้ำหนักแห้งรวม (TDW) ($r = -0.291^{**}$) น้ำหนักแห้งต้น (SDW) ($r = -0.356^{**}$) และน้ำหนักแห้งราก (RDW) ($r = -0.216^{**}$) (ตารางที่ 5) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ขนาดของต้นที่ใหญ่หรือมีน้ำหนักแห้งมาก มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการทนทานต่อการขาดฟอสฟอรัส สอดคล้องกับสหสัมพันธ์เชิงบวกระหว่าง SC กับ DWR ($r = 0.361^{**}$) (ตารางที่ 5) ซึ่งแสดงว่า สายพันธุ์อ่อนแอจะมีการลดลงของน้ำหนักแห้งมาก หรือไม่สามารเจริญเติบโตได้เท่ากับสายพันธุ์ที่ทนทาน สอดคล้องกับรายงานของ Wissuwa and Ae (2001) ที่อธิบายว่า จำนวนการแตกกอมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการดูดซึมฟอสฟอรัส นอกจากนั้น Aluwihare et al. (2016) ยังอธิบายเพิ่มเติมว่าข้าวหลาย ๆ พันธุ์สามารถแตกกอได้ดี ในสภาพขาดฟอสฟอรัส การเพิ่ม RDW เป็นผลมาจากการที่พืชต้องการเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสในการดูดซึมธาตุอาหารให้มากที่สุด ในสภาพที่ขาดแคลน (Raghothama, 1999) พืชที่เจริญเติบโตในสภาพที่มีการขาดฟอสฟอรัสจะมีผลโดยตรงต่อการลดลงของน้ำหนักแห้ง ซึ่งมีอิทธิพลมาจากการดูดซึมฟอสฟอรัสนั่นเอง (Wissuwa et al., 2005)

จากการทดลองจะเห็นได้ว่า SC มีความสัมพันธ์กับลักษณะอื่น ๆ ทั้งทางบวกและทางลบ ซึ่งสามารถใช้ลักษณะ SC เป็นตัวช่วยในการคัดเลือกเชื้อพันธุกรรมข้าวจำนวนมากในการประเมินความทนทานต่อการขาดฟอสฟอรัสได้

ตารางที่ 4 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนรวมของค่าเฉลี่ยของลักษณะต่าง ๆ ภายใต้สภาพปกติ (AP) และขาดธาตุฟอสฟอรัส (NAP) ในปี 2559 และ 2560

Traits ¹	2559				2560				Combine ²							
	AP	CV(%)	NAP	CV(%)	AP	CV(%)	NAP	CV(%)	AP			CV	NAP			CV
									S	G	SxG	(%)	S	G	SxG	(%)
Tiller	3.13**	23.5	2.28**	25.2	2.75**	31.0	1.83**	17.9	**	**	*	4.9	**	**	ns	9.1
Plant height	84.08**	9.5	43.57**	8.9	64.71**	23.7	44.91**	17.9	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
SDW	1.35**	46.0	0.45**	28.3	1.24**	39.7	0.57**	44.0	**	**	**	10.3	**	**	**	9.1
RDW	0.51**	34.6	0.41**	25.7	0.31**	51.1	0.37**	36.7	**	**	**	9.6	**	**	**	7.3
TDW	1.86**	39.0	0.85**	23.2	1.55**	39.2	0.94**	36.7	**	**	**	9.3	**	**	**	7.4
RSR	0.40 ^{ns}	47.1	0.97**	30.0	0.27*	61.9	0.75*	56.3	**	*	ns	12.5	**	**	ns	9.8
SC	NA	NA	4.04**	28.2	NA	NA	3.28*	32.9	NA	NA	NA	NA	**	**	**	7.3
DWR (%)	NA	NA	47.74**	41.8	NA	NA	34.14*	97.1	NA	NA	NA	NA	**	**	ns	15.9

¹ SDW=น้ำหนักแห้งต้น, RDW=น้ำหนักแห้งราก, TDW=น้ำหนักแห้งรวม, RSR=สัดส่วนน้ำหนักแห้งราก/ต้น, SC=ค่าคะแนนทางใบ, DWR=การลดลงของน้ำหนักแห้ง (%).

² S=ปี, G=พันธุ์, SxG=ปี x พันธุ์, NA=ไม่มีข้อมูล

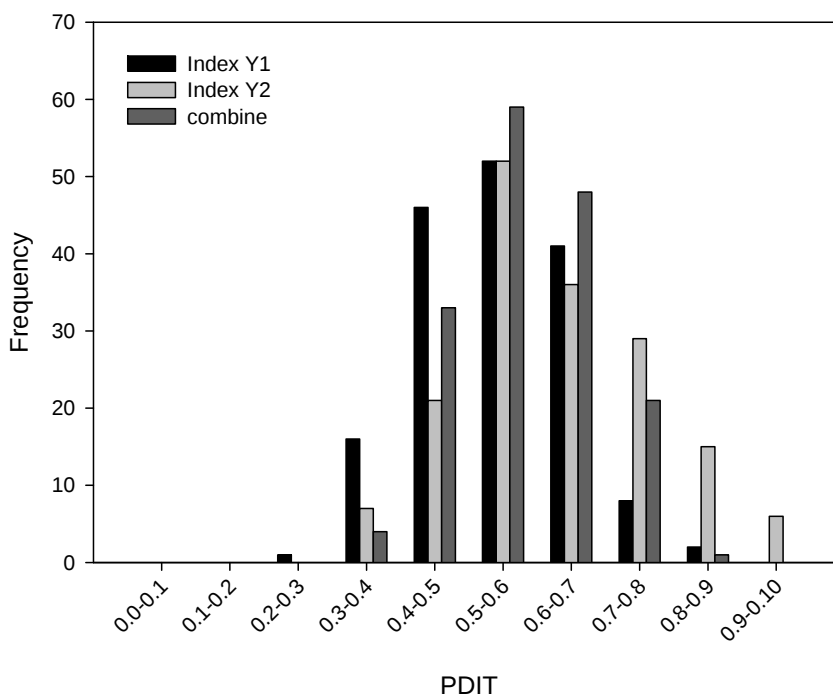
ตารางที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะต่าง ๆ ภายใต้สภาพปกติ (AP) และขาดธาตุฟอสฟอรัส (NAP) จากการทดลองในปี 2559 และ 2560

	Trait ¹	AP					NAP						
		TN	TDW	RDW	SDW	RSR	TN	TDW	RDW	SDW	RSR	SC	DWR
AP	TN	1.000											
	TDW	0.645**	1.000										
	RDW	0.535**	0.819**	1.000									
	SDW	0.634**	0.986**	0.712**	1.000								
	RSR	-0.256**	-0.235**	0.162*	-0.336**	1.000							
NAP	TN	0.513**	0.283**	0.237**	0.277**	-0.081	1.000						
	TDW	0.285**	0.423**	0.361**	0.413**	-0.140	0.606**	1.000					
	RDW	0.150	0.306**	0.376**	0.265**	0.004	0.536**	0.881**	1.000				
	SDW	0.334**	0.443**	0.304**	0.454**	-0.215**	0.579**	0.952**	0.695**	1.000			
	RSR	-0.210**	-0.164*	0.032	-0.210**	0.189*	-0.224**	-0.307**	0.056	-0.499**	1.000		
	SC	0.069	0.147	0.200*	0.121	0.120	-0.293**	-0.291**	-0.356**	-0.216**	-0.098	1.000	
	DWR	0.453**	0.563**	0.495**	0.545**	-0.143	-0.225**	-0.334**	-0.371**	-0.274**	0.072	0.361**	1.000

¹TN=จำนวนหน่อต่อกอ, SDW=น้ำหนักแห้งต้น, RDW=น้ำหนักแห้งราก, TDW=น้ำหนักแห้งรวม, RSR=สัดส่วนน้ำหนักแห้งราก/ต้น, SC=ค่าคะแนนทางใบ, DWR=การลดลงของน้ำหนักแห้ง (%). *, ** =แตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.05$ และ $p < 0.01$ ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ข้างต้น แสดงให้เห็นว่า เชื้อพันธุ์กรรมข้าว มีการตอบสนองต่อการขาดฟอสฟอรัสแตกต่างกัน ดังนั้น จึงได้ใช้ลักษณะจำนวนหน่อตอ (tiller number; TN) ความสูง (plant height; PH) น้ำหนักแห้งต้น (shoot dry weight; SDW) น้ำหนักแห้งราก (root dry weight; RDW) น้ำหนักแห้งรวม (total dry weight; TDW) และ อัตราส่วนของน้ำหนักแห้งรากต่อต้น (root/shoot ratio; R/S) จากการทดลองในสภาพปกติและสภาพขาดฟอสฟอรัสมาคำนวณหาค่าดัชนีความทนทานต่อการขาดฟอสฟอรัส (phosphorus deficiency tolerance index; PDTI) เพื่อคัดเลือกเชื้อพันธุ์กรรมข้าวไร่พื้นเมืองที่มีค่า PDTI ที่แตกต่างกัน

ผลการวิเคราะห์โดยใช้ข้อมูลของปีแรก ปีที่สองและผลการวิเคราะห์รวมของสองปี สามารถคำนวณค่า PDTI อยู่ในช่วง 0.2 – 1.0 (ภาพที่ 1) โดยพบว่า พันธุ์ข้าวมีการตอบสนองที่ต่างกัน ดังที่ได้วิจารณ์ผลไปแล้วข้างต้น ซึ่งจากผลจะเห็นได้ว่าเชื้อพันธุ์กรรมข้าวส่วนใหญ่ อยู่ในกลุ่มที่มีค่า PDTI ระหว่าง 0.5 – 0.7 และมีบางสายพันธุ์ที่มีค่า PDTI ต่ำกว่า 5.0 หรือ สูงกว่า 7.0 (ภาพที่ 1) ซึ่งจากการที่เชื้อพันธุ์กรรมข้าวไร่พื้นเมืองมีค่า PDTI ที่แตกต่างกัน จึงทำการแบ่งกลุ่มออกเป็น 6 ระดับ ประกอบด้วย highly tolerance ($PDTI \geq 8.00$), tolerance ($8.00 < PDTI \geq 7.00$), moderate tolerance ($7.0 < PDTI \geq 6.00$), moderate susceptible ($6.0 < PDTI \geq 5.00$), susceptible ($5.0 < PDTI \geq 4.00$) and highly susceptible ($PDTI < 4.00$) โดยมีเชื้อพันธุ์กรรมข้าวจำนวน 20 สายพันธุ์แสดงระดับของความทนทานเหมือนกันทั้ง 2 ปีที่ทำการทดลองได้แก่ สายพันธุ์ PLD ULR019 ULR031 ULR035 ULR058 ULR124 ULR126 ULR127 ULR145 ULR168 ULR174 ULR180 ULR183 ULR184 ULR197 ULR206 ULR228 ULR260 ULR334 และ ULR338 (ตารางภาคผนวกที่ 1).



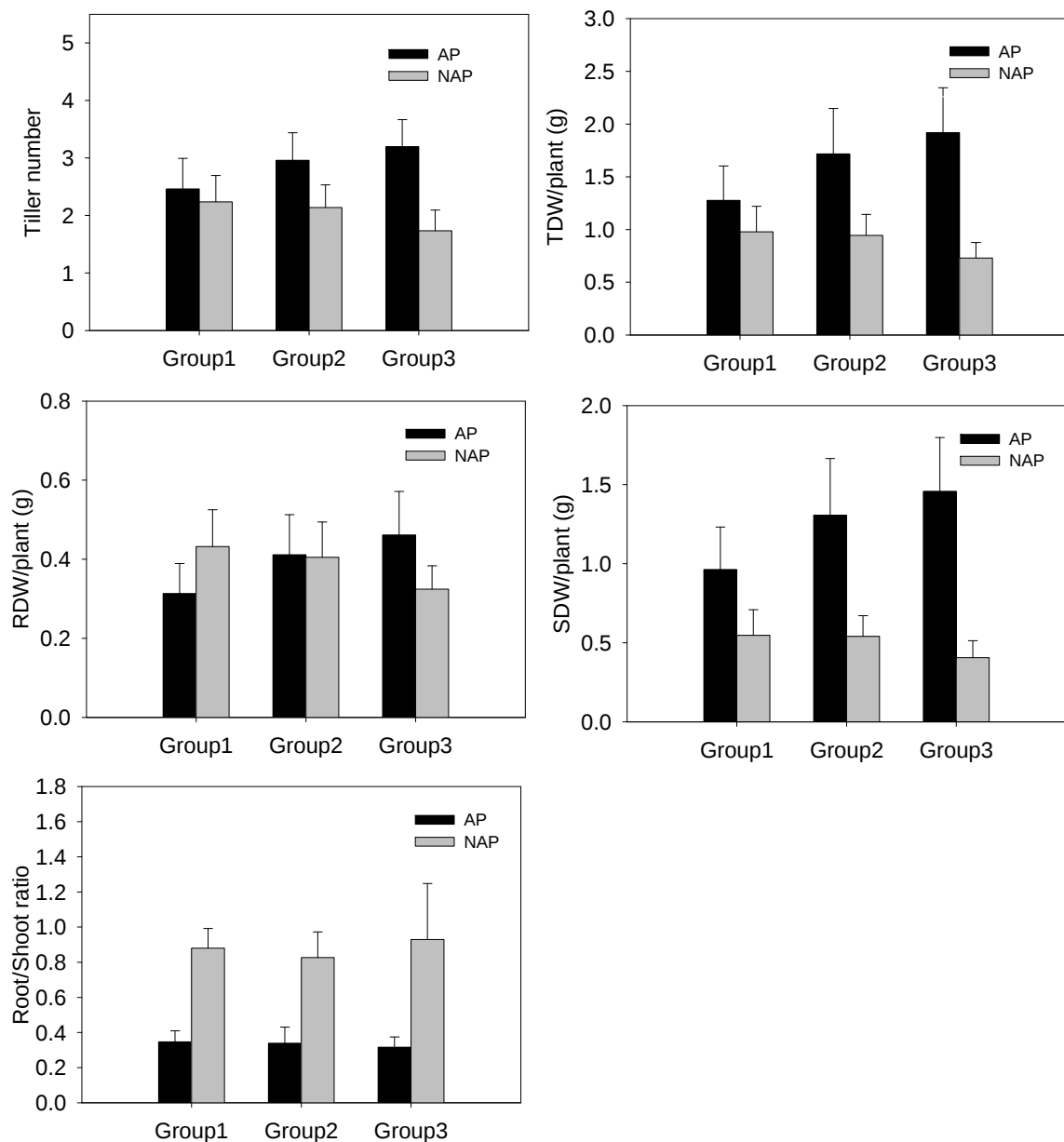
ภาพที่ 1 ความถี่ของเชื้อพันธุ์กรรมข้าวไร่พื้นเมืองที่ระดับดัชนีความทนทานต่อการขาดฟอสฟอรัส (PDTI) จากปี 2559 (Y1), 2560 (Y2) และค่าเฉลี่ยของสองปี (combine)

การเปรียบเทียบการตอบสนองของกลุ่มสายพันธุ์ที่มีระดับ PDTI ที่ต่างกันต่อผลของการขาดฟอสฟอรัส

ในการทดลองครั้งนี้ ได้ทำการแบ่งเชื้อพันธุ์กรรมข้าวพื้นเมืองออกเป็น 3 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 ($PDTI \geq 7.00$) มาจากกลุ่ม highly tolerance และ tolerance กลุ่มที่ 2 ($7.00 < PDTI \leq 5.00$) มาจากกลุ่ม moderate tolerance และ moderate susceptible และกลุ่มที่ 3 ($PDTI < 5.00$) มาจากกลุ่ม susceptible และ highly susceptible หลังจากนั้นจึงได้ใช้ลักษณะจำนวนหน่อตอกอ (tiller number; TN) ความสูง (plant height; PH) น้ำหนักแห้งต้น (shoot dry weight; SDW) น้ำหนักแห้งราก (root dry weight; RDW) น้ำหนักแห้งรวม (total dry weight; TDW) และ อัตราส่วนของน้ำหนักแห้งรากต่อน้ำหนักแห้งต้น (root/shoot ratio; R/S) จากสภาพปกติและขาดฟอสฟอรัส เปรียบเทียบกันในแต่ละกลุ่ม ผลการทดลองพบว่า TN และ TDW มีการลดลงอย่างเห็นได้ชัดในเชื้อพันธุ์กรรมข้าวกลุ่มที่ 3 ซึ่งมากกว่ากลุ่มที่ 2 และ 1 ตามลำดับ สำหรับ SDW มีการลดลงมากกว่า RDW ในทุก ๆ กลุ่ม (ภาพที่ 2)

ภายใต้สภาพขาดฟอสฟอรัสมีการเพิ่มขึ้นของ R/S ในทุก ๆ กลุ่มโดยเฉพาะในกลุ่มที่ 1 ทั้งนี้เนื่องจากกลุ่มที่ 1 เชื้อพันธุ์กรรมข้าวมีการเพิ่มขึ้นของ RDW ในสภาพขาดฟอสฟอรัส ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นความสามารถในความทนทานต่อการขาดฟอสฟอรัสนั่นเอง (Raghothama, 1999)

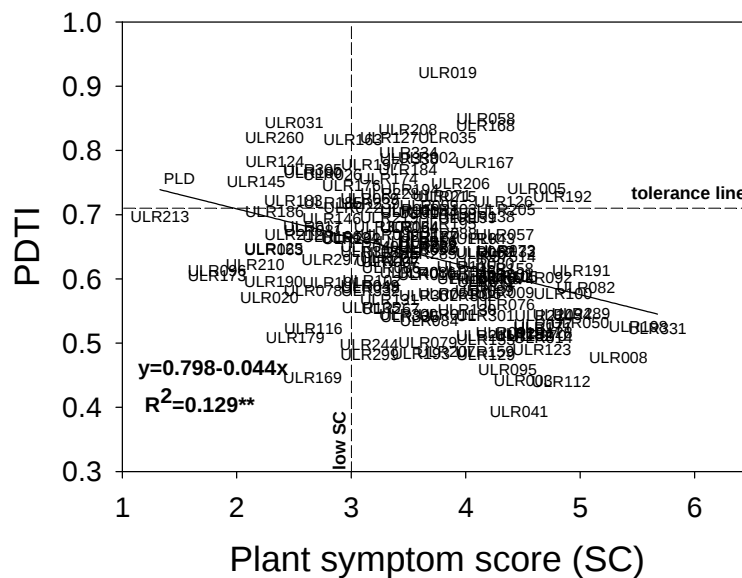
สำหรับการเจริญเติบโตของลำต้นนั้นจะเห็นได้ว่าข้าวทั้ง 3 กลุ่มมีน้ำหนักแห้งชิ้นส่วนเหนือดินในสภาพปกติที่แตกต่างกัน โดยกลุ่มที่ 3 มีมากที่สุดตามด้วยกลุ่มที่ 2 และ 1 ตามลำดับ (ภาพที่ 2) ในขณะที่เมื่ออยู่ภายใต้สภาพขาดฟอสฟอรัส พบว่า น้ำหนักแห้งส่วนเหนือดินมีมากที่สุดในกลุ่ม 1 รองลงมาคือ กลุ่ม 2 และ 3 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า ความต้านทานแปรผกผันกับน้ำหนักแห้งของส่วนเหนือดินในสภาพปกติ สอดคล้องกับการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ตามตารางที่ 5 จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า ความสามารถในการทนทานต่อการขาดฟอสฟอรัสคือการที่ข้าวสามารถรักษาระดับการเจริญเติบโตให้ลดลงน้อยที่สุด และเพิ่มพื้นที่ผิวรากให้มากที่สุดเพื่อเพิ่มโอกาสในการดูดซึมธาตุอาหารนั่นเอง ซึ่งการใช้ PDTI สามารถจำแนกเชื้อพันธุ์กรรมข้าวได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Koide et al., 1999; Zhang et al., 2015)



ภาพที่ 2 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของลักษณะ TN, PH, SDW, RDW, TDW และ R/S จากเชื้อพันธุกรรมข้าวไร่พื้นเมือง 3 กลุ่มที่มีระดับ PDTI แตกต่างกัน ภายใต้สภาพปกติ (AP) และขาดธาตุฟอสฟอรัส (NAP) โดย กลุ่มที่ 1, 2 และ 3 คือ ทนทาน ทนทานปานกลางและ ไม่ทนทานต่อการขาดธาตุฟอสฟอรัสตามลำดับ.

จากการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะและการจัดกลุ่มโดยใช้ PDTI ช่างต้นพบว่า การใช้ SC และ PDTI มีประสิทธิภาพในการแบ่งแยกเชื้อพันธุกรรมข้าวไร่พื้นเมืองที่มีระดับความทนทานต่อการขาดฟอสฟอรัสที่แตกต่างกัน จึงนำ SC และ PDTI มาใช้ร่วมกันในการคัดเลือกเชื้อพันธุกรรมข้าว

ไร่พื้นเมืองที่มีความทนทานต่อการขาดฟอสฟอรัส ผลการทดลองพบว่า ข้าว จำนวน 13 สายพันธุ์ ได้แก่ ULR031 ULR260 ULR124 ULR305 ULR180 ULR026 ULR145 ULR176 ULR183 ULR185 ULR186 ULR213 และ PLD เป็นข้าวที่ทนทานต่อการขาดฟอสฟอรัสที่มี PDTI สูง และ SC ต่ำ (<3) (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างการให้คะแนนอาการขาดฟอสฟอรัส (SC) และดัชนีความทนทานต่อการขาดฟอสฟอรัส (PDTI) ของเชื้อพันธุ์กรรมข้าวไร่พื้นเมืองจำนวน 168 สายพันธุ์

การประเมินความสัมพันธ์ระหว่าง SC และ PDTI กับเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับยีน *Pup-1* ทั้งหมด 9 เครื่องหมาย ได้แก่ *Pup1-K42*, *Pup1-K43*, *Pup1-K46*, *Pup1-K52*, *Pup1-K41*, *PSTol-1*, *K1*, *K5* และ *K29-1* ซึ่งแต่ละสายพันธุ์มีการปรากฏ แถบดีเอ็นเอที่เป็นเป้าหมาย ตั้งแต่ 0-9 ตำแหน่ง (ตารางที่ 6) อย่างไรก็ตาม ความสัมพันธ์ระหว่างการปรากฏแถบดีเอ็นเอและระดับความทนทานมีความสัมพันธ์กันค่อนข้างต่ำ โดยมีเชื้อพันธุ์กรรมข้าวบางสายพันธุ์ที่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเป้าหมายใด ๆ เลย แต่มีความทนทานระดับสูงเช่น ULR183 และ ULR213 อย่างไรก็ตาม เครื่องหมายที่มีประสิทธิภาพในการแยกความแตกต่างได้ดีที่สุด คือ เครื่องหมาย ชนิด *K1* และ *K29-1* การทดลองครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า ความทนทานต่อการขาดธาตุฟอสฟอรัสในเชื้อพันธุ์กรรมข้าวพื้นเมือง อาจมียีนอื่น ๆ เข้ามาเกี่ยวข้อง และข้าวสายพันธุ์ ULR183 และ ULR213 อาจเป็นสายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับการนำไปศึกษาต่อไปในอนาคต

ตารางที่ 6 การเกิดแถบตีเอ็นเอของเครื่องหมายโมเลกุลเชื่อมโยงกับยีน *Pup-1* ร่วมกับค่าเฉลี่ยของ การให้คะแนนอาการขาดฟอสฟอรัส (SC) และดัชนีความทนทานต่อการขาดฟอสฟอรัส (PDTI) ในเชื้อพันธุ์กรรมข้าวไร่พื้นเมือง

Varieties	Primer data ^a									Sum of Alleles ^b	SC ^c	PDTI ^d
	<i>Pup1-K42</i>	<i>Pup1-K43</i>	<i>Pup1-K46</i>	<i>Pup1-K52</i>	<i>Pup1-K41</i>	<i>PSTol-1</i>	<i>K1</i>	<i>K5</i>	<i>K29-1</i>			
HMLN	0	0	1	0	0	0	1	0	0	2	4.22	0.59
IR57514	1	1	0	0	1	1	1	1	1	7	4.35	0.63
PLD	1	0	0	1	1	1	0	1	1	6	1.50	0.76
PLK	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	4.16	0.66
PNG	0	0	0	0	1	1	1	0	1	4	4.18	0.60
RD6	1	0	0	0	0	0	1	0	1	3	4.17	0.58
SKN	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	4.33	0.43
ULR001	1	0	1	0	0	0	0	0	0	2	4.34	0.61
ULR002	1	1	0	1	1	0	0	1	0	5	3.67	0.79
ULR003	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	4.50	0.44
ULR005	0	0	0	1	0	0	1	1	0	3	4.62	0.74
ULR006	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.35	0.62
ULR007	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.34	0.63
ULR008	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	5.33	0.48
ULR009	1	0	1	0	1	1	1	0	0	5	4.34	0.58

ตารางที่ 6 การเกิดแถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายโมเลกุลเชื่อมโยงกับยีน *Pup-1* ร่วมกับค่าเฉลี่ยของ การให้คะแนนอาการขาดฟอสฟอรัส (SC) และดัชนีความทนทานต่อการขาดฟอสฟอรัส (PDTI) ในเชื้อพันธุ์กรรมข้าวไร่พื้นเมือง

Varieties	Primer data ^a									Sum of Alleles ^b	SC ^c	PDTI ^d
	<i>Pup1-K42</i>	<i>Pup1-K43</i>	<i>Pup1-K46</i>	<i>Pup1-K52</i>	<i>Pup1-K41</i>	<i>PSTol-1</i>	<i>K1</i>	<i>K5</i>	<i>K29-1</i>			
ULR010	0	0	1	0	1	0	0	0	0	2	3.66	0.61
ULR011	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	3.84	0.54
ULR014	1	0	0	0	0	0	1	1	0	3	4.68	0.51
ULR016	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	4.01	0.61
ULR017	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.66	0.68
ULR018	1	0	0	0	1	1	1	0	0	4	3.51	0.71
ULR019	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.84	0.92
ULR020	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	2.29	0.57
ULR022	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	3.01	0.71
ULR025	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	3.35	0.64
ULR026	0	0	0	1	0	0	0	0	1	2	2.84	0.76
ULR027	0	0	1	0	1	0	1	0	0	3	4.17	0.60
ULR031	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2.50	0.84
ULR035	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	3.84	0.82
ULR038	0	0	1	0	0	0	1	1	0	3	3.17	0.59
ULR039	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	4.16	0.58

ตารางที่ 6 การเกิดแถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายโมเลกุลเชื่อมโยงกับยีน *Pup-1* ร่วมกับค่าเฉลี่ยของ การให้คะแนนอาการขาดฟอสฟอรัส (SC) และดัชนีความทนทานต่อการขาดฟอสฟอรัส (PDTI) ในเชื้อพันธุ์กรรมข้าวไร่พื้นเมือง

Varieties	Primer data ^a									Sum of Alleles ^b	SC ^c	PDTI ^d
	<i>Pup1-K42</i>	<i>Pup1-K43</i>	<i>Pup1-K46</i>	<i>Pup1-K52</i>	<i>Pup1-K41</i>	<i>PSTol-1</i>	<i>K1</i>	<i>K5</i>	<i>K29-1</i>			
ULR040	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.16	0.65
ULR041	1	0	1	0	0	1	0	1	0	4	4.47	0.39
ULR043	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4.17	0.66
ULR044	1	0	0	1	1	1	0	1	0	5	3.67	0.70
ULR049	0	0	1	0	0	1	0	0	0	2	3.16	0.59
ULR050	0	1	1	1	1	0	0	0	0	4	5.00	0.53
ULR051	1	0	1	0	1	1	0	0	1	5	3.84	0.58
ULR053	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	3.66	0.65
ULR054	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	3.51	0.68
ULR056	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.67	0.66
ULR057	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	4.34	0.67
ULR058	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	4.18	0.85
ULR062	1	1	1	1	1	1	0	0	0	6	4.16	0.64
ULR063	0	0	0	0	1	1	1	0	1	4	2.33	0.65
ULR066	1	0	0	0	0	1	1	1	0	4	3.68	0.65
ULR067	1	1	1	1	1	1	0	1	0	7	4.18	0.64

ตารางที่ 6 การเกิดแถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายโมเลกุลเชื่อมโยงกับยีน *Pup-1* ร่วมกับค่าเฉลี่ยของ การให้คะแนนอาการขาดฟอสฟอรัส (SC) และดัชนีความทนทานต่อการขาดฟอสฟอรัส (PDTI) ในเชื้อพันธุ์กรรมข้าวไร่พื้นเมือง

Varieties	Primer data ^a									Sum of Alleles ^b	SC ^c	PDTI ^d
	<i>Pup1-K42</i>	<i>Pup1-K43</i>	<i>Pup1-K46</i>	<i>Pup1-K52</i>	<i>Pup1-K41</i>	<i>PSTol-1</i>	<i>K1</i>	<i>K5</i>	<i>K29-1</i>			
ULR069	0	0	1	0	0	0	1	1	1	4	3.16	0.72
ULR070	1	1	0	0	1	1	0	1	0	5	4.62	0.51
ULR071	1	0	0	0	1	1	1	0	0	4	3.79	0.73
ULR072	1	0	1	1	0	1	0	0	0	4	4.18	0.60
ULR073	1	1	1	0	1	1	0	0	0	5	4.35	0.64
ULR074	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	4.34	0.60
ULR075	1	1	0	1	1	1	1	0	1	7	3.50	0.66
ULR076	1	0	0	0	1	1	0	0	0	3	4.35	0.56
ULR077	0	0	1	0	0	1	0	0	0	2	4.68	0.53
ULR078	0	0	1	0	0	0	0	0	1	2	2.67	0.58
ULR079	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	3.67	0.50
ULR080	0	0	1	0	0	0	1	1	0	3	4.17	0.62
ULR081	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.67	0.68
ULR082	1	1	0	0	1	1	0	0	0	4	5.05	0.59
ULR084	1	0	1	1	1	1	0	0	0	5	3.68	0.53
ULR086	0	0	1	0	0	0	1	1	0	3	3.66	0.61

ตารางที่ 6 การเกิดแถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายโมเลกุลเชื่อมโยงกับยีน *Pup-1* ร่วมกับค่าเฉลี่ยของ การให้คะแนนอาการขาดฟอสฟอรัส (SC) และดัชนีความทนทานต่อการขาดฟอสฟอรัส (PDTI) ในเชื้อพันธุ์กรรมข้าวไร่พื้นเมือง

Varieties	Primer data ^a									Sum of Alleles ^b	SC ^c	PDTI ^d
	<i>Pup1-K42</i>	<i>Pup1-K43</i>	<i>Pup1-K46</i>	<i>Pup1-K52</i>	<i>Pup1-K41</i>	<i>PSTol-1</i>	<i>K1</i>	<i>K5</i>	<i>K29-1</i>			
ULR088	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	3.84	0.67
ULR089	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	3.34	0.67
ULR091	1	1	0	1	0	1	0	0	1	5	4.34	0.52
ULR092	1	1	0	0	1	1	1	0	0	5	4.67	0.60
ULR094	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	4.84	0.54
ULR095	1	0	1	1	0	1	0	0	0	4	4.37	0.46
ULR096	1	1	0	1	1	1	0	1	1	7	1.83	0.61
ULR099	1	0	0	0	1	1	0	1	0	4	3.68	0.71
ULR100	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	4.85	0.58
ULR102	1	0	0	0	1	1	1	1	1	6	3.18	0.60
ULR103	0	0	1	0	0	0	0	1	1	3	3.84	0.71
ULR105	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	4.38	0.60
ULR112	1	0	1	1	1	1	0	0	0	5	4.84	0.44
ULR114	0	0	1	0	0	0	1	0	0	2	3.30	0.63
ULR115	0	0	0	1	0	0	0	1	0	2	4.00	0.62
ULR116	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2.67	0.52

ตารางที่ 6 การเกิดแถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายโมเลกุลเชื่อมโยงกับยีน *Pup-1* ร่วมกับค่าเฉลี่ยของ การให้คะแนนอาการขาดฟอสฟอรัส (SC) และดัชนีความทนทานต่อการขาดฟอสฟอรัส (PDTI) ในเชื้อพันธุ์กรรมข้าวไร่พื้นเมือง

Varieties	Primer data ^a									Sum of Alleles ^b	SC ^c	PDTI ^d
	<i>Pup1-K42</i>	<i>Pup1-K43</i>	<i>Pup1-K46</i>	<i>Pup1-K52</i>	<i>Pup1-K41</i>	<i>PSTol-1</i>	<i>K1</i>	<i>K5</i>	<i>K29-1</i>			
ULR123	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4.67	0.49
ULR124	1	0	0	0	1	1	1	0	1	5	2.33	0.78
ULR125	1	1	0	1	1	1	0	1	1	7	2.33	0.65
ULR126	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	4.33	0.72
ULR127	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3.33	0.82
ULR128	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	4.68	0.52
ULR129	1	1	0	1	0	1	1	1	1	7	4.18	0.48
ULR130	1	0	1	0	1	0	0	0	1	4	4.01	0.55
ULR131	1	1	0	0	1	1	1	0	0	5	3.33	0.57
ULR132	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2	4.36	0.64
ULR134	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2.99	0.66
ULR135	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	3.18	0.56
ULR138	1	1	0	0	0	1	0	0	0	3	4.17	0.70
ULR145	1	0	0	1	1	1	1	0	1	6	2.17	0.75
ULR146	0	0	0	0	1	1	0	1	0	3	2.83	0.69
ULR152	1	0	0	0	1	1	0	0	1	4	4.51	0.51

ตารางที่ 6 การเกิดแถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายโมเลกุลเชื่อมโยงกับยีน *Pup-1* ร่วมกับค่าเฉลี่ยของ การให้คะแนนอาการขาดฟอสฟอรัส (SC) และดัชนีความทนทานต่อการขาดฟอสฟอรัส (PDTI) ในเชื้อพันธุ์กรรมข้าวไร่พื้นเมือง

Varieties	Primer data ^a									Sum of Alleles ^b	SC ^c	PDTI ^d
	<i>Pup1-K42</i>	<i>Pup1-K43</i>	<i>Pup1-K46</i>	<i>Pup1-K52</i>	<i>Pup1-K41</i>	<i>PSTol-1</i>	<i>K1</i>	<i>K5</i>	<i>K29-1</i>			
ULR153	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2	4.18	0.51
ULR158	1	1	0	0	1	1	1	1	0	6	4.34	0.62
ULR159	0	0	0	0	1	1	0	0	1	3	4.17	0.49
ULR161	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	3.51	0.71
ULR163	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	3.01	0.82
ULR164	1	1	0	0	1	1	0	0	0	4	3.51	0.68
ULR166	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	4.01	0.60
ULR167	1	0	0	0	1	1	0	0	1	4	4.16	0.78
ULR168	1	0	1	0	1	1	1	1	1	7	4.17	0.84
ULR169	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.66	0.45
ULR171	1	1	0	1	1	1	1	1	1	8	4.67	0.52
ULR173	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1.83	0.61
ULR174	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.33	0.76
ULR176	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2	3.00	0.74
ULR177	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.67	0.67
ULR179	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2	2.51	0.51

ตารางที่ 6 การเกิดแถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายโมเลกุลเชื่อมโยงกับยีน *Pup-1* ร่วมกับค่าเฉลี่ยของ การให้คะแนนอาการขาดฟอสฟอรัส (SC) และดัชนีความทนทานต่อการขาดฟอสฟอรัส (PDTI) ในเชื้อพันธุ์กรรมข้าวไร่พื้นเมือง

Varieties	Primer data ^a									Sum of Alleles ^b	SC ^c	PDTI ^d
	<i>Pup1-K42</i>	<i>Pup1-K43</i>	<i>Pup1-K46</i>	<i>Pup1-K52</i>	<i>Pup1-K41</i>	<i>PSTol-1</i>	<i>K1</i>	<i>K5</i>	<i>K29-1</i>			
ULR180	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2.67	0.76
ULR181	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.83	0.59
ULR183	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.49	0.72
ULR184	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.49	0.77
ULR185	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	2.84	0.72
ULR186	0	0	0	0	0	1	1	1	0	3	2.33	0.70
ULR187	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2	3.68	0.67
ULR190	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2.32	0.60
ULR191	1	0	1	1	1	0	0	0	0	4	5.01	0.61
ULR192	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4.85	0.73
ULR193	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	3.61	0.48
ULR194	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	3.51	0.74
ULR195	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	3.84	0.69
ULR196	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.83	0.67
ULR197	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.17	0.78
ULR198	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	5.51	0.53

ตารางที่ 6 การเกิดแถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายโมเลกุลเชื่อมโยงกับยีน *Pup-1* ร่วมกับค่าเฉลี่ยของ การให้คะแนนอาการขาดฟอสฟอรัส (SC) และดัชนีความทนทานต่อการขาดฟอสฟอรัส (PDTI) ในเชื้อพันธุ์กรรมข้าวไร่พื้นเมือง

Varieties	Primer data ^a									Sum of Alleles ^b	SC ^c	PDTI ^d
	<i>Pup1-K42</i>	<i>Pup1-K43</i>	<i>Pup1-K46</i>	<i>Pup1-K52</i>	<i>Pup1-K41</i>	<i>PSTol-1</i>	<i>K1</i>	<i>K5</i>	<i>K29-1</i>			
ULR199	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	4.01	0.70
ULR205	0	0	0	1	0	0	0	1	0	2	4.35	0.71
ULR206	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.96	0.75
ULR207	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2	3.83	0.49
ULR208	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.49	0.83
ULR209	1	1	0	0	1	1	0	1	1	6	3.33	0.63
ULR210	1	1	0	0	1	1	0	0	1	5	2.16	0.62
ULR211	1	0	0	0	1	1	1	0	1	5	4.17	0.51
ULR212	1	0	0	1	1	1	0	0	0	4	2.50	0.67
ULR213	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.33	0.70
ULR214	1	0	0	0	1	1	0	0	0	3	4.68	0.54
ULR215	1	1	1	1	1	1	0	0	0	6	3.84	0.73
ULR219	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	3.33	0.70
ULR222	0	0	0	1	0	0	1	0	1	3	3.67	0.65
ULR228	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.34	0.73
ULR239	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	3.17	0.72

ตารางที่ 6 การเกิดแถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายโมเลกุลเชื่อมโยงกับยีน *Pup-1* ร่วมกับค่าเฉลี่ยของ การให้คะแนนอาการขาดฟอสฟอรัส (SC) และดัชนีความทนทานต่อการขาดฟอสฟอรัส (PDTI) ในเชื้อพันธุ์กรรมข้าวไร่พื้นเมือง

Varieties	Primer data ^a									Sum of Alleles ^b	SC ^c	PDTI ^d
	<i>Pup1-K42</i>	<i>Pup1-K43</i>	<i>Pup1-K46</i>	<i>Pup1-K52</i>	<i>Pup1-K41</i>	<i>PSTol-1</i>	<i>K1</i>	<i>K5</i>	<i>K29-1</i>			
ULR244	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.16	0.50
ULR258	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	3.84	0.70
ULR259	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.67	0.66
ULR260	1	0	0	0	1	1	0	1	1	5	2.33	0.82
ULR267	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.34	0.55
ULR285	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.67	0.64
ULR289	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	5.01	0.55
ULR292	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.00	0.66
ULR294	0	1	1	0	1	1	0	0	0	4	4.51	0.51
ULR297	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.82	0.63
ULR299	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.16	0.48
ULR300	1	0	0	0	1	0	1	0	1	4	3.50	0.54
ULR301	1	0	0	0	1	1	1	0	0	4	4.17	0.54
ULR302	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	4.01	0.57
ULR305	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2.66	0.77
ULR306	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	3.16	0.64

ตารางที่ 6 การเกิดแถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายโมเลกุลเชื่อมโยงกับยีน *Pup-1* ร่วมกับค่าเฉลี่ยของ การให้คะแนนอาการขาดฟอสฟอรัส (SC) และดัชนีความทนทานต่อการขาดฟอสฟอรัส (PDTI) ในเชื้อพันธุ์กรรมข้าวไร่พื้นเมือง

Varieties	Primer data ^a									Sum of Alleles ^b	SC ^c	PDTI ^d
	<i>Pup1-K42</i>	<i>Pup1-K43</i>	<i>Pup1-K46</i>	<i>Pup1-K52</i>	<i>Pup1-K41</i>	<i>PSTol-1</i>	<i>K1</i>	<i>K5</i>	<i>K29-1</i>			
ULR307	0	0	1	0	0	0	1	1	0	3	3.67	0.57
ULR308	1	1	1	1	0	1	1	0	0	6	3.28	0.68
ULR331	1	0	1	0	1	1	0	1	0	5	5.67	0.52
ULR332	0	0	1	0	0	0	1	0	1	3	3.17	0.58
ULR334	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	3.50	0.80
ULR335	0	0	0	0	1	1	0	0	1	3	3.51	0.54
ULR338	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2	3.51	0.79
ULR340	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.51	0.61

^a the expected PCR product; present (1) absent (0), ^b Summation of alleles test, ^c Plant symptom score, ^d Phosphorus deficiency tolerance index.

(4) สรุปผลการทดลอง

ข้าวไร่พันธุ์พื้นเมืองการตอบสนองต่อการขาดธาตุฟอสฟอรัสที่แตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์ และฤดูที่ทดสอบรวมทั้งมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทั้งสองในลักษณะที่เกี่ยวข้องกับความทนทาน โดยลักษณะที่ทำการประเมินได้ง่ายเช่น คะแนนอาการขาดฟอสฟอรัสที่มีความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะต่าง ๆ ทั้งในทางบวกและทางลบ สามารถนำมาใช้คัดเลือกเชื้อพันธุ์กรรมข้าวจำนวนมากให้ทนทานต่อการขาดฟอสฟอรัสเบื้องต้นได้ นอกจากนั้นการใช้คะแนนอาการขาดฟอสฟอรัส ร่วมกับ ดัชนีความทนทานต่อการขาดฟอสฟอรัสสามารถจำแนกระดับความทนทานต่อการขาดธาตุฟอสฟอรัสของข้าวพื้นเมืองได้ โดยข้าวพื้นเมืองจำนวน 13 สายพันธุ์ได้แก่ ULR031, ULR260, ULR124, ULR305, ULR180, ULR026, ULR145, ULR176, ULR183, ULR185, ULR186, ULR213 และ PLD มีความทนทานในระดับสูงได้ ในส่วนของผลการประเมินความสัมพันธ์ระหว่างระดับความทนทานกับเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับยีน *Pup-1* พบว่า มีความสัมพันธ์กันค่อนข้างต่ำ และมีบางสายพันธุ์ที่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเป้าหมายใด ๆ เลย แต่มีความทนทานระดับสูง ซึ่งอาจเป็นสายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับการนำไปศึกษาต่อไปในอนาคต

(5) Output ที่ได้จากโครงการ

จากการประเมินความทนทานต่อการขาดฟอสฟอรัส พบว่า มีเชื้อพันธุ์กรรมข้าวทั้งหมด 12 สายพันธุ์ที่มีค่า PDTI สูงกว่า 7.00 และมีค่า SC น้อยกว่า 3.00 ดังนี้ ULR031, ULR260, ULR124, ULR305, ULR180, ULR026, ULR145, ULR176, ULR183, ULR185, ULR186, ULR213 นอกจากนั้นยังมีข้าวนาสวน 1 สายพันธุ์คือพันธุ์ PLD แสดงความทนทานในระดับสูงด้วย เชื้อพันธุ์กรรมดังกล่าวเหมาะสมสำหรับการนำไปปรับปรุงพันธุ์หรือใช้ประโยชน์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Aluwihare, Y.C., M. Ishan, M.D.M. Chamikara, C.K. Weebadde, D.N. Sirisena, W.L.G. Samarasinghe and S.D.S.S. Sooriyapathirana. 2016. Characterization and selection of phosphorus deficiency tolerant rice genotypes in Sri Lanka. *Rice Science* 23(4): 184-195.
- Berglund, L.M., T.H. DeLuca and O. Zackrisson. 2004. Activated carbon amendment to soil alter nitrification rates in Scots pine forest. *Soil Biology and Biochemistry* 36: 2067-2073.
- Chin, J.H., J.H. Chin, X. Lu, S.M. Haefele, R. Gamuyao, A. Ismail, M. Wissuwa and S. Heuer. 2010. Development and application of gene-based markers for the major rice QTL Phosphorus uptake 1. *Theor Appl Genet* 120: 1073–1086.
- Chin, J.H., J.H. Chin, R. Gamuyao, C. Dalid, M. Bustamam, J. Prasetyono, S. Moeljopawiro, M. Wissuwa and S. Heuer. 2011. Developing rice with high yield under phosphorus deficiency: Pup1 sequence to application. *Plant Physiol* 156: 1202–1216.
- Dobermann, A. and T. Fairhurst. 2000. Rice: nutrient disorders and nutrient management. Manila, Philippines: Oxford Graphic Printers. 60–70 pp.
- IRRI. 2002. Standard evaluation system for rice (SES). International Rice Research Institute. Los Banos, Philippines.
- Koide, R.T., I.A. Dickie and M.D. Goff. 1999. Phosphorus deficiency, plant growth and the phosphorus efficiency index. *Functional Ecology* 13: 733-736.
- Marschner, H. 2012. Marschner's mineral nutrition of higher plants. New York, USA: Academic Press. 158–165 pp.
- Mukherjee, A., S. Sarkar, A.S. Chakraborty, R. Yelne, V. Kavishetty, T. Biswas and S. Bhattacharyya. 2014. Phosphate acquisition efficiency and phosphate starvation tolerance locus (*PSTOL1*) in rice. *Journal of Genetic* 93: 683–688.
- Raghothama, K.G. 1999. Phosphate acquisition. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 665–693.
- Wissuwa, M. and N. Ae. 2001. Genotypic variation for tolerance to phosphorus deficiency in rice and the potential for its exploitation in rice improvement. *Plant Breeding* 120: 43-48.
- Wissuwa, M., G. Gamat and A.M. Ismail. 2005. Is root growth under phosphorus deficiency affected by source or sink limitations?. *Journal of Experimental Botany* 56: 1943–1950.

- Venables, W.N., D.M. Smith and the R Development Core Team. 2009. An introduction to R. Online available at <http://cran.r-project.org/doc/manuals/R-into.pdf>, July 16, 2017.
- Yoshida, S., D.A. Forno, J.H. Cock and K.A. Gomez. 1976. Laboratory manual for physiological studies of rice, 3rd eds. IRRI, Manila.
- Zhang, H., R. Xu, C. Xie, C. Huang, H. Liao, Y. Xu, J. Wang and W. Li. 2015. Large-scale evaluation of maize germplasm for low-phosphorus tolerance. PLoS ONE 10(5): e0124212.

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1. การจำแนกเชื้อพันธุกรรมข้าวไร่พื้นเมืองตามระดับของ ดัชนีความทนทานต่อกาชาดฟอสฟอรัส (PDTI)

2559	
Reactions	Varieties ^a
Highly tolerance (PDTI >0.80)	ULR186, ULR031, ULR035, ULR058, ULR260
Tolerance (PDTI = 0.71-0.80)	<u>ULR126</u> , <u>ULR338</u> , ULR067, <u>ULR206</u> , <u>ULR145</u> , <u>ULR228</u> , ULR306, <u>ULR197</u> , <u>ULR019</u> , <u>PLD</u> , ULR088, <u>ULR168</u> , <u>ULR183</u> , <u>ULR334</u> , ULR205, ULR053, <u>ULR174</u> , ULR212, ULR040, ULR285, <u>ULR180</u> , <u>ULR127</u> , <u>ULR184</u> , <u>ULR124</u>
Moderate Tolerance (PDTI = 0.61-0.70)	ULR103, ULR135, ULR177, ULR056, ULR051, ULR259, ULR026, ULR134, ULR007, ULR074, ULR209, ULR078, ULR010, IR57514, ULR116, ULR187, ULR158, ULR016, ULR114, ULR305, ULR332, ULR239, ULR292, ULR081, ULR020, ULR146, ULR185, ULR044, ULR173, ULR075, ULR005, ULR179, ULR192, ULR069, ULR161, ULR340, ULR297, ULR054, ULR125, ULR208, ULR176, ULR219, PLK, ULR196, ULR213, ULR050, ULR038, ULR210, ULR258, ULR062
Moderate susceptible (PDTI = 0.51-0.60)	ULR335, ULR244, ULR194, ULR009, ULR130, ULR018, ULR084, ULR102, ULR299, ULR099, ULR131, ULR302, SKN, ULR166, ULR011, ULR089, ULR167, ULR022, ULR164, ULR057, ULR169, ULR307, ULR092, ULR289, ULR094, ULR267, ULR123, ULR198, ULR002, RD6, ULR082, ULR039, ULR017, ULR115, ULR191, ULR195, ULR049, ULR072, Pung Nga, ULR215, ULR308, ULR066, ULR222, ULR199, ULR105, ULR163, ULR063, ULR211, ULR086, ULR027, ULR071, ULR080, ULR006, ULR190
Susceptible (PDTI = 0.40-0.50)	ULR300, ULR214, RD51, ULR025, ULR073, HMLN, ULR003, ULR193, ULR095, ULR159, ULR132, ULR112, ULR294, ULR076, ULR070, ULR171, ULR138, ULR008, ULR129, ULR043, ULR014, ULR091, ULR152, ULR181, ULR100, ULR301, ULR331, ULR096, ULR001, ULR207,
Highly susceptible (PDTI < 0.4)	ULR041, ULR128, ULR153, ULR079, ULR077

^a สายพันธุ์ที่มีอักษรหนาและขีดเส้นใต้คือสายพันธุ์ที่ให้ระดับความทนทานเหมือนกันทั้งปีทดลอง 2559 และ 2560

ตารางภาคผนวกที่ 1. การจำแนกเชื้อพันธุกรรมข้าวไร่พื้นเมืองตามระดับของ ดัชนีความทนทานต่อกาชาดฟอสฟอรัส (PDTI) (ต่อ)

2560	
Reactions	Varieties ^a

Highly tolerance (PDTI >0.80)	<u>ULR019</u> , ULR163, ULR167, ULR002, ULR208, ULR194, <u>ULR168</u> , RD51, ULR138, ULR099, ULR026, ULR018, ULR305, ULR022, ULR215, <u>ULR338</u> , <u>ULR127</u> , ULR025, ULR071, <u>ULR334</u> , ULR073, ULR043, ULR132, <u>ULR031</u> , ULR164, <u>ULR058</u> , <u>ULR197</u> , ULR005, ULR089, ULR195, ULR057, ULR103, ULR199, ULR017, ULR192, ULR176
Tolerance (PDTI = 0.71-0.80)	ULR239, ULR308, ULR069, <u>ULR035</u> , <u>ULR145</u> , ULR185, <u>PLD</u> , <u>ULR206</u> , <u>ULR174</u> , <u>ULR124</u> , ULR044, <u>ULR184</u> , <u>ULR180</u> , <u>ULR228</u> , ULR161, <u>ULR260</u> , HMLN, ULR146, <u>ULR126</u> , ULR096, ULR177, ULR066, ULR222, ULR001, <u>ULR183</u> , ULR081, ULR134, ULR181, ULR056, ULR258, ULR213, ULR063, ULR219, ULR187, ULR259
Moderate Tolerance (PDTI = 0.61-0.70)	ULR054, ULR292, ULR115, ULR166, ULR102, ULR300, ULR205, ULR214, ULR100, ULR092, ULR191, ULR077, ULR076, ULR075, ULR009, ULR128, ULR080, ULR209, ULR196, IR57514, PLK, Pang Nga, ULR007, ULR302, ULR006, ULR086, ULR072, ULR105, ULR114, ULR153, ULR131, ULR082, ULR307, ULR027, ULR049, ULR079, ULR039, ULR088, ULR125, RD6, ULR130, ULR301, ULR158
Moderate susceptible (PDTI = 0.51-0.60)	ULR212, ULR171, ULR297, ULR190, ULR016, ULR010, ULR062, ULR335, ULR074, ULR294, ULR186, ULR011, ULR067, ULR070, ULR267, ULR306, ULR084, ULR173, ULR331, ULR340, ULR091, ULR289, ULR053, ULR094, ULR040, ULR210, ULR014, ULR152, ULR051, ULR078, ULR193, ULR159, ULR332, ULR285, ULR198, ULR135
Susceptible (PDTI = 0.40-0.50)	ULR020, ULR129, ULR244, ULR008, ULR095, ULR038, ULR207, ULR041, ULR299, ULR003, ULR123, SKN, ULR211, ULR112, ULR116
Highly susceptible (PDTI < 0.4)	ULR050, ULR169, ULR179

^a สายพันธุ์ที่มีอักษรหนาและขีดเส้นใต้คือสายพันธุ์ที่ให้ระดับความทนทานเหมือนกันทั้งปีทดลอง 2559 และ 2560

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

Manuscript เรื่อง “Screening of phosphorus deficiency tolerant and validation of *Pub-1* gene linked markers in Thai indigenous upland rice germplasm” อยู่ระหว่างการตรวจอ่านภาษา “under proofreading” ของผู้เชี่ยวชาญภาษาอังกฤษ ก่อนที่จะนำส่งไปยังวารสาร **Crop Breeding and Applied Biotechnology** (ISI Thomson Reuters (Web of Science) Q2, Impact Factor = 0. 701)

Screening of phosphorus deficiency tolerant and validation of *Pup-1* gene linked markers in Thai indigenous upland rice germplasm

Sompong Chankaew¹, Tidarat Monkham¹, Wanwipa Pinta¹, Jirawat Sanitchon¹,
Wanwipa Kaewpradit-Polpinit¹ and Peerasak Srinives^{2*}

¹Department of Plant Science and Agricultural Resources, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

²Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

*Corresponding author E-mail: agrpss@yahoo.com

Abstract

Phosphorus deficiency is major factor limiting rice yield throughout the world. Using the P-deficiency tolerance efficiency in rice is essential for rice improvement. The objective of this study is to screening to phosphorus deficiency tolerant and validation *Pup-1* gene linked markers in Thai indigenous upland rice germplasm. One hundred and sixty eight upland rice varieties were used for screening with solution culture method. Based on phosphorus deficiency tolerance index and plant symptom score, 8 of all including ULR145, ULR124, ULR031, ULR026, ULR260, ULR183, ULR180 and ULR305 were classified as tolerant. The validation of *Pup-1* linked gene with 9 markers were demonstrated that each lines appeared the expected PCR product ranged from 0 to 9 markers while low relation with tolerance ability. Moreover, some indigenous upland rice lines such as ULR183 and ULR213 has the high tolerance without *Pup-1* linked gene product. Those suit for future study for phosphorus deficiency genes.

Keywords: Phosphorus deficiency tolerance index, harvesting index, root dry weight, Yoshida solution, plant symptom score

Introduction

Phosphorus (P) is an essential for normal cell growth and cell division in all organism, it's often a major limiting factor for upland area because its availability in soil tends to be low due to its fixation into insoluble compounds (Shimizu et al. 2008). P-deficiency often associated with acid soils condition (Kirk et al. 1998) aluminum-toxic soils (Pinheiro et al. 2006) manganese and ferric-toxic (Yugi et al. 2014) drought (Ozturk et al. 2005; Yugi et al. 2014) and high pH condition (Shimizu et al. 2004). Therefore, rice grows under those conditions often to be phosphorus deficiency problem especially upland rice.

Phosphorus deficiency tolerance or phosphorus use efficiency in rice is essential for rice improvement. Rice would develop numerous morphological, physiological, biochemical and molecular adaptation to overcome P-deficiency (Raghothama and Karthikeyan 2005). Koyama et al. (1973) reported the first time of genotypic differences for P-deficiency tolerance in rice. Since then, the development of cultivars with an improved ability to phosphorus utilizing could be effective a more than relying on fertilizer application only. So far breeders have concentrated their efforts on screening existing cultivars and lines under P-deficient conditions with variable traits related to P-deficient tolerance (IRRI 1985; Hung 1985; Fegeria 1988; Chaubey et al. 1994). Information on the inheritance of P-deficiency tolerance and P-uptake efficiency are valuable for initiating an efficient breeding program to raise P-deficiency tolerance in rice. Majumber et al. (1989) and Chaubey et al. (1994) concluded that P-deficiency tolerance is a quantitatively inherited trait with outstanding parents being carriers of mostly additive genes.

Since the reports of Wissuna et al. (1998), Kasalath (*O. sativa*), lowland rice from Karimganj, Assam, India has been used as donor parent for several research topics. *Pup1* QTL for P deficiency tolerance that related to high P uptake, high tillering ability, and high root growth under P deficient upland condition (Wissuwa and Ae 2001; Wissuwa et al. 2002)

and also to induced root elongation (Shimizu et al. 2004, 2008). Sarkar et al. (2011) screened the local available rice genotypes suitable for P deficient tolerance and validated two *Pup-1* linked INDEL markers for diagnostic value. They recommended three Bengal Landraces, Bhutmuri, Gobindabhog and Radhunipagol as donor parents for introgression high P-uptake locus into IR36, IR64, by following the banding pattern of *Pup-1-K42* and *Pup-1-K29* marker for foreground selection. The application of *Pup1* sequences were analyzed by Chin et al. (2011) interestingly, the protein kinase gene *OsPupK46 -2* was closely associated with P-deficiency tolerance and was highly conserved in stress-adapted rice accessions (Chin et al. 2010, 2011). All of the above researches suggested that P-deficiency tolerance, especially *Pup1* gene family was highly conserved in stress-adapted rice accessions (Chin et al. 2010, 2011).

Therefore, it might also be conserved in an indigenous upland rice accessions. To screening for P-deficiency tolerance and validation of *Pup-1* linked markers in indigenous upland rice need to be investigated. The objective of this study is to assess the genotypic variation in P-deficiency tolerance in indigenous upland rice and to exploit the potential for P-deficiency tolerance in upland rice improvement.

Material and Method

Plant materials

One hundred and sixty eight indigenous upland rice varieties had been collected from various planting areas throughout Thailand, viz. Khon Kean, Phitsanulok, Phetchabun, Chiang Mai, Loei, Kalasin and Patthalung ect. were used as materials for greenhouse screening with solution culture method and validation of *Pup-1* linked markers.

Greenhouse evaluation

Seed of indigenous upland rice materials were soaked for 24 hours and moisten for 3 days. The germinated seeds were placed on a polystyrene plate of size 50 x 57 cm with a diameter of 1.5 cm a total of 128 holes on the foam sheet floating in a plastic container containing 40 L tap water. Three seeds of each variety were sown in each row. The experiment were subjected in a Random Complete Block Design (RCBD) with three replications. One week after germination, the materials were evaluated in hydroponic solutions under two phosphorus regimes, with phosphorus (AP) and without phosphorus (NAP). The AP and NAP treatments contained normal nutrient solution with and without 0.32 mM NaH_2PO_4 , respectively. Normal nutrient solutions, modified from Yoshida (1976), as earlier reported (Shimizu et al. 2008) consisted of 1.43 mM NH_4NO_3 , 0.32 mM NaH_2PO_4 , 0.51 mM K_2SO_4 , 1.00 mM CaCl_2 , 1.64 mM MgSO_4 , 9.11 M MnCl_2 , 0.07 M $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 18.49 M H_3BO_3 , 0.15 M ZnSO_4 , 0.16 M CuSO_4 , and 35.77 M FeCl_3 . The nutrient solution was changed with 4 days interval and the pH of the solution will be adjusted daily of 5.0 with 1 N NaOH or HCl.

At 15 days after treatment (DAT) the plant symptom score of leaves was record according to the procedure decried by (IRRI 2002). Then plant height, tiller number were recorded after that shoot and root were collected and dried for measurement the shoot and root dry weight. The experiment were conducted in season 1 (2016) and season 2 (2017) at

Khon Kaen University, Khon Kaen province, Thailand. The phosphorus deficiency tolerance index (PDIT) was calculated from the data under NAP/AP conditions in all traits except plant symptom score (SC). The dry weight reduction was calculated from; $[(\text{TDW under AP condition} - \text{TDW under NAP condition}) / \text{TDW under AP condition}] \times 100$, where: TDW=total dry weight, AP=apply phosphorus and NAP= non-apply phosphorus.

DNA extraction and *Pup-1* gene validation

Total genomic DNA will be extracted from young leaves of each variety using the method described by Lodhi et al. (1994) with a slight modification. The DNA will be quantified against a lambda DNA on 1.0% agarose gel stained with ethidium bromide and diluted to 5ng/μl for PCR amplification. The *Pup-1* linked marker reported earlier by Chin et al. (2010, 2011) and Gamuyao et al. (2012) were validated for P-deficiency tolerance in indigenous upland rice using PCR components and conditions as their previously reported by Sarkar et al. (2011).

Statistical analysis

Analysis of Variance (ANOVA), correlation and linear regression analysis were conducted on the observed traits using R- program version 2.10.0 (R Development Core Team 2008).

Results and discussions

Phenotypic response

The phenotypic response of 186 indigenous rice genotypes under both experimental years were showed in Table 1. In season 1, the genotypes showed highly significant in tiller number (TN), plant height (PH), shoot dry weight (SDW), root dry weight (RDW) and total dry weight (TDW) under both applied phosphorus (AP) and non-applied phosphorus (NAP) conditions. Root/shoot ratio (RSR) was not significant under applied phosphorus (AP) but highly significant under non-applied phosphorus (NAP) condition. The plant symptom score (SC) and dry weight reduction under non-applied phosphorus (NAP) were highly significant (Table 1). In season 2, all of trait were significant under both phosphorus conditions. The reduction of dry weight was 48% in season 1 and 34% in season 2 that referred to the severity of phosphorus deficit. That result can be confirm by the SC was showed higher in season 1 than season 2 (Table 1). The different of season and genotypes was found effected to all collected parameters. The season x genotypes interaction was highly significant except the RSR in AP condition and TN, RSR and dry weight reduction in NAP condition. The SC of genotypes was different between season, genotypes and season x genotypes interaction (Table 1). The reduction and SC were high referred to the severity of phosphorus deficit. Variability among the genotypes was highest for all traits especially under NAP with CVs of 7.3% to 15.9% (Table 1). The different of season was the main problem of severity symptom due to the different of humidity, temperature and intensity of light. Although, the hydroponic screening was conducted under greenhouse condition but the ambient condition was varies depended on environment condition. The controlling of P ions under hydroponic systems was useful for large scale screening (Asoa, 2012). Moreover, total dry weight under NPA in season 1 was generally low because of the high temperature than that in season 2. The low of SC referred to the severity of phosphorus deficit in season 1 as the reduction of plant dry

weight. The reduction of plant dry weight was greatly correlated with SC under phosphorus deficiency condition in rice. The P-deficiency were associated with growth and development of plants (Marschner 2012); growth retardation, small and curly leaves and reduced numbers of tillers (Dobermann and Fairhurst 2000). Shoot dry weight under NAP condition was lower than under AP condition also observed under limited P conditions which SDW were considered as the best parameter for P-deficiency tolerance and P-utilization efficiency is directly proportional to the P-deficiency tolerance (Aluwihare et al. 2016).

The correlation of some traits under both AP and NAP conditions revealed a high significant within and between conditions. The SC were negative correlated with TN ($r = -0.293^{**}$), TDW ($r = -0.291^{**}$), SDW ($r = -0.356^{**}$) and RDW ($r = -0.216^{**}$) which it's indicated that the large plant size can be more tolerance under phosphorus deficiency condition. However, the reduction of dry weight was positive correlation with the large plant size such as large TN ($r = 0.453^{**}$), TDW ($r = 0.563^{**}$), SDW ($r = 0.495^{**}$) and RDW ($r = 0.545^{**}$) under AP condition. On the other hand, DWR was negative correlation with TN, TDW, SDW and RDW under NAP condition. There are indicated that the plant size was more importance under phosphorus deficiency condition. Furthermore, the large reduction of dry weight was correlated with high SC ($r = 0.361^{**}$) which the score can be predict the reduction and the large score was found in low TN and low plant dry weight genotypes (Table 2). The high TN was more tolerance to P-deficit due to the high tolerance to P-deficiency was depended on P uptake of genotype which tiller was more correlated with P uptake (Wissuwa and Ae 2001). Moreover, genotypes could be produce large number of tiller under P deficit condition compared to efficiency condition (Aluwihare et al. 2016).

In addition, RDW and SDW was referred to P uptake in plant that showed more general adaptation to P deficiency (Wissuwa and Ae 2001), there are reliable criteria to identify genotypes with tolerance to P deficiency. The low SC was due to a large root system

and SDW, however, cannot be attributed increasing RSR because their larger roots provided sufficient P to maintain shoot growth (Wissuwa and Ae 2001). The increasing of root dry weight under NAP condition were enhancing the total surface area available for soil exploration and acquisition of nutrients affected to amount of absorptive surface area (Raghothama 1999) which showed low SC. The dry weight reduction (DWR) was the criteria for determine the potential of genotypes which correlated with SC. More than 50% dry weight reduction under P deficit condition which dry weight was more correlated with P uptake by plant ($r=0.96^{**}$) (Wissuwa et al. 1998). So, the high reduction were low potential under P deficit condition.

The phosphorus deficiency tolerance was the interested trait in upland rice which phosphorus was fixed by soil particle (Shimizu et al. 2008). In the study, the results showed that the genotypic variation for the ability to P-deficiency tolerance (Table 1). Based on PDTI the genotypes was observed towards the more positive far side were more P-deficiency tolerant (Figure 1). In some group of indigenous upland rice were high tolerance even the previous report were no systematic studies are available for evaluate the P-deficiency tolerance of a large number of rice cultivars of diverse origin and plant types (Saito et al. 2015; Aluwihare et al. 2016). However, the large scale screening was the guideline to grouping the genotypes for further study. The different in PDIT in season 1 and 2 and affected to the combined analysis were showed in Figure 1. The different of genotypes response was due to the weather condition in each season. Season 2 had more tolerance than season 1 due to the lower temperature throughout the growing period (average 28 °C) while the average temperature of season 1 was 32 °C. The response of genotypes in season 2 were high PDTI than season 1 due to the low temperature affected to low PDTI (Figure 1). The genotypes were separated into 6 groups based on PDTI; highly tolerance, tolerance, moderate tolerance, moderate susceptible, susceptible and highly susceptible.

The three genotypes were grouped based on PDIT. The genotypes group 1 was highly tolerance and tolerance, genotypes group 2 was moderate tolerance and moderate susceptible and genotypes group 3 was susceptible and highly susceptible. The reduction of TN was more in genotype group 3 than group 1 and 2 as same as TDW. SDW was more reduction than RDW in all genotypes groups. Under NAP condition was increase the root/plant especially in genotypes group 1 which highly tolerance and tolerance to phosphorus deficiency. The ratio of root was more in NAP condition than AP condition in all genotypes groups (Figure 2). The NAP condition was affected to the reduction of above ground plant part. The genotypes with high tolerance to P-deficiency was low reduction and can be maintain the shoot and root growth than the susceptible groups. PDTI was the key selection criteria in this study due to the large scale screening in seedling stage did not had final yield. The basic criteria such as SC was more effective in the previous but it large variation. PDIT were use more characters for calculated, so, it more accuracy. The genotypes were grouped base on PDIT showed in Figure 2. The high tolerance group with high PDIT showed good tiller number, SDW, RDW and TDW as Zhang et al. (2015) use the low phosphorus tolerance index (LPTI) and low phosphorus performance index (LPPI) for good selection criteria under low phosphorus condition at seedling stage in maize. In many study had large number of trait which calculated as an index such as phosphorus efficiency index (Koide et al., 1999), LPTI and LPPI (Zhang et al., 2015). In this study, the selection of genotypes would be based on the SC and PDTI due to the variation of traits under different season. The eight genotypes with one check (PLD, ULR145, ULR124, ULR031, ULR026, ULR260, ULR183, ULR180 and ULR305) which high PDTI and low SC (<3) were selected for the further breeding program (Figure 3).

The validation of *Pub-1* gene linked markers

The validation of *Pup-1* linked gene with 9 markers including *Pup1-K42*, *Pup1-K43*, *Pup1-K46*, *Pup1-K52*, *Pup1-K41*, *PSTol-1*, *K1*, *K5* and *K29-1* were demonstrated that each lines appeared the expected band ranged from 0 to 9 markers (data not shown). The relation analysis between markers and tolerance are low relation. The most efficiency markers can be distinguish between tolerance and susceptible lines is *K1* and *K29-1*. The *Pup1* gene family had been reported the remaining candidate genes encode a putative fatty acid oxygenase, a dirigent-like protein, an aspartic proteinase, hypothetical proteins, and a putative protein kinase (Heuer et al. 2009) and several reported that the *Pup1* gene family was highly conserved in stress-adapted rice accessions (Chin et al. 2010, 2011). Moreover, some indigenous upland rice lines such as ULR183 and ULR213 has the high tolerance ability without *Pup-1* linked gene product. Those varieties was suit for future study for P- deficiency genes.

In summary, the large scale screening at seedling stage were usefulness although environment cause to the variation of genotypes. The phosphorus deficiency tolerance index (PDTI) could be used as a selection criteria together with the plant symptom score in large population. The genotypes with high tiller number, SDW, RDW and TDW were more tolerance than low dry weight genotypes. Eight upland genotypes; ULR031, ULR026, ULR124, ULR145, ULR180 ULR183, ULR260, and ULR305 were high PDTI and low plant symptom score as tolerance indigenous lowland rice variety (PLD). These genotypes are useful for breeding program and ULR183 and ULR213 was target for identify new allele for P- deficiency tolerance in further work.

Acknowledgments

This research was supported by The Thailand Research Fund (TRF) (Project code: TRG5880019) and Khon Kaen University, for providing financial support under the New researcher Scholar. Our gratitude is also extended to The Plant Breeding Research Center for Sustainable Agriculture and Research Center of Agricultural Biotechnology for Sustainable Economy, Khon Kaen University.

References

- Aluwihare YC, Ishan M, Chamikara MDM, Weebadde CK, Sirisena DN, Samarasinghe WL and Sooriyapathirana SDSS (2016) Characterization and Selection of Phosphorus Deficiency Tolerant Rice Genotypes in Sri Lanka. **Rice Science** 23(4): 184-195.
- Chaubey CN, Senadhira D and Gregorio GB (1994) Genetic analysis of tolerance for phosphorus deficiency in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics** 89: 313-317.
- Chin JH, Lu X, Haefele SM, Gamuyao R, Ismail A, Wissuwa M and Heuer S (2010) Development and application of gene-based markers for the major rice QTL Phosphorus uptake 1. **Theoretical and Applied Genetics** 120: 1073–1086.
- Chin JH, Gamuyao R, Dalid C, Bustamam M, Prasetyono J, Moeljopawiro S, Wissuwa M and Heuer S (2011) Developing rice with high yield under phosphorus deficiency: P_{up1} sequence to application. **Plant Physiology** 156: 1202–1216.
- Dobermann A and Fairhurst T (2000) Rice: Nutrient Disorders and Nutrient Management. Manila, Philippines: **Oxford Graphic Printers**: 203 pp.
- Fageria NK, Morais OP, Baligar VC and Wright RJ (1988) Response of rice cultivars to phosphorus supply on an oxisol. **Fertilizer Research** 16: 195-206.

- Gamuyao RJ, Chin H, Tanaka JP, Pesaresi P, Catausan S, Dalid C, Loedin IS, Mendoza E MT, Wissuwa M and Heuer S (2012) The protein kinase Pstol1 from traditional rice confers tolerance of phosphorus deficiency. **Nature** 488: 535-540.
- Heuer S, Lu X, Chin JH, Tanaka JP, Kanamori H, Matsumoto T, De Leon T, Ulat VJ, Ismail AM, Yano M and Wissuwa M (2009) Comparative sequence analyses of the major quantitative trait locus phosphorus uptake 1 (*Pup1*) reveal a complex genetic structure. **Plant Biotechnology Journal** 7: 456-457.
- Hung HH (1985) **Studies on tillering ability of rice under phosphorus stress**. Ph. D. Thesis, A and M University, Texas.
- IRRI (1985) **IRRI annual report for 1984**. International Rice Research Institute, Manila, The Philippines.
- IRRI (2002) **Standard Evaluation System for Rice (SES)**. International Rice Research Institute, Manila, The Philippines.
- Kirk GJD, George T, Courtois B and Senadhira D (1998) Opportunities to improve phosphorus efficiency and soil fertility in rainfed lowland and upland rice ecosystems. **Field Crop Research** 56: 73-92.
- Koide RT, Dickie IA and Goff MD (1999) Phosphorus Deficiency, Plant Growth and the Phosphorus Efficiency Index. **Functional Ecology** 13: 733-736.
- Koyama T, Chammek C and Snitwongse P (1973) Varietal differences of Thai rice in the resistance to phosphorus deficiency. **Technical bulletin of the Tropical Agriculture Research Center** 4: 32p.
- Lodhi MA, Ye GN, Weeden NF and Reisch BI (1994) A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. **Plant Molecular Biology Reporter**. 12(1): 6-13.

- Majumder ND, Borthakur DN and Rakshit SC (1989) Heterosis in rice under phosphorus stress. **Indian Journal of Genetics** 49: 231-235.
- Marschner H (2012) **Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants**. New York, USA: Academic Press: 158–165.
- Ozturk L, Eker S, Torun B and Cakmak I (2005) Variation in phosphorus among 73 bread and durum wheat genotypes grown in phosphorus deficient calcareous soil. **Plant and Soil** 269: 69-80.
- Pinheiro BS, Castro E and Guimaraes CM (2006) Sustainability and profitability of aerobic rice production in Brazil. **Field Crops Research** 97: 34–42.
- R Development Core Team (2008) **R: A language and Environment for Statistical Computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Raghothama KG (1999) Phosphate acquisition. **Annual review of plant physiology and plant molecular biology** 50: 665–693.
- Raghothama KG and Karthikeyan AS (2005) Phosphate acquisition. **Plant and Soil** 274: 37–49.
- Saito K, Linquist B, Atlin GN, Phanthaboon K, Shiraiwa T and Horie T (2006) Response of traditional and improved upland rice cultivars to N and P fertilizer in northern Laos. **Field Crops Res** 96: 216–223.
- Sarkar S, Yelne R, Chatterjee M, Das P, Debnath S, Chakraborty A, Mandal N, Bhattacharya K. and Bhattacharyya S (2011) Screening for phosphorus (P) tolerance and validation of *Pup-1* linked markers in indica rice. **Indian Journal of Genetics** 71(3): 209-213.
- Shimizu A, Yanagihara S, Kawasaki S and Ikehashi H (2004) Phosphorus deficiency-induced root elongation and its QTL in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics** 109: 1361–1368.

- Shimizu A, Kato K, Komatsu A, Motomura K and Ikehashi H (2008) Genetic analysis of root elongation induced by phosphorus deficiency in rice (*Oryza sativa* L.): fine QTL mapping and multivariate analysis of related traits. **Theoretical and Applied Genetics** 117: 987–996
- Wissuwa M, Wegner J, Ae N and Yano M (2002) Substitution mapping of *Pup1*: a major QTL increasing phosphorus uptake of rice from a phosphorus-deficient soil. **Theoretical and Applied Genetics** 105: 890–897.
- Wissuwa M, Yano M and Ae N (1998) Mapping of QTLs for phosphorus-deficiency tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics** 97: 777-783.
- Wissuwa M and Ae N (2001) Genotypic variation for tolerance to phosphorus deficiency in rice and the potential for its exploitation in rice improvement. **Plant Breeding** 120: 43-48.
- Yugi RA, Hidayat P and Susanto U (2014) Drought tolerance, phosphorus efficiency and yield characters of upland rice lines. **Emirates Journal of Food and Agriculture** 26(1): 25-34.
- Yoshida S, Forno DA, Cock JH and Gomez KA (1976) **Laboratory manual for physiological studies of rice**, 3rd eds. IRRI, Manila.
- Zhang H, Xu R, Xie C, Huang C, Liao H, Xu Y, Wang J and Li W (2015) Large-Scale Evaluation of Maize Germplasm for Low-Phosphorus Tolerance. **PLoS ONE** 10(5): e0124212

Table 1 Analysis of variance for the mean value tested traits under applied phosphorus (AP) and non-applied phosphorus (NAP) condition and two seasons combine.

Traits ¹	Season1				Season2				Combine ²							
	AP	CV	NAP	CV	AP	CV	NAP	CV	AP			CV	NAP			CV
		(%)		(%)		(%)		(%)	S	G	SxG	(%)	S	G	SxG	(%)
Tiller	3.13**	23.5	2.28**	25.2	2.75**	31.0	1.83**	17.9	**	**	*	4.9	**	**	ns	9.1
Plant height	84.08**	9.5	43.57**	8.9	64.71**	23.7	44.91**	17.9	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
SDW	1.35**	46.0	0.45**	28.3	1.24**	39.7	0.57**	44.0	**	**	**	10.3	**	**	**	9.1
RDW	0.51**	34.6	0.41**	25.7	0.31**	51.1	0.37**	36.7	**	**	**	9.6	**	**	**	7.3
TDW	1.86**	39.0	0.85**	23.2	1.55**	39.2	0.94**	36.7	**	**	**	9.3	**	**	**	7.4
RSR	0.40 ^{ns}	47.1	0.97**	30.0	0.27*	61.9	0.75*	56.3	**	*	ns	12.5	**	**	ns	9.8
SC	NA	NA	4.04**	28.2	NA	NA	3.28*	32.9	NA	NA	NA	NA	**	**	**	7.3
DWR (%)	NA	NA	47.74**	41.8	NA	NA	34.14*	97.1	NA	NA	NA	NA	**	**	ns	15.9

¹SDW=shoot dry weight, RDW=root dry weight, TDW=total dry weight, RSR=root/shoot ratio, SC=plant symptom score, DWR=dry weight reduction (%). ² S=season, G=genotypes, SxG=season x genotypes interaction. NA=not available data.

Table 2 Correlation among selection criteria under applied phosphorus (AP) and non-applied phosphorus (NAP) condition of two season

	Trait ¹	AP					NAP							
		tiller	TDW	RDW	SDW	RSR	tiller	TDW	RDW	SDW	RSR	SC	DWR	PDIT
AP	tiller	1.000												
	TDW	0.645**	1.000											
	RDW	0.535**	0.819**	1.000										
	SDW	0.634**	0.986**	0.712**	1.000									
	RSR	-0.256**	-0.235**	0.162*	-0.336**	1.000								
NAP	tiller	0.513**	0.283**	0.237**	0.277**	-0.081	1.000							
	TDW	0.285**	0.423**	0.361**	0.413**	-0.140	0.606**	1.000						
	RDW	0.150	0.306**	0.376**	0.265**	0.004	0.536**	0.881**	1.000					
	SDW	0.334**	0.443**	0.304**	0.454**	-0.215**	0.579**	0.952**	0.695**	1.000				
	RSR	-0.210**	-0.164*	0.032	-0.210**	0.189*	-0.224**	-0.307**	0.056	-0.499**	1.000			
	SC	0.069	0.147	0.200*	0.121	0.120	-0.293**	-0.291**	-0.356**	-0.216**	-0.098	1.000		
	DWR	0.453**	0.563**	0.495**	0.545**	-0.143	-0.225**	-0.334**	-0.371**	-0.274**	0.072	0.361**	1.000	

¹SDW=shoot dry weight, RDW=root dry weight, TDW=total dry weight, RSR=root/shoot ratio, SC=plant symptom score, DWR=dry weight

reduction (%), PDIT= phosphorus deficiency tolerance index. *, ** =significant at p<0.05 and p<0.01, respectively.

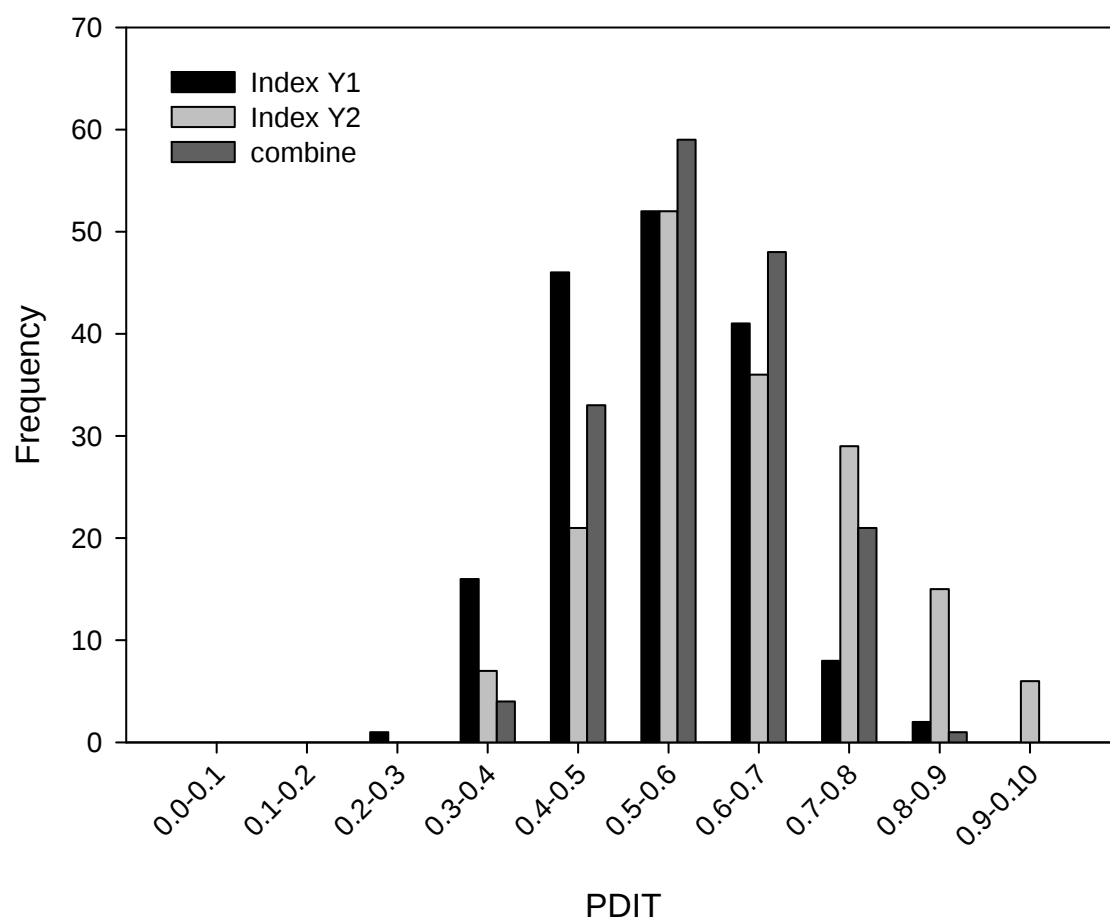


Figure 1 genotypes frequency of phosphorus index in season 1, season 2 and combine.

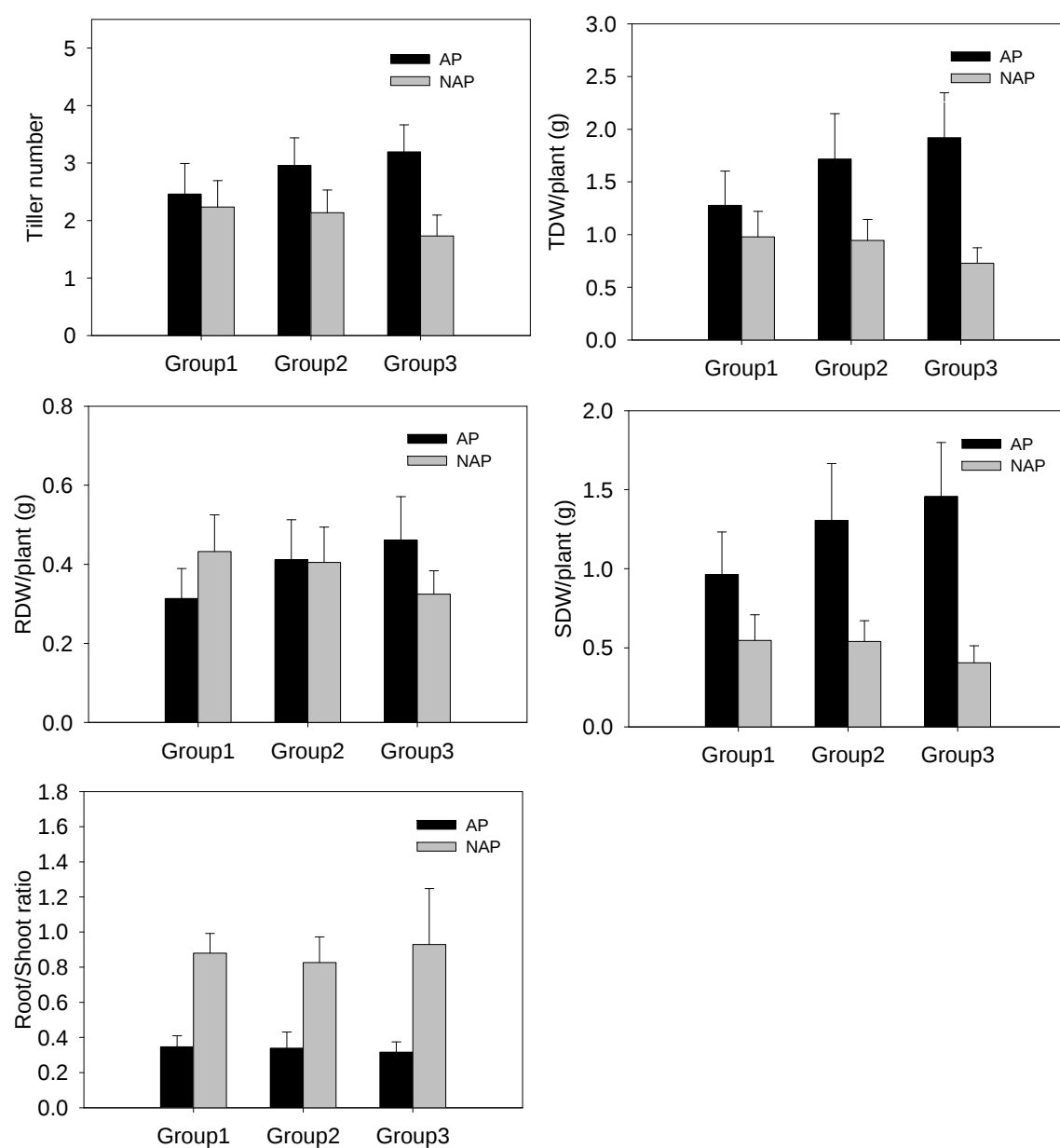


Figure 2 The mean value and standard deviation of 5 traits in three groups based on PDTI under apply phosphorus (AP) and non-apply phosphorus (NAP). Group 1, 2 and 3 represent high, moderate and low tolerance under phosphorus deficiency. N=22, 107 and 37 in group 1, 2 and 3, respectively.

