

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรข้าวป่าสามัญ จากพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทย

Genetic Diversity of Common Wild Rice Collected from Various Regions of Thailand

อดิเรก ปัญญาลือ^{1/} เบญจวรรณ ฤกษ์เกษม^{1/} และศันสนีย์ จำจด^{1/}
Adirek Punyalue^{1/}, Benjavan Rerkasem^{1/} and Sansanee Jamjod^{1/}

Abstract: Common wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) was found in Thailand and reported to be the ancestor of cultivated rice. It is an important genetic resource for rice breeding programs. This study was conducted to evaluate genetic structure within and among populations of common wild rice from different regions of Thailand. Thirteen common wild rice populations were collected from natural habitats and near rice fields. Samples were grown in a pot experiment, 20 plants per populations at Agronomy Department, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University. Leaf samples were collected individually for DNA analysis using 5 microsatellite markers. The results showed that gene diversity (h) of populations ranged from 0.036 to 0.181 (average 0.125), percent polymorphic loci (%p) from 10.34 to 72.41% (average 42.48%), Shannon index (I) from 0.054 to 0.289 (average 0.194). The highest genetic diversity within population was observed in population from Nakhonnayok province (NY1) ($h = 0.181$, %P = 72.41) and the lowest was observe in population from Wangjao, Tak province (TAK2) ($h = 0.036$, %P = 10.34). However, very high genetic differentiation among populations was found ($G_{ST} = 0.449$), suggesting that conservation of one or a few populations could not represent for all populations. Thus, *in situ* conservation should be practiced individually in each location.

Keyword: common wild rice, *in situ*, genetic structure

^{1/} ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

^{1/} Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand 50200

บทคัดย่อ: ในประเทศไทยมีข้าวป่าสามัญ (common wild rice) ชนิดที่เป็นบรรพบุรุษของข้าวปลูกได้แก่ *Oryza rufipogon* Griff. ซึ่งเป็นแหล่งพันธุกรรมสำคัญในงานปรับปรุงพันธุ์ข้าว การศึกษานี้จึงได้ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมทั้งภายในและระหว่างประชากรข้าวป่าสามัญ (*O. rufipogon*) จำนวน 13 ประชากร เก็บมาจากสภาพธรรมชาติ และตามบริเวณขอบแปลงข้าวปลูก นำมาปลูกในกระถาง ที่ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เก็บตัวอย่างใบมาวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ *microsatellite markers* 5 ตำแหน่ง ผลการทดลองพบความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรแต่ละประชากรโดยมีค่า *gene diversity* (*h*) ตั้งแต่ 0.036 – 0.181 ค่าเฉลี่ย 0.125 มีค่า % polymorphic loci (%P) ระหว่าง 10.34 – 72.41% มีค่าเฉลี่ย 42.48% ค่าดัชนีความหลากหลาย Shannon index (*I*) ระหว่าง 0.054 – 0.289 มีค่าเฉลี่ย 0.194 นอกจากนี้ยังพบว่าประชากรจาก จังหวัดนครนายก (NY1) มีความหลากหลายภายในประชากรสูงที่สุด (*h* = 0.181, %P = 72.41) และประชากรจากอำเภอลำทะเมนชัย จังหวัดนครราชสีมา มีความหลากหลายภายในประชากรต่ำที่สุด (TAK2) (*h* = 0.036, %P = 10.34) สำหรับความหลากหลายระหว่างประชากรพบว่าตัวอย่างข้าวป่าที่ศึกษาทั้งหมดมีค่าความแตกต่างระหว่างประชากรสูงถึง 44.9% ของความแตกต่างทางพันธุกรรมทั้งหมด ($G_{ST} = 0.449$) จากผลการทดลองชี้ว่าประชากรข้าวป่าจากแหล่งต่าง ๆ มีความหลากหลายระหว่างประชากรสูง การอนุรักษ์เพียงประชากรใดประชากรหนึ่งไม่สามารถเป็นตัวแทนของข้าวป่าทั้งหมดได้ จึงควรจะมีการอนุรักษ์ไว้ในสภาพธรรมชาติ (*in situ*) โดยแยกอนุรักษ์แต่ละประชากรไว้ในแต่ละท้องถิ่น

คำสำคัญ: ข้าวป่าสามัญ, *in situ*, โครงสร้างทางพันธุกรรม

คำนำ

ข้าวป่า (wild rice) ชนิดที่เป็นบรรพบุรุษของข้าวปลูกเอเชีย (*Oryza sativa* L.) ได้แก่ ข้าวป่าสามัญ (common wild rice, *O. rufipogon*) มี genome เป็นแบบ AA เหมือนกับข้าวปลูกและสามารถผสมพันธุ์กับข้าวปลูกได้เป็นปกติ (Oka, 1988) นอกจากข้าวป่าจะเป็นบรรพบุรุษของข้าวปลูกแล้ว ข้าวป่ายังใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมที่เป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าว เช่น บางประชากรทนต่อการเข้าทำลายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (Brown planthopper; BPH) ต้านทานต่อการเข้าทำลายของโรคไหม้ และต้านทานต่อการเข้าทำลายของไวรัสชนิด RGSV (Rice grassy stunt virus) นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งพันธุกรรมในการปรับปรุงข้าวทนต่อดินเค็ม (Gregorio *et al.*, 2002) ข้าวป่าสามัญเดิมพบแพร่กระจายทั่วทุกภาคของประเทศไทย ปัจจุบันมีแนวโน้มที่จะเกิดการสูญหายของแหล่งพันธุกรรมของข้าวป่าเนื่องจากแหล่งอาศัย (habitat) มีลดน้อยลง (Chitrakon,

1995) ดังนั้น การสำรวจศึกษาลักษณะประจำพันธุ์และขอบเขตความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวป่าที่เป็นบรรพบุรุษของข้าวปลูกจะเป็นประโยชน์ทั้งเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำแหล่งพันธุกรรมไปใช้ประโยชน์ในงานปรับปรุงพันธุ์ข้าว และเป็นแนวทางในการอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรม ในการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้านไมโครแซเทลไลต์ภายในและระหว่างประชากรของข้าวป่าสามัญ

อุปกรณ์และวิธีการ

เก็บรวบรวมข้าวป่าสามัญจากสภาพธรรมชาติ และรอบแปลงนาข้าวจำนวน 13 ประชากร ในเขตภาคเหนือตอนบน ภาคเหนือตอนล่าง ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ประกอบด้วย

ภาคเหนือ ได้แก่ ประชากรจากจังหวัดเชียงใหม่ (CM), ประชากรจากบ้านป่าขาม อำเภอเมือง จังหวัดลำพูน (LP1), ประชากรจากตำบลตันธง อำเภอเมือง จังหวัด

ลำพูน (LP2), ประชากรจากอำเภอบพพระ จังหวัดตาก (TAK1), ประชากรจากอำเภอวังเจ้า จังหวัดตาก (TAK2), ประชากรจากบึงทุ่งหงษ์ จังหวัดพิษณุโลก (PSL1), ประชากรจากบึงราชนก จังหวัดพิษณุโลก (PSL2), ประชากรจากจังหวัดสุโขทัย (ST) และประชากรจากจังหวัดพิจิตร (PC)

ภาคกลาง ได้แก่ ประชากรจากจังหวัดชัยนาท (CNT), ประชากรจากอำเภอดงละคร จังหวัดนครนายก (NY1), ประชากรจากช้างแปลงเกษตรกร อำเภอดงละคร จังหวัดนครนายก (NFNY) และใช้ข้าวปลูก 2 พันธุ์เป็นพันธุ์เปรียบเทียบได้แก่ สุพรรณบุรี 1 (SPR1) ข้าวดอกมะลิ 105 (KDML105)

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ ประชากรจากจังหวัดสกลนคร (SK)

ปลูกประชากรข้าวป่าในกระถาง กระถางละ 1 ต้น ประชากรละ 20 ต้น เก็บตัวอย่างใบข้าวแต่ละต้น สกัด DNA และนำ DNA ที่สกัดได้มาทำการเพิ่มขยายปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR (Polymerase Chain Reaction) โดยเทคนิค microsatellite markers โดยใช้ primer RM1 RM22, RM164, RM211 และ RM212 ภายใต้เงื่อนไข คือ 94 °C นาน 4 นาที 1 รอบ ตามด้วย 94 °C 30 วินาที, 55 °C 30 วินาที และ 72 °C 45 วินาที จำนวน 40 รอบ และ 72 °C 10 นาที 1 รอบ

นำผลผลิตที่ได้ออกจากการทำ PCR ไปตรวจสอบด้วย 10% polyacrylamide gel electrophoresis ย้อมเจลที่ได้ด้วย ethidium bromide 5 μ I/TBE buffer 100 ml เพื่อนำไปดูการเกิดลายพิมพ์ DNA ภายใต้แสงยูวีของเครื่อง UV transilluminator แล้วบันทึกภาพด้วยกล้องโพลาไรซ์เพื่อไปวิเคราะห์ข้อมูลต่อไป

ประเมินค่า genetic parameter ได้แก่ gene diversity (h), Shannon index (I), % polymorphic loci (%P), genetic differentiation (G_{ST}) วิเคราะห์หาระยะห่างระหว่างพันธุกรรม และความสัมพันธ์ระหว่างประชากร (dendrogram) ใช้ โปรแกรม Popgen V 3.2 (Yeh *et al.*, 1997) และ MEGA 2 (Kumar *et al.*, 2001)

ผลการทดลองและวิจารณ์

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรข้าวป่า

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรโดยวิธี microsatellite markers จำนวน 5 ตำแหน่ง พบว่าประชากรข้าวป่ามีค่า gene diversity หรือ heterozygosity ระหว่าง 0.036 ถึง 0.181 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.125 มีค่า Shannon index ระหว่าง 0.054 ถึง 0.289 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.194 และมีค่า % polymorphic loci ระหว่าง 10.34% ถึง 72.41% ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 42.83% (ตารางที่ 1) โดยประชากรข้าวป่าที่เก็บมาจากอำเภอดงละคร จังหวัดนครนายก (NY1) มีความหลากหลายภายในประชากรสูงที่สุด ($h = 0.181$, $I = 0.289$ และ $\%P = 72.41$) และประชากรจากอำเภอวังเจ้า จังหวัดตาก (TAK2) มีความหลากหลายภายในประชากรน้อยที่สุด ($h = 0.036$, $I = 0.054$ และ $\%P = 10.34$)

เมื่อพิจารณาความหลากหลายระหว่างประชากรของข้าวป่าสามัญจากทุกพื้นที่ พบว่า มีค่า genetic differentiation (G_{ST}) เท่ากับ 0.449 (ตารางที่ 1) แสดงว่าความแปรผันทางพันธุกรรมทั้งหมดที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากความหลากหลายระหว่างประชากร 44.9% และความหลากหลายภายในประชากร 54.9%

ในการศึกษาความสัมพันธ์ระดับโมเลกุลระหว่างประชากร พบว่าประชากรข้าวป่าทั้ง 13 ประชากรสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มที่ระยะห่างระหว่างพันธุกรรมเท่ากับ 0.08 (ภาพที่ 1) กลุ่มแรกได้แก่ประชากรข้าวป่าที่เก็บมาจากจังหวัดเชียงใหม่ ตำบลป้าขาม จังหวัดลำพูน จังหวัดสกลนคร อำเภอบพพระ จังหวัดตาก บึงทุ่งหงษ์ จังหวัดพิษณุโลก และยังมีข้าวป่าในเขตภาคกลางที่เก็บมาจากจังหวัดชัยนาท และเก็บมาจากขอบแปลงข้าวในจังหวัดนครนายก กลุ่มที่ 2 ได้แก่ประชากรที่เก็บมาจากตำบลต้นธง จังหวัดลำพูน อำเภอวังเจ้า จังหวัดตาก บึงราชนก จังหวัดพิษณุโลก จังหวัดพิจิตร และประชากรจากจังหวัดสุโขทัย นอกจากนี้ยังสามารถแยกประชากรข้าวป่า ออกจากข้าวปลูกได้อย่างชัดเจนที่ระยะห่างระหว่างพันธุกรรมเท่ากับ 0.13

งานทดลองนี้พบว่าข้าวป่าสามัญในประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมทั้งภายในและระหว่างประชากรสูง เช่นเดียวกับการศึกษาในลักษณะทางสัณฐานวิทยา ที่พบความหลากหลายทั้งภายในประชากรและระหว่างประชากรเช่นกัน (อติเรก และคณะ, 2548) จากผลการทดลองชี้ว่าประชากรข้าวป่าจากแหล่งต่าง ๆ มีความหลากหลายระหว่างประชากรสูง การอนุรักษ์เพียง

ประชากรใดประชากรหนึ่งไม่สามารถเป็นตัวแทนของข้าวป่าทั้งหมดได้ จึงควรจะมีการอนุรักษ์ไว้ในสภาพธรรมชาติ (*in situ*) โดยแยกอนุรักษ์แต่ละประชากรไว้ในแต่ละท้องถิ่น สำหรับการอนุรักษ์นอกสภาพธรรมชาติ (*ex situ*) นั้น เนื่องจากประชากรยังมีความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากร การเก็บตัวอย่างควรให้มีประชากรขนาดใหญ่เพื่อป้องกันการเกิด genetic drift

Table 1 Genetic parameters of 13 populations of common wild rice (*Oryza rufipogon*) collected from different regions in Thailand.

Pop.	Location	Genetic parameters		
		h	I	%P
1	Chiang Mai (CM)	0.129	0.202	44.83
2	Lamphun (LP1)	0.101	0.155	32.76
3	Lamphun (LP2)	0.076	0.113	20.69
4	Tak (TAK1)	0.116	0.178	36.21
5	Tak (TAK2)	0.036	0.054	10.34
6	Phitsanulok (PSL1)	0.154	0.244	58.62
7	Phitsanulok (PSL2)	0.116	0.173	32.76
8	Sukhothai (ST)	0.097	0.151	34.48
9	Phichit (PC)	0.138	0.219	53.45
10	Chainat (CNT)	0.178	0.278	60.34
11	Nakhonnayok (NY1)	0.181	0.289	72.41
12	Near rice field Nakhonnayok (NFFNY)	0.169	0.262	56.9
13	Sakhon Nakhon (SN)	0.166	0.257	53.45
mean		0.125	0.194	42.838
total		0.23	0.369	98.28

h = Gene diversity, I = Shannon index, %P = Percent polymorphic loci

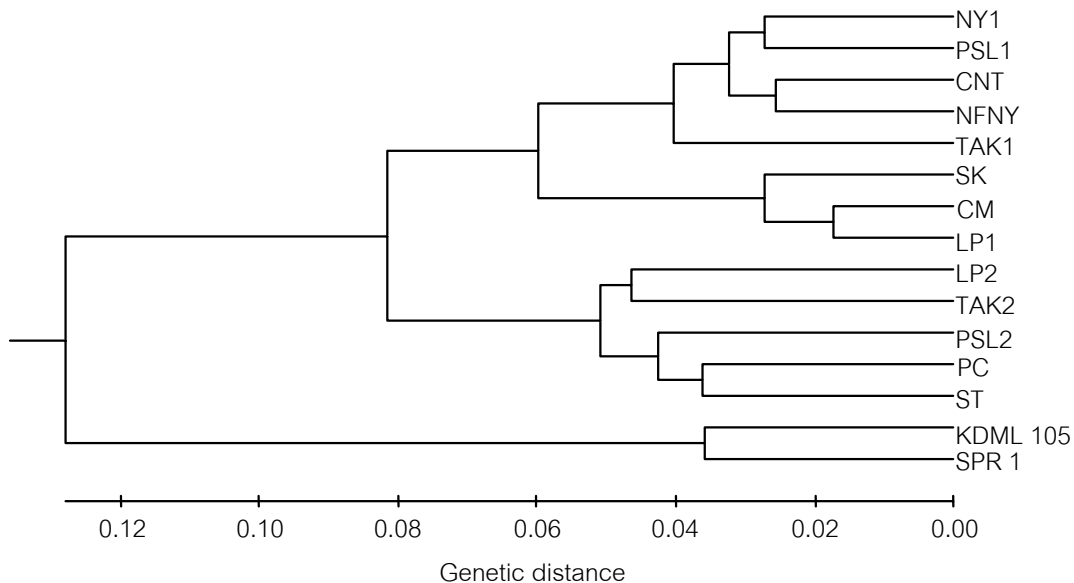


Figure 1 UPGMA dendrogram based on Nei's distance showing genetic relationships among 13 populations of common wild rice.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก McKnight Foundation และ USAID และได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และขอขอบคุณ คุณต๋อนภา ผุสดี ที่ให้ข้อแนะนำในการวิเคราะห์ข้อมูลทางดีเอ็นเอ

เอกสารอ้างอิง

อติเรก ปัญญาธิอ เบญจวรรณ ฤกษ์เกษม และคันสนีย์ จัจด. 2548. ประเมินลักษณะประจำพันธุ์ของประชากรข้าวป่าสามัญจากพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทย. หน้า 129-138. ในเอกสารประกอบการประชุมวิชาการเรื่อง "ข้าววิจัยพืช". สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

Chitrakon S. 1995. Characterization, evaluation and utilization of wild rice germplasm in

Thailand. Pathum Thani Rice Research Center, Thailand Rice research Institute Bangkok. 143 pp.

Gregorio, G.B., D. Senadhira, R.d. Mendoza, N.L. Manigbas, J.P. Roxas, and C.Q. Guerta. 2002. Progress in breeding for salinity tolerance and associated abiotic stress in rice. Field Crop Research 76: 91-101.

Kumar, S, K. Tamura, I. B. Jakobsen and M. Nei. 2001. MEGA 2: Molecular Evolutionary Genetic Analysis Software. Bioinformatics 17: 1244-1245 .

Oka H.I. 1988. Origin of Cultivated Rice. Japan Scientific Societies Press and Elsevier, Tokyo. 254 pp.

Yeh, F. C., R. C. Yang, T. Boyle, Z. H. Ye and J. X. Mao. 1997. POPGENE, the user-friendly freeware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Center. University of Alberta, Canada.