

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การประเมินการปนเปื้อนของยีนแปลกปลอมจากข้าว ปลูกในประชากรข้าวป่าสามัญ	
ผู้เขียน	นายอนุพงศ์ วงศ์ตามี	
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) พืชไร่	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร. ศันสนีย์ จำจด	ประธานกรรมการ
	ศ.ดร. เบญจวรรณ ฤกษ์เกษม	กรรมการ
	ดร. จรรย์ยาม ภูมิโชติ	กรรมการ
	บทคัดย่อ	

ข้าวป่าสามัญ (Common wild rice, *Oryza rufipogon* Griff.) ที่เป็นบรรพบุรุษของข้าวปลูกเอเชีย (*O. sativa* L.) พบอยู่ทั่วไปในทุกภาคของประเทศไทย ในสภาพธรรมชาติมักพบถิ่นอาศัยของข้าวป่าสามัญอยู่ใกล้กับแปลงข้าวปลูก ทำให้ข้าวทั้งสองชนิดนี้สามารถผสมข้ามกันได้ ซึ่งการผสมข้ามนี้อาจนำไปสู่การปนเปื้อนของยีนแปลกปลอมเข้าสู่ประชากรข้าวป่าในสภาพธรรมชาติ ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อวิวัฒนาการของประชากรข้าวป่าสามัญ นอกจากนั้นลูกผสมที่ได้ อาจวิวัฒนาการไปเป็นข้าววัชพืช (weedy rice) ซึ่งนับว่าเป็นวัชพืชร้ายแรงที่สร้างความเสียหายแก่ผลผลิตข้าวปลูกทั้งด้านปริมาณและคุณภาพ หากลูกผสมที่ได้มีความสามารถในการอยู่รอดและสืบเผ่าพันธุ์สูง อาจจะเข้าแทนที่และทำให้ประชากรข้าวป่าสามัญสูญพันธุ์ ดังนั้นการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบของการปนเปื้อนยีนจากข้าวปลูกในประชากรข้าวป่าสามัญในถิ่นอาศัยตามธรรมชาติ แบ่งการศึกษาออกเป็นการสำรวจและเก็บตัวอย่างประชากรข้าวป่าและข้าววัชพืช การประเมินลักษณะข้าวป่าชนิดข้ามปีในกระถาง และการวิเคราะห์ DNA ของข้าวป่าและข้าววัชพืชทุกประชากร

ในการสำรวจประชากรข้าวป่าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 10 จังหวัด และภาคเหนือ 1 จังหวัด ข้าวป่าที่พบสามารถจำแนกตามลักษณะได้ 3 ชนิด ได้แก่ชนิดข้ามปีมีลักษณะแตกกอมาก รวงใหญ่ เกสรตัวผู้ขนาดใหญ่ ดิคมเล็กน้อย พบในที่ที่มีระดับน้ำลึก และในแปลงข้าวที่รกร้าง จำนวน 12 ประชากร ชนิดปีเดียวมีลักษณะลำต้นเล็กแตกกอเล็ก เกสรตัวผู้ขนาดเล็ก ดิคมเล็กมาก พบบนคันนาหรือขอบแปลงข้าว คุน้ำชั่วคราวข้างถนน และแปลงข้าวที่รกร้าง จำนวน 14 ประชากร ชนิด intermediate มีลักษณะกึ่งกลางระหว่างข้าวป่าชนิดข้ามปีและชนิดปีเดียว จำนวน 11 ประชากร และข้าววัชพืชมีลักษณะส่วนใหญ่เหมือนกับข้าวปลูกไปจนถึงเหมือนข้าวป่า พบระบอบในแปลงข้าว และบนคันนาหรือขอบแปลงข้าว จำนวน 5 ประชากร

ในการประเมินลักษณะทางสัณฐานและสรีระของประชากรข้าวป่าสามัญชนิดข้ามปีในกระถาง ปลูกตัวอย่างลำต้นข้าวป่าชนิดข้ามปีที่ได้จากการสำรวจประชากรข้าวป่าสามัญจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 14 ประชากร ประชากรละ 10 ต้น ในกระถางและบันทึกลักษณะข้าวป่าทุกต้น พบความหลากหลายภายในประชากรข้าวป่าจากลักษณะทางสัณฐานและสรีระ โดยทั่วไปแล้วข้าวป่ามีลักษณะทรงกอแผ่ มีเกสรตัวเมียสีม่วงดำหรือดำ เยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง และออกดอกเพียง 1 ครั้งต่อปีคือช่วงระหว่างเดือนตุลาคม ถึงเดือนพฤศจิกายน พบลักษณะของข้าวปลูกในบางต้นของประชากรข้าวป่า ดังนี้คือ ทรงกอตั้งตรง (พบ 13% ใน 2 ประชากร) เกสรตัวเมียสีขาว (พบ 19% ใน 6 ประชากร) เยื่อหุ้มเมล็ดมีสีขาว (พบ 23% ใน 4 ประชากร) และข้าวป่าออกดอก 2 ครั้งต่อปี (พบ 33% ใน 1 ประชากร)

ประเมินการปนเปื้อนยีนจากข้าวปลูกในประชากรข้าวป่าสามัญโดยนำตัวอย่างใบที่เก็บในระหว่างการสำรวจประชากรข้าวป่าสามัญจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มาตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอด้วยเทคนิค microsatellite markers จำนวน 5 ตำแหน่ง (RM20 RM225 RM164 RM341 และ RM588) พบ alleles ของข้าวปลูกชนิดที่ตรงกับข้าวปลูกพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 หรือ กข 15 ปนอยู่ในประชากรข้าวป่าและข้าววัชพืช 37 ประชากร มีความถี่ภายในประชากรระหว่าง 0.02–0.08 และชนิดที่ตรงกับข้าวปลูกพันธุ์ กข 6 มีความถี่ระหว่าง 0.01–0.24 พบชนิด genotypes ที่มี allele เป็นแบบ homozygous ในแบบขาวดอกมะลิ 105 หรือ กข 15 และ กข 6 มีความถี่ระหว่าง 0.02–0.80 และ 0.02–0.18 ตามลำดับ ชนิด heterozygous genotype ระหว่างแบบขาวดอกมะลิ 105 x ข้าวป่า มีความถี่ระหว่าง 0.04–0.60 และระหว่างแบบ กข 6 x ข้าวป่า มีความถี่ระหว่าง 0.04–0.16 แต่ทั้งประชากรข้าวป่าและข้าววัชพืชไม่พบการปนเปื้อนจากข้าวพันธุ์สมัยใหม่ พันธุ์ชัยนาท 1 และ สุพรรณบุรี 1 ในประชากรข้าวป่าและข้าววัชพืช

ในการวิเคราะห์โครงสร้างพันธุกรรม พบความแตกต่างในโครงสร้างประชากรของข้าวป่าแต่ละชนิด และข้าววัชพืช ประชากรข้าวป่าทุกชนิดและข้าววัชพืชมีความหลากหลายทั้งภายในและ

ระหว่างประชากร โดยค่าความแตกต่างระหว่างประชากร (F_{ST}) พบว่ามีค่าสูงสุดในประชากรข้าวป่าชนิดปีเดียว (0.59) รองลงมาคือชนิด intermediate (0.44) ชนิดข้ามปี (0.32) และข้าววัชพืช (0.29) ตามลำดับ ความแตกต่างในโครงสร้างประชากรส่วนใหญ่เป็นผลมาจากระบบการผสมพันธุ์และระบบการสืบพันธุ์ของประชากรข้าวป่าชนิดต่างๆ เนื่องจากข้าวป่าแต่ละชนิดและข้าววัชพืชมีความแตกต่างในอัตราการผสมข้าม โดยพบว่ามีค่าสูงสุดในประชากรข้าววัชพืช (55%) รองลงมาคือข้าวป่าชนิดข้ามปี (52%) ชนิด intermediate (39%) และชนิดปีเดียว (26%) ตามลำดับ และจากการศึกษาระยะห่างทางพันธุกรรมพบว่าสามารถจัดกลุ่ม gene pool ของข้าวในภาคตะวันออกเฉียงเหนือออกได้อย่างชัดเจน โดยใช้ค่า Nei's (1972) genetic distance และใช้ประชากรข้าวปลูกพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 กข 6 กข 15 ชัยนาท 1 และ สุพรรณบุรี 1 เป็นพันธุ์เปรียบเทียบ พบว่าสามารถแยกได้ 2 กลุ่มใหญ่ คือกลุ่มแรกประกอบด้วยประชากรข้าวป่า และกลุ่มที่สองประกอบด้วยประชากรข้าวปลูกและข้าววัชพืช ในกลุ่มแรกสามารถแยกประชากรได้อีกเป็น 2 กลุ่ม โดยประกอบด้วยข้าวป่าชนิดข้ามปีและชนิด intermediate และข้าวป่าชนิดปีเดียว และกลุ่มที่ 2 ก็สามารถแยกได้เป็นข้าวปลูก และข้าววัชพืช

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่ามี การปนเปื้อน ยีน จากข้าวปลูก ไปยังข้าวป่า ซึ่งสามารถตรวจสอบโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และในระดับดีเอ็นเอ ซึ่งการปนเปื้อนของยีนอาจส่งผลต่อวิวัฒนาการของข้าวป่าทั้งอาจช่วยเพิ่มความหลากหลายในประชากรข้าวป่า ในทางกลับกันอาจจะเป็นอันตรายต่อประชากรข้าวป่าจนทำให้สูญพันธุ์ได้ ดังนั้นการชักนำยีนแปลกปลอมเช่น ความต้านทานสารกำจัดวัชพืช จากข้าวปลูกพันธุ์ใหม่จะต้องระวังผลกระทบของการปนเปื้อนยีน เพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของข้าววัชพืชและการสูญพันธุ์ของข้าวป่าบรรพบุรุษ

Thesis Title	Evaluation of Exotic Genes Contamination from Crop Rice (<i>Oryza sativa</i> L.) in Common Wild Rice (<i>Oryza rufipogon</i> Griff.) Populations	
Author	Mr. Anupong Wongtamee	
Degree	Master of Science (Agriculture) Agronomy	
Thesis Advisory Committee	Assoc. Prof. Dr. Sansanee Jamjod	Chairperson
	Prof. Dr. Benjavan Rerkasem	Member
	Dr. Chanya Maneechote	Member

ABSTRACT

The common wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) is the ancestor of the Asian cultivated rice (*Oryza sativa* L.). They are commonly found throughout all regions of Thailand. In natural condition, wild rice's habitats were found near rice fields, leading to natural hybridization between them. Such hybridization may lead to gene contamination from cultivated rice in natural wild populations. This process may have a substantial impact on the evolution of wild rice populations. Hybrids form this might cause agronomic problems by producing aggressive weedy rice, which now threatens rice production in many regions of Thailand, resulting the reduction of quality and quantity of rice yield. In some cases, hybrid swarms with better ecological fitness, may lead to their aggressive spread in wild rice habitats and replacement and extinction of the original wild rice populations. Therefore, the objective of this study was to determine the exotic gene contamination from cultivated rice in common wild rice populations in natural habitats. This study consisted of the

survey to collect samples of wild and weedy rice, and evaluation of characteristics in perennial populations and DNA analysis in all populations of wild and weedy rice.

Firstly, wild rice populations were identified in 10 provinces of northeastern and 1 province of northern Thailand. Wild rice populations were classified into three types. The first was perennial type with more tillers, open panicle, large anthers and low seed set where mostly found in deep swamps and abandoned rice field (12 populations). The second was annual type, with fewer tillers, small anthers and higher seed set, found at the edge or near rice field, by the road side, and in abandoned rice field (14 populations). The last was intermediate type with intermediated traits between annual and perennial type (11 populations) and weedy rice, with varied morphological traits between crop rice and wild rice found at the edge or near rice fields and inside rice field (5 populations).

Perennial type of wild rice populations were evaluated by morphological and physiological traits. Ten plants/population of 14 wild rice populations from northeastern Thailand was planted in pot and recorded for morphological and physiological traits. Wild rice populations were found to be diverse within population in morphological and physiological traits. Generally, natural wild rice showed prostrate plant type, dark purple or black stigma, red pericarp and flowering once a year at October to November. However, some crop traits were found scattered in some plants of wild rice populations such as erect plant type (13% in 2 populations), plants with white stigma (19% in 6 populations), plants with white pericarp (23% in 4 populations) and flowering twice a year (33% in 1 populations).

Contaminations of gene from cultivated rice in wild rice populations were determined by molecular analysis. Leaf DNA samples from northeastern Thailand were analyzed by 5 microsatellite markers (RM20, RM225, RM164, RM341 and RM588). Crop alleles of KDML105/RD15 type were detected in 37 wild rice/weedy rice populations. Frequencies of KDML105/RD15 allele type detected within each population ranged from 0.02 to 0.80 and those of RD6 were between 0.01-0.24. Frequencies of plant homozygous for KDML105/RD15 and RD6 detected within each population were 0.02 to 0.80 and 0.02-0.18, respectively. Hybrids between wild rice x crop rice were found within populations at the frequencies 0.04-0.60 for KDML105/RD15 x wild rice and 0.04-0.16 for RD6 x wild rice. Neither SPR1 nor

CNT1, high yielding rice varieties, allele was not found in both wild rice and weedy rice populations.

Finally, population structure was different among all types of wild rice and weedy rice populations. Genetic diversity was found in both within and among wild rice and weedy rice populations. Differentiation among population (F_{ST}) were found in annual (0.59), intermediate (0.44), perennial (0.32) and weedy rice (0.29) populations, respectively. Most of this different population structure of all types resulted from different reproductive and matting systems. Due to the difference of out-crossing rate of wild rice and weedy rice populations, which were found in weedy rice (55%), perennial (52%), intermediate (39%) and annual (26). Gene pool of rice from northeastern Thailand was grouped by using genetic distance from Nei's (1972) and compared with crop rice (KDML105, RD6, RD15, CNT1 and SPR1). These can be separated into 2 main groups, wild rice populations in the first group, and crop and weedy rice populations in the second group. The first main group can be separated into 2 sub groups, perennial and intermediate populations in the first sub group, and annual population in the second sub group. The second main group can be separated into crop rice population and weedy rice population.

From this study, it can be concluded that gene contamination from crop rice into wild rice has already occurred, as has been shown with morphological and physiological characteristics and DNA analysis. Such gene flow may lead to increasing genetic diversity in wild rice populations. On the other hand, it may lead to aggressive spread of the hybrids in wild rice habitats, replacement and extinction of the original wild rice populations. Therefore, introduction of exotic genes, such as herbicide resistance, in new rice varieties showed be considered carefully the effect from gene contamination to prevent the build up of invasive weedy rice and extinction of the original wild rice populations.