

<b>Thesis Title</b>	Genetic Diversity of Common Wild Rice in Cambodia	
<b>Author</b>	Mr. Leng Layhuot	
<b>Degree</b>	Master of Science (Agriculture) Agronomy	
<b>Thesis Advisory Committee</b>	Assoc. Prof. Dr. Sansanee Jamjod	Chairperson
	Prof. Dr. Benjavan Rerkasem	Member

### ABSTRACT

Common wild rice (*O. rufipogon* Griff.) is considered to be a good source for breeding materials and essential genes for rice improvement. In addition, hybridization between cultivated rice and common wild rice are an important process reflecting the occurrence of current gene flow and provide the different characters in the hybrid populations. Therefore, the aims of this study were to assess genetic structure of common wild rice populations in Cambodia and to characterize F<sub>2</sub> populations between the wild rice and Cambodian cultivated rice. This study consisted of field survey and field experiments.

The field survey was conducted in the central part of Cambodia covering four regions, Phnom Penh, Kandal, Takeo and Prey Veng in October 16-25, 2007. Populations were geo-referenced and recorded for habitat conditions and some morphological characters. From the survey, common wild rice populations were found scattered in abandoned fields, edge of the rice field, canal or road-side ditches.

Most of them were at anthesis. Ten populations were collected from Phnom Penh (3) Kandal (1), Takeo (2), and Prey Veng (4). They were classified into perennial (4), annual (3) and intermediate (3) types. All plants showed characteristics of wild rice type such as open plant type, long awn, purple stigma, and black hull. However, most of them exhibited small anthers with only two perennial populations had large anthers and three plants had white stigma. Mixtures of plants with red awn and plants with white awn were found in four populations.

Leaf samples from each population of the common wild rice (10 plants per population) were collected. In addition, leaf samples of 7 Cambodian cultivated rice varieties (5 plants per variety) were collected from Phnom Penh (3 varieties), Takeo (2 varieties), and Prey Veng (2 varieties). DNA of individual plants was extracted and analyzed for genetic diversity and population structure by using five microsatellite markers. High level of genetic diversity of common wild rice was revealed by high average gene diversity ( $H_S=0.48$ ) and total gene diversity ( $H_T=0.76$ ). The highest total gene diversity within province was found in Prey Veng (0.70) followed by Phnom Penh plus Kandal (0.68) while Takeo was the lowest (0.51).

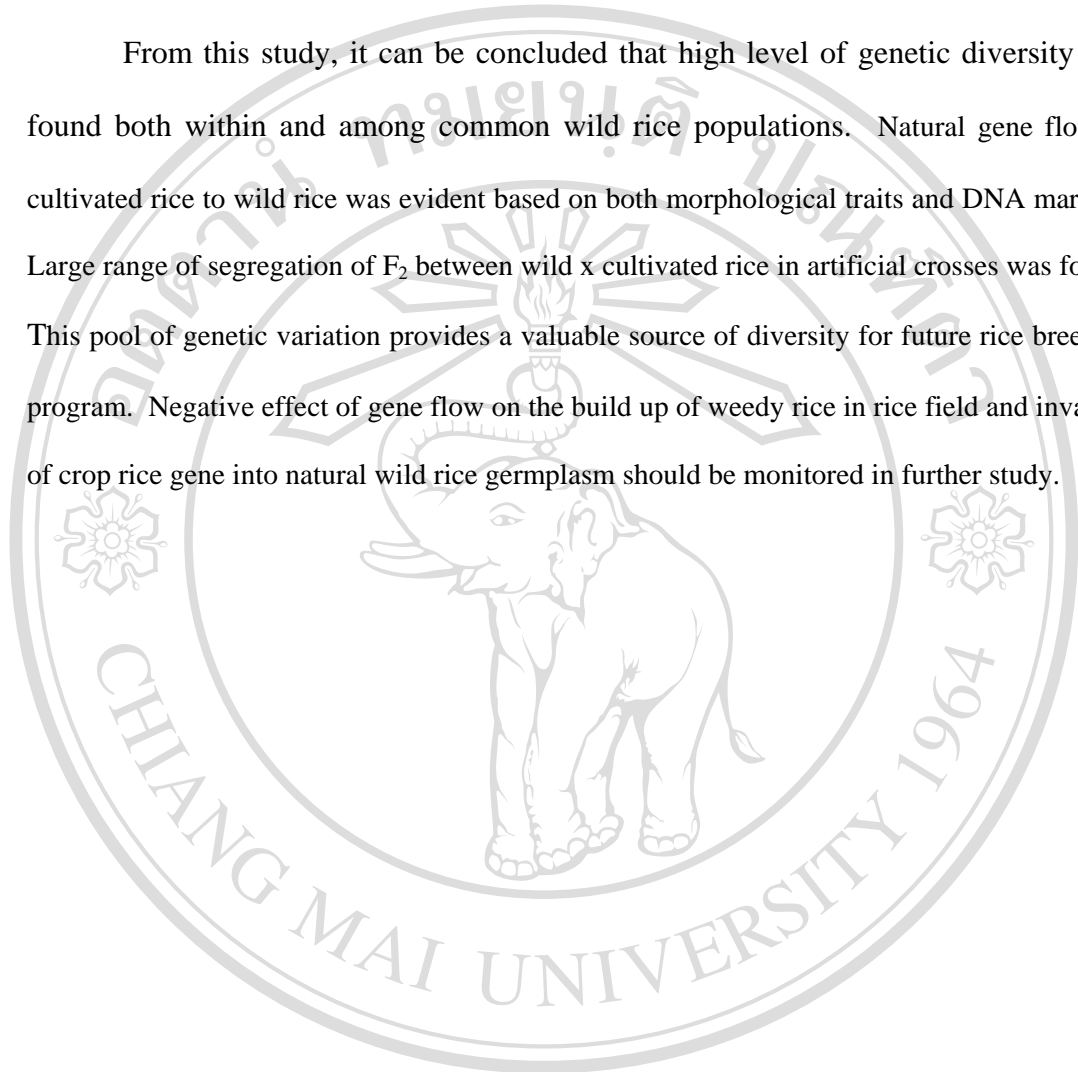
While in individual populations, genetic diversity varied from 0.20 in one population from Takeo to 0.66 in one population from Prey Veng. Genetic differentiation among populations was 0.39, indicated that most genetic variation was among individuals within population for 61% and rest 39% was among populations. These ten common wild rice populations were grouped into two major clusters. The first cluster consisted of most populations from Prey Veng province whereas the others included all populations from Phnom Penh, Kandal and Takeo provinces. Analysis of population structure of the ten wild rice populations together with seven cultivated

rice varieties was performed using STRUCTURE program. Wild and cultivated rice were split into different clusters ( $K=2$ ). Gene flow between wild rice and cultivated rice was detected in some wild rice plants, ranging from 1 to 7 in 10 plants in eight populations, containing 1-5% of cultivated rice genetic trace. No wild rice membership was found in all cultivated rice. This suggests that the direction of the gene flow was from cultivated rice to wild populations. In addition, mating system of these common wild rice was partly outcrossing while cultivated rice was complete inbreeding.

A field experiment was conducted at the Agronomy Division, Department of Plant Science and Natural Resources, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University. Two  $F_2$  populations were derived from crosses between two improved rice varieties, Sen Pdao (SPD) and IR66 as female parents and two common wild rice populations, collected from Takeo (TKWR) and Kompong Thom (KTWR) as male parents (SPD x TKWR and IR66 x KTWR). Seeds of  $F_2$  and parents of each population were grown in pots and evaluated for genetic segregation in morphological and physiological characters. Morphological characters of  $F_2$  populations such as plant type, leaf sheath color, stigma color, apiculus color, awn, awn color, and pericarp color were controlled by few major genes (1-3 genes) with complete dominant or complementary gene actions.  $F_2$  plants segregated within the range of cultivated and wild rice parents in number of tillers per plant, days to flowering, seed length, and seed shape. Transgressive segregations were found in plant height, panicle length, number of branches per panicle, number of spikelets per panicle, and seed fertility. The difference of segregating patterns between crosses was found in seed shattering. Most of the offspring obtained from the cross of wild rice from Takeo province shattered

their seed almost completely while most of the offspring obtained from the cross of wild rice from Kampong Thom province did not shatter all their seed.

From this study, it can be concluded that high level of genetic diversity was found both within and among common wild rice populations. Natural gene flow of cultivated rice to wild rice was evident based on both morphological traits and DNA markers. Large range of segregation of  $F_2$  between wild x cultivated rice in artificial crosses was found. This pool of genetic variation provides a valuable source of diversity for future rice breeding program. Negative effect of gene flow on the build up of weedy rice in rice field and invasion of crop rice gene into natural wild rice germplasm should be monitored in further study.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวป่าสามัญใน

ประเทศกัมพูชา

ผู้เขียน

นาย เลง ลายสูต

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) พีชไร์

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. ศันสนีย์ จำจด

ประธานกรรมการ

ศ. ดร. เบลูจวรรณ ฤกษ์เกษม

กรรมการ

บทคัดย่อ

ข้าวป่าสามัญ (common wild rice, *Oryza rufipogon* Griff.) เป็นแหล่งพันธุกรรมของยีนที่สำคัญในงานปรับปรุงพันธุ์ข้าว อีกทั้งการผสมข้ามระหว่างข้าวปลูกและข้าวป่าเป็นกระบวนการสำคัญที่แสดงถึงการแลกเปลี่ยนยีนและทำให้เกิดลักษณะที่แตกต่างกันในประชากรลูกผสม ดังนั้น การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรข้าวป่าและลักษณะ

ประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 ระหว่างข้าวปลูกและข้าวป่า การศึกษาประกอบด้วย การสำรวจในพื้นที่ และทดลองในแปลงทดสอบ

การสำรวจข้าวป่าในพื้นที่ภาคกลางของประเทศกัมพูชาครอบคลุมพื้นที่ 4 แห่ง คือ Phnom Penh Kandal Takeo และ Prey Veng ในช่วงระหว่างเดือนพฤศจิกายนถึงธันวาคม 2007 ประชากรที่พบได้บันทึก ลักษณะและพิกัดภูมิประเทศ สภาพที่อยู่อาศัย และลักษณะทางสัณฐานบางประการ จากการสำรวจพบประชากรข้าวป่าขึ้นกระจายอยู่ทั่วไปทั้งในแปลงนาร้าง ขอบแปลงข้าวปลูก คลองหรือน้ำข้างถนน โดยข้าวป่าเกือบทั้งหมดจะอยู่ในระยะผสมเกสร (anthesis) ได้เก็บตัวอย่าง

ประชากรข้าวป่าจำนวน 10 ประชากร ประกอบด้วย Phnom Penh 3 ประชากร Kandal 1 ประชากร Tekeo 2 ประชากร และ Prey Veng 4 ประชากร จำแนกเป็นข้าวป่าชนิดข้ามปี จำนวน 4 ประชากร ข้าวป่าชนิดปีเดียว จำนวน 3 ประชากร และข้าวป่าชนิดกึ่งกลางระหว่างชนิดปีเดียวและชนิดข้ามปี (intermediate) จำนวน 3 ประชากร ทุกต้นแสดงลักษณะของข้าวป่า เช่น ทรงกอแผ่ หางยาว สียอด เกสรตัวเมียสีม่วง และเปลือกเมล็ดสีดำ อย่างไรก็ตามข้าวป่าส่วนใหญ่มีเกสรตัวผู้ขนาดเล็ก ยกเว้น ข้าวป่าชนิดข้ามปี 2 ประชากรที่พบว่ามีเกสรตัวผู้ขนาดใหญ่ และข้าวป่า 3 ต้นมีเกสรตัวเมียเป็นสีขาว พบประชากรข้าวป่าที่มีหางสีแดงและขาวจำนวน 4 ประชากร

เก็บตัวอย่างใบของข้าวป่าแต่ละประชากร จำนวน 10 ต้นต่อประชากร และข้าวปลูก 7 พันธุ์ จำนวน 5 ต้นต่อพันธุ์ โดยข้าวปลูกนั้นเก็บตัวอย่างจาก Phnom Penh จำนวน 3 พันธุ์ Takeo จำนวน 2 พันธุ์ และ Prey Veng จำนวน 2 พันธุ์ นำตัวอย่างใบข้าวมาสกัด DNA แบบแยกต้น และวิเคราะห์หาความหลากหลายทางพันธุกรรม และโครงสร้างของประชากร โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล microsatellite จำนวน 5 ตำแหน่ง

พบว่าข้าวป่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับสูง โดยมีค่าความหลากหลายเฉลี่ย (average gene diversity,  $H_s$ ) เท่ากับ 0.48 และค่าความหลากหลายรวม (total gene diversity,  $H_t$ )

เท่ากับ 0.76 จังหวัดที่มีค่าความหลากหลายรวมภายในจังหวัดสูงที่สุดคือ Prey Veng (0.70) รองลงมาคือ Phnom Penh และ Kandal (0.68) และน้อยที่สุดใน Takeo (0.51) ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในแต่ละประชากร (Nei's gene diversity,  $h$ ) มีค่าอยู่ระหว่าง 0.20 ใน TK1 ถึง 0.66 ใน PV2 ค่าความแตกต่างระหว่างประชากร (genetic differentiation,  $F_{ST}$ ) มีค่าเท่ากับ 0.39 แสดงว่า

ความหลากหลายส่วนใหญ่เป็นผลมาจากความหลากหลายที่เกิดขึ้นระหว่างต้นภายในประชากรถึง 61 % และที่เหลืออีก 39 % เป็นความหลากหลายระหว่างประชากร ข้าวป่าทั้ง 10 ประชากรจัดกลุ่ม



ได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกประกอบด้วยประชากรข้าวป่าจากจังหวัด Prey Veng ส่วนกลุ่มที่สองประกอบด้วยประชากรจากจังหวัด Phnom Penh Kandal และ Takeo การวิเคราะห์โครงสร้างของประชากรข้าวป่าและข้าวปลูกร่วมกันโดยใช้โปรแกรม STRUCTURE นั้น พบว่าข้าวป่าและข้าวปลูกแยกกลุ่มจากกัน ( $K=2$ ) พบการแลกเปลี่ยนยีนระหว่างข้าวป่าและข้าวปลูกในประชากรข้าวป่าจำนวน 8 ประชากรๆละ 1-7 ต้น โดยมีสัดส่วนพันธุกรรมของข้าวปลูกอยู่ประมาณ 1-5% ไม่พบว่ามีพันธุกรรมของข้าวป่าปนอยู่ในข้าวปลูก แสดงให้เห็นว่าทิศทางของการแลกเปลี่ยนยีนนั้นเกิดจากข้าวปลูกไปยังข้าวป่า นอกจากนี้ระบบการผสมพันธุ์ของข้าวป่าเป็นแบบผสมข้ามบางส่วนในขณะที่ข้าวปลูกเป็นแบบผสมตัวเอง

การทดลองในแปลงทดสอบ ที่สาขาพืชไร่ ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ นั้น ประชากรข้าวที่ใช้ศึกษาเป็นประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 ที่ได้จากการผสมข้ามระหว่างข้าวพันธุ์สมัยใหม่ 2 พันธุ์ คือ Sen Pidao (SPD) และ IR66 เป็นต้นแม่ และข้าวป่า 2 ประชากร ที่เก็บจาก Takeo (TKWR) และ Kompong Thom (KTWR) เป็นต้นพ่อ (SPD x TKWR และ IR66 x KTWR) จำนวน 2 ประชากร โดยนำมาตัดประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 และพ่อแม่ปลูกทดสอบในกระถางและประเมินการกระจายตัวของลักษณะทางสัณฐานและสรีระ พบว่า

ลักษณะทางสัณฐานของลูกผสมชั่วที่ 2 ได้แก่ทรงกอ สีกาบใบ สียอดเกสรตัวเมีย สียอดเมล็ด การมีหาง สีหางและสีเปลือกเชื้อหุ้มเมล็ดถูกควบคุมด้วยยีนจำนวนน้อยคู่ (1-3 ยีน) และมีการแสดงออกของยีนเป็นแบบ completed dominant หรือ complementary gene action พบลักษณะจำนวนหน่อต่อต้น จำนวนวันออกรวง ความยาวเมล็ดและรูปร่างเมล็ดของลูกผสมชั่วที่ 2 กระจายตัวอยู่ในช่วงของข้าวปลูกและข้าวป่าที่เป็นพ่อและแม่ ส่วนลักษณะที่มีการกระจายตัวนอกเหนือขอบเขตของพ่อแม่ (transgressive segregation) ได้แก่ความสูง ความยาวรวง จำนวนระแงะและจำนวนดอกต่อรวง และ

เปอร์เซ็นต์เมล็ดดี นอกจากนี้ยังพบความแตกต่างของรูปแบบการกระจายตัวระหว่างกลุ่มผสมในลักษณะการร่วงของเมล็ด ลูกผสมที่ได้จากกลุ่มผสมของข้าวป่าจากจังหวัด Takeo ส่วนใหญ่เมล็ดร่วงทั้งหมด ขณะที่ลูกผสมที่ได้จากกลุ่มผสมของข้าวป่าจากจังหวัด Kampong Thom ส่วนใหญ่เมล็ดไม่ร่วงทั้งหมด

จากการศึกษานี้ สรุปได้ว่าพบความหลากหลายทั้งภายในและระหว่างประชากรข้าวป่า พบหลักฐานการแลกเปลี่ยนยีนระหว่างข้าวปลูกและข้าวป่าในธรรมชาติจากการตรวจสอบโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานและเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) พบการกระจายตัวในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 ที่สร้างขึ้นจากการผสมข้ามระหว่างข้าวป่าและข้าวปลูก ซึ่งความแปรปรวนทางพันธุกรรมนั้นสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สำคัญสำหรับโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวในอนาคตต่อไป ส่วนผลกระทบทางด้านลบของการแลกเปลี่ยนยีนคือก่อให้เกิดข้าววัชพืช (weedy rice) ในนาข้าวและการบุกรุกของยีนข้าวปลูกเข้าสู่ประชากรข้าวป่าในธรรมชาติ ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับการแลกเปลี่ยนยีนยังควรเฝ้าติดตามต่อไปในอนาคต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved