

<b>Thesis Title</b>	Gene Flow Between Cultivated and Wild Rice	
<b>Author</b>	Mrs. Sunisa Niruntrayakul	
<b>Degree</b>	Doctor of Philosophy (Agronomy)	
<b>Thesis Advisory Committee</b>	Assoc. Prof. Dr. Sansanee Jamjod	Chairperson
	Prof. Dr. Benjavan Rerkasem	Member
	Assoc. Prof. Dr. Dumnern Karladee	Member

## ABSTRACT

Thailand lies partly in center of diversity and domestication of rice, where dynamic of rice gene pool is still ongoing. Common wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) known as the wild progenitor of Asian cultivated rice (*O. sativa* L.), is the most important genetic resource for rice improvement. Wild ancestor has been found distributing widely in Thailand. Its habitat includes ditches, canals, marshes and riverbank and even within or at the edge of rice field (either under cultivation or abandoned). Co-habitat between wild ancestor and cultivated rice enhances the interspecific hybridization event to result in the weed in rice fields, weedy rice. Weedy rice becomes the most noxious weed in rice field in Thailand, causing severe crop yield loss leading to economic loss. Therefore, the objectives of this study were to evaluate effect of gene flow on crop rice and native wild rice population and to investigate the origin and spread of weedy rice in Thailand.

Firstly, the differentiation between cultivated and wild rice were investigated in morphological, physiological characteristics and DNA fingerprints in eight cultivated rice varieties adapted to rice growing regions of Thailand:

Chainat 1 (CNT1), Suphan Buri 1 (SPR1), Khao Dawk Mali 105 (KDML105), RD6, RD10, Niaw San-pah-tawng (NSPT), Sew Mae Jan (SMJ) and Kum Doi Sa Ket (KDK) and four common wild rice collected from natural habitats and difference locations: Lumphun (LP), Chiang Mai (CM), Kanchanaburi (KC) and Nakhon Nayok (NY). Wild rice exhibited spreading and prostrate plant type, open panicle with long awn, brown to black hull and red pericarp and seeds that were shattered when ripe. In contrast, cultivated rice showed erect plant type, compact panicle, awnless spikelets, straw color hull and white pericarp, except purple hull with dark purple pericarp in purple rice (KDK). DNA analysis using 7 microsatellite markers detected 65 polymorphic alleles across the cultivated and wild rice. The highest number of alleles per locus (15) across cultivated and wild rice populations was detected by RM1. Heterozygous genotypes were observed in wild rice populations when detected by RM1, RM164, RM167, RM225 and RM341. With all seven microsatellite markers, 1-6 alleles per locus were specific to cultivated rice, 3-8 alleles specific to wild rice and 1-2 alleles were shared between them. In cultivated rice, alleles of all varieties were fixed and genetic differentiation among populations ( $F_{ST}$ ) was 1 indicated that the genetic diversity of eight cultivated rice in this study resulting from the differentiation among varieties, no variation within variety was found. In contrast, wild rice populations showed high level of both within and among populations genetic diversity. The total genetic variation of wild rice population was partitioned into 57% for among individuals and 43% for among populations ( $F_{ST} = 0.43$ ).

To determine the scope and potential of interspecific hybridization between cultivated and wild rice, eight cultivated rice varieties from the first

experiment were used as female parents and three wild rice populations (LP, KC and NY) were selected and used as male parents. Crosses were made between all cultivated rice and wild rice. Eight crosses between cultivated rice varieties x LP wild rice, eight crosses between cultivated rice varieties x KC wild rice and six crosses between cultivated rice varieties x NY wild rice were generated. Cultivated rice can easily cross with wild rice and set seed at different rates depended on cultivated and wild rice combinations, which were between 6-62%. High yielding varieties, CNT1 and SPR1, gave the highest percentage of seed set when crossed with wild rice. Germination of  $F_1$  seed were 20-85% and developed into normal plant with 0-100%. Seed germination of  $F_2$  populations were higher than  $F_1$ s, ranging from 87 to 97% and developed into normal plant between 71 to 94%. Thirteen  $F_1$  hybrids, 10  $F_2$  populations and their parents were grown in pot experiments to evaluate morphological and physiological characters. It was found that wild traits such as awning, black hull, red pericarp and seed shattering were controlled by 1–3 genes with dominant action.  $F_1$  hybrids were taller and had more spikelets panicle<sup>-1</sup> compared with cultivated rice. In  $F_2$  generation, morphological and physiological characters of most  $F_2$  plants were segregated into wild type and intermediate between cultivated and wild rice. Transgressive segregations were found in number of panicles plant<sup>-1</sup>, panicle length, number of spikelets and seeds panicle<sup>-1</sup> and seed size. Therefore, the interspecific hybridization provided a large source of genetic variation and adaptation in segregating populations.

Finally, evidence of natural gene flow between cultivated and wild rice were determined. Cultivated, weedy and wild rice seed samples were collected

from Kanchanaburi province where heavy weedy rice infestation was found. Rice seed samples were grown in pot experiments to evaluate morphological, physiological characters and DNA analysis compared with pure SPR1 and CNT1 breeder seeds. Evidence of successful hybridization between cultivated and wild rice has been found in the farmers' rice crop, in the weedy rice and in the naturalized wild rice populations by morphological, physiological traits and DNA markers. Two-way direction of both crop to wild and wild to crop gene flow were also demonstrated by the presence of crop rice alleles in wild rice populations and wild rice alleles in crop rice populations. Weedy rice contained both wild and crop alleles. About 3-12% of morphological traits found in wild rice such as awn, black hull and red pericarp were detected in farmers' rice crop and 18-32% of cultivated rice traits such as straw color hull and white pericarp were observed in wild rice in the ditch near the rice fields. Further evidence of gene flow was provided by the DNA analysis. The average frequency of markers at 5.4-11.7% of wild rice alleles were found in farmers' crop rice and 1.6-7.8% of crop rice alleles were found in wild rice. Weedy rice was mixture of homozygous for crop alleles, wild alleles and heterozygous for both wild and crop alleles. Outcrossing rates, calculated from F-statistics, at 13-28% were found for weedy rice and farmers' SPR1 crop rice. This indicates high possibility of gene flow between crop rice and weedy rice. This may lead to the convergent of weedy rice toward crop rice which will increase difficulty of weedy rice control.

From this study, it was concluded that gene flow between cultivated and wild rice can occur. The evidence of gene flow between both of them can be determined by using morphological, physiological characteristics and DNA

analysis. The successful of gene flow was supported by the results that cultivated rice could easily cross with wild rice. F<sub>1</sub> hybrids derived from cultivated x wild rice were interfertile and produced normal seedlings for the next generations. High segregation in morphological and physiological were observed in F<sub>2</sub> generations. This will be useful in plant breeding program. On the other hand, weedy rice was shown to be the product of hybridization between cultivated and wild rice. Continuing gene introgression from cultivated rice to weedy rice is an ongoing process to increase genetic diversity and convergent of weedy rice which made it more difficult to eliminate. Therefore, for areas in which cultivated and wild rice grow in close proximity, gene flow between introduced rice genotypes with new traits and wild rice should be examined to prevent the build up of invasive weedy rice.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การแลกเปลี่ยนยีนระหว่างข้าวปลูกและข้าวป่า	
ผู้เขียน	นางสุณิสา นิรันตรายกุล	
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (พืชไร่)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ. ดร. ศันสนีย์ จำจด	ประธานกรรมการ
	ศ. ดร. เบญจวรรณ ฤกษ์เกษม	กรรมการ
	รศ. ดร. ดำเนิน กาละดี	กรรมการ

### บทคัดย่อ

ประเทศไทยนับเป็นส่วนหนึ่งของศูนย์กลางของความหลากหลายทางพันธุกรรมข้าว ข้าวป่าสามัญ (*Oryza rufipogon* Griff.) เป็นบรรพบุรุษของข้าวปลูกเอเชีย หรือ *O. sativa* L. และเป็นแหล่งพันธุกรรมที่สำคัญสำหรับโครงการปรับปรุงพันธุ์ ข้าวป่าพบขึ้นกระจายทั่วทุกภาคของประเทศไทย ทั้งสภาพธรรมชาติ เช่น หนอง คลอง บึงและขึ้นร่วมหรือขึ้นใกล้กับแปลงข้าวปลูกทั้งที่อยู่ในระบบเพาะปลูกข้าวหรือในนาร้าง การอยู่ร่วมกันของประชากรข้าวปลูกและข้าวป่าเป็นการเพิ่มโอกาสในการผสมข้ามระหว่างข้าวทั้งสองชนิดซึ่งอาจเป็นผลทำให้เกิดวัชพืชในนาข้าว นอกจากข้าวปลูกและข้าวป่าแล้วนั้น ปัจจุบันยังพบข้าววัชพืช ซึ่งนับเป็นวัชพืชร้ายแรงขึ้นระบาดร่วมกับข้าวปลูกในแปลงเกษตรกร ส่งผลให้ผลผลิตและคุณภาพข้าวของเกษตรกรลดลง ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานทดลองนี้เพื่อประเมินผลกระทบของการแลกเปลี่ยนยีนต่อประชากรข้าวปลูกและข้าวป่าและหาสาเหตุของการเกิดข้าววัชพืชเพื่อหาวิธีการป้องกันการระบาดของข้าววัชพืชในประเทศไทยต่อไป

จากการศึกษาการประเมินลักษณะทางลักษณะ สรีระและลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวปลูกจำนวน 8 พันธุ์ประกอบด้วย พันธุ์ชยันต 1 สุพรรณบุรี 1 ขาวดอกมะลิ 105 กข 6 กข 10 เหนียวต้นป่าตอง ชิวแม่จันและท่าคอยสะเกิด เปรียบเทียบกับข้าวป่าที่เก็บจากสภาพธรรมชาติจำนวน 4 ประชากร ได้แก่ ประชากรข้าวป่าจากจังหวัดลำพูน เชียงใหม่ กาญจนบุรีและนครนายก พบความแตกต่างระหว่างประชากรข้าวปลูกและข้าวป่าดังนี้คือข้าวป่ามีทรงกอเอนมาก ไปจนถึงนอน รวงกระจาย มีหางยาวบนยอดดอก เปลือกเมล็ดสีน้ำตาลเข้มจนถึงดำและเชื้อหุ้มเมล็ดสีแดง ในระยะเก็บเกี่ยวเมล็ดร่วงทั้งหมด แตกต่างจากข้าวปลูกที่พบว่ามีทรงกอตั้งตรง รวงจับกันแน่น ไม่มีหางบนยอดดอก เปลือกสีฟางและเชื้อหุ้มเมล็ดมีสีขาว ยกเว้นข้าวเหนียวดำพันธุ์ท่าคอยสะเกิดที่มีเปลือกเมล็ดและเชื้อหุ้มเมล็ดสีม่วงดำ ส่วนการศึกษาในระดับโมเลกุลอาศัยการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล microsatellite markers จำนวน 7 ตำแหน่งนั้นพบว่าไพรเมอร์ทั้ง 7

ตำแหน่งให้แถบดีเอ็นเอ ที่แตกต่างกันทั้งหมด 65 แถบโดยไพรเมอร์ RM1 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอ สูงที่สุดถึง 15 แถบและไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่แสดงลักษณะเป็น heterozygous genotypes ใน ประชากรข้าวป่า ได้แก่ RM1, RM164, RM167, RM225 และ RM341 ไพรเมอร์ทั้ง 7 คู่ให้จำนวน allele เฉลี่ยเท่ากับ 1 - 6 alleles ต่อตำแหน่ง (locus) โดยแบ่งเป็น allele ที่เฉพาะเจาะจง (specific allele) ต่อข้าวปลูก 1-2 alleles ต่อข้าวป่า 3-8 alleles และ allele ที่พบทั้งข้าวปลูกและข้าวป่า รวมกัน (shared allele) จำนวน 1-2 alleles นอกจากนี้ยังพบว่าการศึกษาในระดับโมเลกุลแสดงให้เห็นว่าโครงสร้างทางพันธุกรรมของข้าวปลูกและข้าวป่ามีความแตกต่างกัน โดยในประชากรข้าวปลูกไม่พบความหลากหลายภายในประชากร ( $H_S = 0$ ) แต่พบความแตกต่างระหว่างประชากร ( $F_{ST} = 1$ ) ซึ่งความแตกต่างที่พบนั้นเป็นความแตกต่างระหว่างพันธุ์ทั้งสิ้น ในส่วนของประชากรข้าวป่านั้น มีความหลากหลายทางพันธุกรรมทั้งภายในประชากรและระหว่างประชากร มีค่า  $F_{ST}$  เท่ากับ 0.43 แสดงว่าความแตกต่างที่เกิดขึ้นทั้งหมดเป็นผลมาจากความแตกต่างระหว่างต้นภายในประชากร (57%) มากกว่าความแตกต่างระหว่างประชากร (43%)

ในการศึกษาความสามารถในการผสมพันธุ์ข้ามชนิดระหว่างข้าวปลูกจำนวน 8 พันธุ์กับข้าวป่าจำนวน 3 ประชากร (ลำพูน กาญจนบุรีและนครนายก) จากงานทดลองที่ 1 โดยใช้ข้าวปลูกเป็น พันธุ์แม่ ข้าวป่าเป็นพันธุ์พ่อสำหรับสร้างกลุ่มผสม ได้ลูกผสมจำนวน 8 กลุ่มผสมระหว่างข้าวปลูกและข้าวป่าลำพูน ลูกผสมจำนวน 8 กลุ่มผสมระหว่างข้าวปลูกและข้าวป่ากาญจนบุรีและลูกผสมจำนวน 6 กลุ่มผสมระหว่างข้าวปลูกและข้าวป่านครนายก พบว่าข้าวปลูกและข้าวป่าสามารถผสมกันได้ปกติ โดยมีอัตราผสมติดอยู่ระหว่าง 6 ถึง 62% ขึ้นอยู่กับพันธุ์ข้าวปลูกและประชากรข้าวป่าที่ใช้ นอกจากนี้ยังพบว่า ข้าวปลูกพันธุ์ชัยนาท 1 และสุพรรณบุรี 1 ให้อัตราผสมติดสูงที่สุดเมื่อผสมพันธุ์กับข้าวป่าทั้งสาม ประชากร เมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 มีอัตราการงอกตั้งแต่ 20 – 85% และสามารถเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ ตั้งแต่ 0 – 100% เมล็ดลูกผสมชั่วที่ 2 มีอัตราการงอกสูงกว่าลูกผสมชั่วที่ 1 โดยมีอัตราการงอกเฉลี่ย ตั้งแต่ 87 – 97% และสามารถเจริญเป็นต้นสมบูรณ์ได้ตั้งแต่ 71 – 94% ได้นำลูกผสมชั่วที่ 1 จำนวน 13 กลุ่มผสมและลูกผสมชั่วที่ 2 จำนวน 10 กลุ่มผสมปลูกทดสอบในกระถาง เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐาน และสรีระเปรียบเทียบกับพันธุ์พ่อแม่ พบว่าลักษณะข้าวป่า ได้แก่การมีหาง เปลือกเมล็ดสีดำ เยื่อหุ้ม เมล็ดสีแดงและการร่วงของเมล็ด เป็นลักษณะเด่นถูกควบคุมด้วยยีนจำนวน 1-3 คู่ ลูกผสมชั่วที่ 1 แสดงลักษณะดีเด่นกว่าข้าวปลูกในลักษณะความสูงและจำนวนดอกต่อรวง ในลูกผสมชั่วที่ 2 พบการกระจายของลักษณะทั้งที่เหมือนข้าวป่า และแสดงลักษณะอยู่ระหว่างข้าวปลูกและข้าวป่า นอกจากนี้ ยังพบว่าลักษณะความยาวรวง จำนวนรวงต่อต้น จำนวนดอกต่อรวง จำนวนเมล็ดต่อรวงและขนาด เมล็ด ของประชากรชั่วที่ 2 มีการกระจายตัวอยู่นอกเหนือขอบเขตของพ่อแม่ (transgressive segregation) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการผสมพันธุ์ข้ามชนิดระหว่างข้าวปลูกและข้าวป่าเป็น

การสร้างแหล่งความแปรปรวนทางพันธุกรรมและให้ลักษณะที่เอื้อต่อการปรับตัวในประชากรที่มีการกระจายตัว

ในงานทดลองสุดท้ายเป็นการตรวจสอบการแลกเปลี่ยนยีนในสภาพธรรมชาติระหว่างข้าวปลูกและข้าวป่า โดยได้เก็บตัวอย่างเมล็ดข้าวปลูกพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ข้าววัชพืชที่ขึ้นระบาดในแปลงข้าวปลูกและข้าวป่าที่ขึ้นบริเวณข้างเคียงจากจังหวัดกาญจนบุรีที่มีรายงานพบการระบาดของข้าววัชพืชอย่างรุนแรง นำตัวอย่างเมล็ดข้าวปลูกทดสอบในกระถาง เพื่อประเมินลักษณะเปรียบเทียบกับข้าวปลูกเมล็ดพันธุ์บริสุทธิ์พันธุ์สุพรรณบุรี 1 และชัยนาท 1 พบว่าสามารถตรวจพบการแลกเปลี่ยนยีนในประชากรข้าวปลูกจากแปลงเกษตรกร ข้าววัชพืช และข้าวป่าในสภาพธรรมชาติได้ โดยตรวจสอบจากลักษณะทางสัณฐาน สรีระ และดีเอ็นเอ พบทิศทางการแลกเปลี่ยนยีนทั้งจากข้าวปลูกสู่ข้าวป่าและข้าวป่าสู่ข้าวปลูก โดยตรวจพบการปรากฏ allele ของข้าวปลูกในประชากรข้าวป่า และพบ allele ของข้าวป่าในประชากรข้าวปลูก สำหรับข้าววัชพืชนั้นพบทั้ง allele ของข้าวปลูกและข้าวป่า พบลักษณะเด่นของข้าวป่าเช่น การมีหาง เมล็ดสีน้ำตาลถึงดำ เยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงในตัวอย่างข้าวปลูกจากเกษตรกรคิดเป็น 3-12% สำหรับประชากรข้าวป่าที่ขึ้นอยู่ใกล้แปลงข้าวปลูกพบลักษณะข้าวปลูกได้แก่เปลือกสีฟางและเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวคิดเป็น 18-32% ของประชากร จากการตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอด้วยเทคนิค microsatellite markers จำนวน 3 ตำแหน่ง พบ allele ของข้าวป่าในตัวอย่างข้าวปลูกจากเกษตรกรคิดเป็น 5.4 – 11.7% และตรวจพบ allele ของข้าวปลูกในประชากรข้าวป่าคิดเป็น 1.6 – 7.8% สำหรับในข้าววัชพืชนั้นพบว่าในประชากรข้าววัชพืชประกอบไปด้วย homozygous genotype ชนิดที่เหมือนทั้งข้าวปลูกและข้าวป่า รวมทั้ง heterozygous genotype ที่มี allele ของทั้งข้าวปลูกและข้าวป่า นอกจากนี้จากการคำนวณอัตราผสมข้าม (outcrossing rate,  $t$ ) โดยใช้ F-statistics พบว่าข้าวปลูกของเกษตรกรและข้าววัชพืชมีอัตราผสมข้ามอยู่ระหว่าง 13–28% แสดงให้เห็นว่าโอกาสที่จะเกิดการแลกเปลี่ยนยีนระหว่างข้าวปลูกและข้าววัชพืชมีสูงมาก ซึ่งถ้าเกิดการแลกเปลี่ยนยีนดังกล่าวจะเป็นกระบวนการที่ทำให้ข้าววัชพืชมีลักษณะคล้ายข้าวปลูกมากขึ้น ส่งผลให้การควบคุมกำจัดข้าววัชพืชเป็นไปได้ยากยิ่งขึ้น

โดยสรุปจากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้พบว่ามีการแลกเปลี่ยนยีนระหว่างข้าวปลูกและข้าวป่าสามารถตรวจสอบการแลกเปลี่ยนยีนได้โดยใช้ลักษณะทางสัณฐาน สรีระ และดีเอ็นเอ พบผลการทดลองที่ช่วยยืนยันว่าการแลกเปลี่ยนยีนนั้นเกิดขึ้นได้โดยพบว่าข้าวปลูกสามารถผสมกับข้าวป่าได้ และให้ลูกผสมที่เป็นปกติ สามารถเจริญเติบโตให้ลูกผสมในชั่วถัดไป พบการกระจายตัวในลูกผสมชั่วที่ 2 ซึ่งนับเป็นแหล่งพันธุกรรมที่มีประโยชน์สำหรับงานปรับปรุงพันธุ์ ในทางกลับกันพบว่าการผสมพันธุ์ข้ามชนิดระหว่างข้าวปลูกและข้าวป่าทำให้เกิดข้าววัชพืช การแลกเปลี่ยนยีนอย่างต่อเนื่องระหว่างข้าวปลูกและข้าววัชพืชนับเป็นกระบวนการที่ช่วยเพิ่มความหลากหลายและความสามารถในการ



ปรับตัวของข้าววัชพืชให้คล้ายข้าวปลูก ซึ่งทำให้การกำจัดข้าววัชพืชเป็นไปได้ยากยิ่งขึ้น ดังนั้นในพื้นที่ที่มีข้าวปลูกและข้าวป่าขึ้นร่วมกัน การที่จะนำข้าวพันธุ์ใหม่เข้ามาปลูกควรจะต้องมีการประเมินผลที่เกิดจากการแลกเปลี่ยนยีนระหว่างข้าวปลูกและข้าวป่าที่จะเกิดขึ้นได้เพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของข้าววัชพืชต่อไป



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved