

Thesis Title	Genetic Structure of Weedy Rice (<i>Oryza sativa</i> f. <i>spontanea</i>) Populations in Thailand	
Author	Mr. Anupong Wongtamee	
Degree	Doctor of Philosophy (Agronomy)	
Thesis Advisory Committee	Assoc. Prof. Dr. Sansanee Jamjod	Advisor
	Prof. Dr. Benjavan Rerkasem	Co-advisor
	Dr. Chanya Maneechote	Co-advisor

ABSTRACT

Weedy rice (*Oryza sativa* f. *spontanea*) is one of the most serious weed in direct-seeded rice production, adversely affecting rice areas and yield in Thailand. Weedy rice in Thailand originates from interspecific hybridization between common wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) and cultivated rice (*Oryza sativa* L.). Gene flow among wild relatives, companion crop and weedy rice when co-existed in the sympatric habitats is an ongoing process. The resulting hybrids are especially aggressive weedy rice which continues to hybridize with crop rice, resulting in offspring that are well adapted to farmers' management and are particularly difficult to control. The objectives of this study were (1) to evaluate genetic variation of morphological, physiological characters and microsatellite loci of weedy rice populations in Thailand, (2) to determine population genetic structure and dynamics of weedy rice populations in spatial and temporal terms at the regional scale, (3) to

evaluate the patterns of population genetic structure and dynamics in spatial and temporal terms of weedy rice that coexisted with their companion crop rice and native common wild rice in sympatric rice fields, and (4) to demonstrate the affect of gene flow and other ecological conditions influence population genetic structure and evaluate the patterns of population genetic structure and dynamics in spatial and temporal terms of weedy rice that coexisted with their companion crop rice and native dynamics of weedy rice coexisting with their companion crop rice and native common wild rice in sympatric rice fields in Thailand at the rice field scale. This thesis is in two main sets of studies.

The first set of studies involved characterization of sixty-three weedy rice populations collected from three rice production areas; Lower North, Northeast and Central Plain of Thailand, the area of most widespread weedy rice infestation in wet seasons of 2005, 2008 and 2009 and dry season of 2009/10. In each season, fields with heavy infestation by weedy rice were selected. Leaves of 10 weedy rice plants in the same field were collected for DNA analyzed individually. Seed of each population were collected and bulked for the pot experiment. Seeds if each weedy rice population were grown in pot, 10 plants per pot, after year following the sample taking from fields. Ten to 20 plants of each weedy rice populations were grown for investigated in morphological and physiological characteristics. Most weedy rice and pure line cultivated rice varieties were planted from seed, but common wild rice populations were planted by vegetative propagation. Dried leaves samples were kept and analyzed separately for each of the 10 plants per population of weedy rice populations collected from the surveys were used to evaluate DNA analysis. Genetic diversity and population structure of weedy rice populations from three regions was

analyzed separately each growing season and then the four rice growing seasons were analyzed together by using 12 microsatellite markers. Population structure was analyzed by using STRUCTURE program. Cluster analysis was performed by using principal component analysis (PCA) and Neighbor-joining clustering method (NJ method). All analyses were compared with seven cultivated rice varieties popular in each region and seven native common wild rice populations.

The results showed that weedy rice populations in Thailand showed high level of both phenotypic and genotypic variations. In phenotypic variation, weedy rice plants were varied in the range between common wild rice and pure line rice varieties checks in morphological and physiological traits. Grown together in the wet season at Chiang Mai, most weedy rice plants in this study were earlier flowering than both common wild rice and pure line rice varieties, and high degree of seed shattering when matured, in common wild rice traits. Weedy rice in the present study set showed high genetic diversity both within and between populations. The results demonstrated by high levels of genetic diversity ($h = 0.827$ in wet 2005, $h = 0.734$ in wet 2008, $h = 0.720$ in wet 2009 and $h = 0.714$ in dry 2009/10) and genetic differentiation ($F_{ST} = 0.428$ in wet 2005, $F_{ST} = 0.499$ in wet 2008, $F_{ST} = 0.515$ in wet 2009 and $F_{ST} = 0.528$ in dry 2009/10).

The weedy rice populations in the present study were highly structured by its companion crop rice varieties popular in each region with high genetic differentiation. This is clearly reflected by the results from the genetic assignments from the STRUCTURE model, the distribution of weedy rice plants on PCA graph and the grouped weedy rice from the cluster analysis. The results from STRUCTURE model, PCA graph and the cluster analysis showed a relatively close genetic relationship of

weedy rice populations from the Lower North and the Central Plain of Thailand with modern rice varieties (CNT1, SPR1, PTT1 and PSL2) while weedy rice populations from the Northeast showed a relatively close genetic relationship with improved traditional rice varieties (KDML105, RD6 and RD15). The results based on morphological relationship, genetic diversity and population structure among seasons demonstrated that weedy rice populations temporally changed trend toward crop rice over the years. Increasing morphological relationship, increasing population structure based on crop rice with high genetic differentiation and decreasing genetic diversity were found in weedy rice over the years. These dynamics of weedy rice has differentiated among populations and tended to parallel with cultivated rice for high adaptation to the agronomic practices by mimicry to cultivated rice led to the convergence of homogeneity of weedy population toward the crop rice.

The second set of studies, each six weedy rice, companion crop rice and native common wild rice populations were used to evaluate the patterns of population genetic structure and demonstrate gene flow and other ecological conditions influence the population genetic structure and dynamics of weedy rice when coexisted with their companion crop rice and native common wild rice in sympatric rice fields in Thailand at the rice field scale. Weedy-wild-crop rice populations in this study were collected from three rice production areas; Lower North, Northeast and Central Plain of Thailand in growing seasons in wet 2005, 2008 and 2009. Morphological, physiological characteristics, genetic diversity and population structure were carried out as described in previous study.

In all studied fields, the flowering periods of weedy rice and their companion crop rice largely overlapped, providing the opportunity for hybridization. The results

of allele frequency and STRUCTURE demonstrated that allele specific to crop and wild types were found but crop alleles were increased over the years. Crop alleles in weedy rice from each location were different with the varieties of companion crop rice in each region. Interesting, in 2008 and 2009, some alleles of alien crop rice were introduced into weedy rice populations such as in the Northeast found allele specific to SPR1/CNT1 (7-10% in wet seasons of 2008 and 2009) and PTT1/PSL2 (1-3% in wet seasons of 2008 and 2009). This evidence of transfer of weedy rice across regions is probably caused by the modern rice varieties were introduced to plant in the Northeast and/or weedy rice seed were introduced by the combined harvesters and/or moment of rice seed were contaminated by weedy rice seed. Though native common wild rice detected in the sympatric habitat of both weedy rice and crop rice, all native common wild rice plants were mainly late flowering than weedy rice and crop rice. Thus, crop genetic materials were not found in common native wild rice populations in all seasons. Therefore, weedy rice spreading across regions in Thailand is probably caused by the combination of weedy rice seed flow and gene flow between weedy rice and companion of crop rice variety.

This study has shown how morphological and physiological characters and genetics of weedy rice closely resembled the crop rice grown in each region. Gene flow between weedy rice and the associated crop rice is indicated by changes over time of genetic variation and population structure, and made possible by the overlap of flowering time. An adaptive evolution under farmer's management that enhances weediness is suggested by changes in the weedy rice over time, to be ever closer to the local crop rice. This mixing of wild and domesticated rice genes now spreading throughout Thailand's main rice growing regions will have serious implication to both

(a) the country's rice gene pool which is one of the world's most important rice genetic resource *in situ*, and (b) potential traits from introduced genes in the crop rice, including trans-genes.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	โครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรข้าววัชพืช (<i>Oryza sativa</i> f. <i>spontanea</i>) ในประเทศไทย	
ผู้เขียน	นายอนุพงศ์ วงศ์ดำมี	
ปริญญา	วิทยาศาสตร์คหกรรมศาสตร์ (พืชไร่)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร. ศันสนีย์ จำจด	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	ศ.ดร. เบญจวรรณ ฤกษ์เกษม	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ดร. จรรยา มณีโชติ	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

การแพร่ระบาดของข้าววัชพืช (*Oryza sativa* f. *spontanea*) เป็นปัญหาร้ายแรง และทำความเสียหายให้แก่ผลผลิตข้าวในระบบนาหว่านของประเทศไทย ข้าววัชพืชที่พบในประเทศไทยเป็นลูกผสมระหว่างข้าวป่าสามัญ (*Oryza rufipogon* Griff.) และข้าวปลูก (*Oryza sativa* L.) กระบวนการการแลกเปลี่ยนยีนระหว่างข้าวป่าที่เป็นบรรพบุรุษ ข้าวปลูก และข้าววัชพืชที่ขึ้นร่วมกันในนาข้าวเกิดขึ้นอยู่ตลอดเวลา ลูกผสมที่ได้ส่วนใหญ่จะผสมกลับไปยังข้าวปลูกพันธุ์ที่ขึ้นร่วม และส่งผลให้ข้าววัชพืชในชั่วหลังๆ สามารถปรับตัวได้ดีต่อการควบคุมและจัดการของเกษตรกร ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการทดลองนี้เพื่อ (1) ประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมของลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีระวิทยา และความหลากหลายทางพันธุกรรม ของประชากรข้าววัชพืชในประเทศไทย (2) ประเมินโครงสร้างประชากรและพลวัตทั้งในมิติของระยะทางและเวลาของของประชากรข้าววัชพืช เมื่อพิจารณาในภาพรวมระดับภาค (3) ประเมินรูปแบบของโครงสร้างพันธุกรรมประชากร และพลวัตทั้งในมิติของระยะทางและเวลาของประชากรข้าววัชพืชที่ขึ้นร่วมกับข้าวป่า และข้าวปลูกพันธุ์ที่ขึ้นร่วมในประเทศไทย และ (4) แสดงให้เห็นอิทธิพลของการแลกเปลี่ยนยีน และปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อโครงสร้างประชากร และพลวัตของประชากรข้าววัชพืชที่ขึ้นร่วมกับข้าวป่า และข้าวปลูกพันธุ์ที่ขึ้นร่วมในประเทศไทยเมื่อพิจารณาในความสัมพันธ์ในระดับแปลงข้าว โดยแบ่งการศึกษาออกเป็น 2 ชุด

การศึกษาชุดที่ 1 ได้ประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมของลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีระวิทยา ความหลากหลายทางพันธุกรรม และโครงสร้างประชากรของข้าววัชพืชจำนวน 63 ประชากรที่เก็บมาจากแหล่งปลูกข้าวที่สำคัญของประเทศไทยทั้ง 3 ภาค ได้แก่ ภาคเหนือตอนล่าง

และฤดูนาปรังปี 2552/53 เก็บตัวอย่างใบข้าววัชพืชแยกต้นจำนวน 10 ต้น สำหรับการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ และเก็บตัวอย่างเมล็ดข้าววัชพืชสำหรับปลูกทดลองในกระถาง ปลูกข้าววัชพืช 10 ถึง 20 ต้นเพื่อประเมินลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีระวิทยา โดยจะปลูกในปีถัดไปนับจากปีที่เก็บตัวอย่าง ใบข้าววัชพืชที่แห้งแล้วนำมาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม และโครงสร้างประชากรข้าววัชพืช โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล microsatellite marker จำนวน 12 ตำแหน่งวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรข้าววัชพืชแบบแยกวิเคราะห์แต่ละฤดูปลูกและวิเคราะห์ร่วมกันทั้ง 4 ฤดูปลูก โดยใช้โปรแกรม STRUCTURE วิเคราะห์การจัดกลุ่มโดยวิธี Principle component Analysis (PCA) และ NJ method (Neighbor-Joining method) ในทุกการทดลองจะใช้ข้าวปลูกสายพันธุ์บริสุทธิ์ และข้าวป่าสามัญจากแหล่งธรรมชาติ เป็นพันธุ์เปรียบเทียบ

จากผลการทดลองพบว่าประชากรข้าววัชพืชในประเทศไทยมีความแปรปรวนสูง ทั้งในลักษณะภายนอกและลักษณะทางพันธุกรรม ในลักษณะภายนอกข้าววัชพืชมีความหลากหลาย และอยู่ระหว่างลักษณะของข้าวป่าและข้าวปลูกพันธุ์เปรียบเทียบ แต่ต้นข้าววัชพืชส่วนใหญ่ออกดอกเร็วกว่าทั้งข้าวป่าสามัญและข้าวปลูกพันธุ์เปรียบเทียบ และเมล็ดข้าววัชพืชมีอัตราการร่วงสูงเมื่อสุกแก่ซึ่งคล้ายกับลักษณะของข้าวป่า ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรม พบว่าข้าววัชพืชมีความหลากหลายสูงทั้งภายในและระหว่างประชากร โดยมีค่าความหลากหลายภายในประชากร (h) อยู่ระหว่าง 0.714 (ในนาปรัง 2552/53) ถึง 0.827 (ในนาปี 2548) และดัชนีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร (F_{ST}) อยู่ระหว่าง 0.428 (ในนาปี 2548) ถึง 0.528 (ในนาปรัง 2552/53) เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างประชากรของข้าววัชพืชโดยใช้โปรแกรม STRUCTURE และการจัดกลุ่มโดยวิธี PCA และ NJ method พบว่าข้าววัชพืชมีโครงสร้างประชากรและถูกจัดกลุ่มใกล้เคียงกับชนิดของข้าวปลูกพันธุ์ที่นิยมปลูกในแต่ละพื้นที่ โดยประชากรข้าววัชพืชจากภาคเหนือตอนล่างและภาคกลาง จะถูกจัดกลุ่มใกล้กับกลุ่มของข้าวปลูกพันธุ์สมัยใหม่ ได้แก่ พันธุ์ชัยนาท 1 สุพรรณบุรี 1 ปทุมธานี 1 และพิษณุโลก 2 ส่วนประชากรข้าววัชพืชจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือถูกจัดกลุ่มใกล้กับกลุ่มของข้าวปลูกพันธุ์ปรับปรุง ได้แก่ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กข6 และกข15 เมื่อพิจารณาพลวัตของความแปรปรวนทางพันธุกรรม ความหลากหลายทางพันธุกรรม และโครงสร้างประชากรของข้าววัชพืชในแต่ละปี พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าววัชพืชมีแนวโน้มลดลง แต่มีระดับของดัชนีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร และดัชนีการผสมตัวเองเพิ่มขึ้นในปี 2551 และ 2552 ตามลำดับ นอกจากนี้พันธุกรรมของข้าวปลูกที่พบใน STRUCTURE model ของข้าววัชพืช พบในสัดส่วนที่สูงกว่าพันธุกรรมของข้าวป่าและมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นในปี 2551 และ 2552 ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ความหลากหลายและโครงสร้างประชากรของข้าววัชพืชแสดงให้เห็นว่า ข้าววัชพืชมีความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรที่แตกต่างกันในแต่ละ

ภูมิภาคตามชนิดพันธุ์ข้าวปลูก และสามารถเปลี่ยนแปลงให้คล้ายกับข้าวปลูกมากขึ้น และเข้าสู่สภาพ homogeneity ของข้าวปลูก

การศึกษาในชุดที่ 2 ประเมินรูปแบบของโครงสร้างพันธุกรรมประชากร และพลวัตทั้งในมิติของระยะทางและเวลาของประชากรข้าววัชพืชที่ขึ้นร่วมกับข้าวป่า และข้าวปลูกพันธุ์ที่ขึ้นร่วมในประเทศไทย และ แสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของการแลกเปลี่ยนยีน และปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อโครงสร้างประชากร และพลวัตของประชากรข้าววัชพืชที่ขึ้นร่วมกับข้าวป่า และข้าวปลูกพันธุ์ที่ขึ้นร่วมในประเทศไทยเมื่อพิจารณาในความสัมพันธ์ในระดับแปลงข้าว โดยใช้ข้าววัชพืชที่ขึ้นร่วมกับข้าวป่าและข้าวปลูกพันธุ์ที่ขึ้นร่วม ชนิดละ 6 ประชากร ที่เก็บจาก แหล่งผลิตข้าว 3 แหล่งได้แก่ ภาคเหนือตอนล่าง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง ในฤดูการทำนาปีของปี 2548 ปี 2551 และปี 2552 ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรม และโครงสร้างประชากรเหมือนกับการทดลองชุดที่ 1

พบว่าต้นข้าววัชพืชส่วนใหญ่จากทุกแปลงที่ศึกษามีช่วงเวลาออกดอกที่คาบเกี่ยวกับข้าวปลูกพันธุ์ที่ขึ้นร่วม ซึ่งช่วยเพิ่มโอกาสในการผสมพันธุ์ระหว่างข้าวทั้งสองชนิด เมื่อวิเคราะห์ความถี่อัลลีลและ STRUCTURE model แสดงให้เห็นว่า ในประชากรข้าววัชพืชพบอัลลีลที่เฉพาะต่อทั้งข้าวปลูกและข้าวป่า และพบเพิ่มมากขึ้นในปีหลังๆ ซึ่งอัลลีลที่เฉพาะต่อข้าวปลูกในประชากรข้าววัชพืชมีความแตกต่างกันตามพันธุ์ของข้าวปลูกที่นิยมปลูกในแต่ละภูมิภาค ในประชากรข้าววัชพืชจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือในปี 2551 และ 2552 พบอัลลีลที่เฉพาะต่อข้าวปลูกพันธุ์สมัยใหม่ซึ่งนิยมปลูกในภาคเหนือตอนล่างและภาคกลาง โดยพบอัลลีลที่เฉพาะต่อข้าวปลูกพันธุ์ SPR1/CNT1 จำนวน 7-10% และพบอัลลีลที่เฉพาะต่อข้าวปลูกพันธุ์ PTT1/PSL2 จำนวน 1- 3% ตามลำดับ ซึ่งอาจจะเกิดจากการนำพันธุ์สมัยใหม่เหล่านี้ไปปลูกในภาคตะวันออกเฉียงเหนือช่วงฤดูแล้ง และ/หรือ เมล็ดข้าววัชพืชแพร่กระจายโดยติดมากับรถเกี่ยวข้าว และ/หรือ ปนมากับเมล็ดพันธุ์ที่ใช้ปลูกในฤดูถัดไป แม้ว่าข้าวป่าสามัญจะพบอาศัยอยู่ร่วมกับทั้งข้าววัชพืชและข้าวปลูก แต่ข้าวป่าสามัญมีช่วงเวลาออกดอกที่ช้ากว่าทั้งข้าววัชพืชและข้าวปลูก ทำให้ไม่พบอัลลีลของข้าวปลูกในประชากรข้าววัชพืช ดังนั้นการแพร่กระจายของข้าววัชพืชไปยังภูมิภาคอื่นจึงเกิดจากทั้งการแพร่กระจายของเมล็ดข้าววัชพืช และการแลกเปลี่ยนยีนระหว่างข้าววัชพืชและข้าวปลูกในท้องถิ่น

จากการศึกษานี้แสดงสรุปได้ว่าข้าววัชพืชปรับตัวให้คล้ายกับข้าวปลูกพันธุ์ที่ขึ้นร่วมในแต่ละภูมิภาค ทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีระวิทยา และทางพันธุกรรม การเปลี่ยนแปลงระดับของความแปรปรวนทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากร เกิดจากกระบวนการการแลกเปลี่ยนยีนระหว่างข้าววัชพืชและข้าวปลูกพันธุ์ที่ขึ้นร่วม เนื่องจากข้าวทั้งสองชนิดมีช่วงเวลาการออกดอกที่คาบเกี่ยวกัน ซึ่งการเลียนแบบข้าวปลูกของข้าววัชพืชเป็นวิวัฒนาการการปรับตัวของข้าววัชพืช

ภายใต้การจัดการของเกษตรกร โดยจะกลายเป็นพืชที่ร้ายแรง ปัญหาการปนเปื้อนระหว่าง พันธุ์กรรมของข้าวป่าและข้าวปลูกที่แพร่ระบาดไปทุกพื้นที่ของประเทศไทยเป็นสิ่งที่ควรกังวลและ ระวังคือ (1) ประเทศไทยมีฐานพันธุ์กรรมของข้าวที่สำคัญแห่งหนึ่งของโลก ดังนั้นจึงควรอนุรักษ์ แหล่งพันธุ์กรรมนี้ไว้ในสภาพธรรมชาติ (*in situ*) และ (2) ควรระวังและจัดระเบียบวิธีการการชักนำ ยีนเข้าไปในข้าวปลูกอย่างเหมาะสม โดยเฉพาะยีนจากข้าวตัดแต่งพันธุ์กรรม



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved