การตรวจหาความแปรผันทางพันธุกรรมของข้าวไทยบางพันธุ์ด้วยวิธีอาร์เอพีดี

นาย ชูเกียรติ กอธนะกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ หลักสูตรวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2543

ISBN 974-03-0081-2

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

GENETIC VARIATION OF SOME THAI RICE CULTIVARS DETECTED BY RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA ANALYSIS

Mr. Chukiat Khotanakul

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Doctor of Philosophy in Biological Sciences

Program of Biological Sciences

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2000

ISBN 974-03-0081-2

Thesis title	Genetic Variation of Some Thai Rice Cultivars Detected by Random Amplified Polymorphic DNA Analysis
By	Mr. Chukiat Khotanakul
Field of study	Biological Sciences
Thesis Advisor	Associate Professor Jariya Boonjawat, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Luechai Arayarungsarit, Ph.D.
	Associate Professor Preeda Boon-long, Ph.D.

Accepted by Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctor's Degree.

.....Dean of Faculty of Science

(Associate Professor Wanchai Phothiphichitr, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman

(Associate Professor Prakong Tangpraprutgul, Ph.D.)

.....Thesis Advisor

(Associate Professor Jariya Boonjawat, Ph.D.)

.....Thesis Co-Advisor

(Luechai Arayarungsarit, Ph.D.)

..... Thesis Co-Advisor

(Associate Professor Preeda Boon-long, Ph.D.)

.....Member

(Professor Montakarn Vajrabhaya)

.....Member

(Assistant Professor Vichien Rimphanitchayakit, Ph.D.)

.....Member

(Assistant Professor Jarunra Narangajavana, Ph.D.)

ชูเกียรติ กอธนะกุล:การตรวจหาความแปรผันทางพันธุกรรมของข้าวไทยบางพันธุ์ด้วยวิธีอาร์เอพีดี (GENETIC VARIATION OF SOME THAI RICE CULTIVARS DETECTED BY RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA ANALYSIS) อ.ที่ปรึกษา:รศ ดร. จริยา บุญญวัฒน์ อ.ที่ปรึกษา-ร่วม : ดร. ลือชัย อารยะรังสฤษฎ์ และ รศ. ดร.ปรีดา บุญ-หลง ; 105 หน้า. ISBN 974-03-0081-2.

ในการตรวจหาความแปรผันทางพันธุกรรมของข้าวไทย 10 พันธุ์คือ ขาวดอกมะลิ 105 ขาวตาแห้ง 17 เหลืองประทิว 123 ลูกแดงปัตตานี และเก้ารวง 88 ซึ่งเป็นข้าวทนเค็ม เหมยนอง 62 เอ็ม นางพญา ยายอ ฝอยทอง และเล็บนกปัตตานี เป็นข้าวไม่ทนเค็ม เปรียบเทียบกับข้าวต่างประเทศ 2 พันธุ์คือ พอคคาลิ เป็นข้าวพันธ์ทนเค็มของประเทศศรีลังกา และ ไอ อาร์ 28 ซึ่งเป็นข้าวไม่ทนเค็มจากสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ รวมเป็น 12 พันธุ์โดยวิธีแรนดอม แอมพลิไฟด์พอลิมอร์ฟิค ดีเอ็นเอ(อาร์เอพีดี) เมื่อทดลองใช้ไพรเมอร์สังเคราะห์ 20 ชนิด ความยาว 10 เบส กับดีเอ็นเอที่สกัดจากจีโนมทั้งหมดของข้าวหกพันธุ์สามารถคัดเลือกไพรเมอร์ได้5ชนิดซึ่งให้ความหลากหลายของชิ้นดีเอ็นเอ15-31แถบที่แยกเอกลักษณ์ข้าวทั้ง 6 พันธุ์ออกจากกันได้อย่างชัดเจนโดยมีไพรเมอร์ X9ซึ่งมีลำดับเบส ACGGCCGACCให้พอลิมอร์ฟิค ดีเอ็นเอสูงสุด ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมระหว่างข้าวทั้ง 6 พันธุ์อยู่ในช่วง 0.09-0.58 เมื่อใช้ 5 ไพรเมอร์รวมกัน เมื่อใช้โปรแกรม UPGMA สร้างแผนภูมิเดนโดรแกรม(dendrogram) จัดกลุ่มความสัมพันธ์ได้เป็น 2 กลุ่ม ไพรเมอร์X9 มีแนวโน้มที่จะจำแนกข้าวทนเค็มจากข้าวไม่ทนเค็มที่สุด เพราะแสดงความแตกต่างระหว่างข้าวทนเค็มทั้ง 5 พันธุ์จากข้าว ไอ อาร์ 28 และสูงสุดระหว่างพันธุ์พอคคาลิและ IR28 เมื่อวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรรมของข้าวทั้ง 12 พันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ X9 สามารถแยกเอกลักษณ์ของข้าวทั้ง 12 พันธุ์ได้ เมื่อนำคะแนนสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงที่ได้ไปสร้างแผนภูมิเดนโดรแกรม สามารถจัดกลุ่มข้าวไทย 10 พันธุ์แยกออกจากข้าวต่างประเทศ 2 พันธุ์คือ พอคคาลิ และไอ อาร์ 28 ได้อย่างชัดเจนโดยมีแถบดีเอ็นเอขนาด 600 คู่เบส เป็นโมเลกุลเครื่องหมาย เมื่อวิเคราะห์จากค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึง ข้าวไทยพันธุ์ทนเค็ม 5 พันธุ์จากทุกภาคคือ เก้ารวง 88 ลูกแดงปัตตานี เหลืองประทิว123 ขาวดอกมะลิ 105 และ ขาวตาแห้ง 17 มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมมากที่สุด (0.75-0.93) ส่วนข้าวไม่ทนเค็มจากภาคใต้ 4 พันธุ์ คือ นางพญา 132 ยายอ ฝอยทอง และเล็บนกปัตตานีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม(0.75-0.80)จากดัชนีแสดงลักษณะการทนเค็มของข้าว 8 ประการคือร้อยละของการงอก ความเสียหายของใบ ความสูง การแตกกอ อัตราส่วนโดยน้ำหนักแห้งของต้น / ราก จำนวนรวงต่อกอ จำนวนเมล็ดดีต่อรวง และน้ำหนักร้อยเมล็ด พบว่าความเสียหายของใบ เป็นดัชนีการทนเค็มที่ดีที่สุด สามารถแยกกลุ่มข้าวทนเค็ม ซึ่งความเสียหายของใบอยู่ในช่วง 10.74 – 21.87% ออกจากกลุ่มข้าวไม่ทนเค็มซึ่งมีความเสียหายของใบ 39.37–49.43% ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสอดคล้องกับความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมโดยวิธี อาร์เอพีดี (0.75–0.93) ข้าวไทยพันธุ์ขาวตาแห้ง 17 มีความเสียหายของใบน้อยที่สุด และเหมยนอง 62 เอ็มทนเค็ม ที่ระดับ 8 ds/m น้อยที่สุดในช่วงการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ

ภาควิชา ..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2543 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

##3970460123 : MAJOR BIOLOGICAL SCIENCES

KEY WORD: GENETIC VARIATION / THAI RICE CULTIVARS / RAPD / SALT TOLERANCE

CHUKIAT KHOTANAKUL : GENETIC VARIATION OF SOME THAI RICE CULTIVARS DETECTED BY RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA ANALYSIS. THESIS ADVISOR: ASSOCIATE PROFESSOR JARIYA BOONJAWAT, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR : LUECHAI ARAYARUNGSARIT, Ph.D. AND ASSOCIATE PROFESSOR PREEDA BOON-LONG, Ph.D. 105 pp. ISBN 974-03-0081-2.

Random amplified polymorphic DNA (RAPD) was used to examine genetic variation of 10 Thai rice cultivars; of which Khao Dawk Mali 105, Khao Tah Haeng 17, Leuang Pratew123, Look Daeng Pattani and Gow Ruang 88 are salt tolerant, Muey Nawng 62 M, Nahng Pa-yah 132, Yah Yaw, Foi Tawng and Leb Nok Pattani are salt sensitive cultivars, comparing to 2 exotic cultivars: Pokkali, a salt tolerant rice of Sri Lanka and IR 28, a salt sensitive cultivar from the International Rice Research Institute. When twenty 10 nucleotide-long random primers were used to amplify total genomic DNA from 6 rice cultivars, five primers: provided 16-31 polymorphic DNAs that can identify individual cultivar. Primer X9 (ACGGCCGACC) gave the highest polymorphism. The similarity coefficient (SC) ranging from 0.09-0.58 was obtained among 6 cultivars with 5 primers. The dendrogram revealed by UPGMA cluster analysis classified 6 cultivars into 2 groups. PrimerX9 has the highest tendency to distinguish salt tolerant cultivars from salt sensitive cultivars, because the 5 salt tolerant nce cultivars were separated from IR 28,showing the highest genetic diversity between IR 28 and Pokkali. When all 12 cultivars were used to analyze genetic variation by primer X9, the dendrogram constructed from similarity coefficient separated 10 Thai rice cultivars from 2 exotic rice cultivars: Pokkali and IR 28 by 600 bp DNA band as molecular marker. Analysis of similarity coefficient indicated that the 5 salt tolerant Thai cultivars from all regions: Gow Ruang 88, Look Daeng Pattani, Leuang Pratew 123, Khao Dawk Mali 105 and Khao Tah Haeng 17 are most closely related (SC 0.75-0.93), whereas the 4 salt sensitive cultivars from the South: Nahng Pa-yah 132,Yah Yaw, Foi Tawng and Leb Nok Pattani showed SC: 0.75-0.80. From eight phenological indices of salt tolerance: percent germination, leaf damage, plant height, tillering, ratio of shoot/root dry weight, panicles/ plant, filled grains/ panicle and 100-grain weight, the results showed that leaf damage is the best criterion for distinguishing salt tolerant cultivars with lower leaf damage (10.74-21.87 %) significantly from salt sensitive cultivars (39.37-49.43%), and this phenological index showed good correlation with the genetic similarity analyzed by RAPD (SC 0.75-0.93). At the salt concentration of 8 dS/m, Khao Tah Haeng 17 showed the lowest leaf damage, while MN 62M was the most salt sensitive cultivar in the vegetative phase.

Department .....-..... Student 's signature .....

Field of study Biological Sciences ..... Advisor 's signature .....

Academic year 2000 ..... Co – advisor 's signature .....

Co – advisor 's signature .....

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deep gratitude to my advisor, Associate Professor Dr. Jariya Boonjawat and my co-advisor Dr. Luechai Arayarungsarit and Associate Professor Dr. Preeda Boon-Long, for their invaluable supervision, encouragement and supports throughout my study.

I am very grateful to Associate Professor Prakong Tangpraprutgul, Professor Montakarn Vajrabhaya, Assistant Professor Dr. Vichien Rimphanitchayakit and Assistant Professor Dr. Jaranya Narantajavara for serving as thesis committee, and their constructive criticisms and comments.

Sincere appreciation is expressed to Miss Supaporn Junbuathong for her great helps, guidances, and suggestions in several laboratory techniques. Thanks are also expressed to all staff members and students of Department of Biochemistry for their helps in the laboratory and discussion with sincerity and friendships.

I wish to acknowledge the contributions of the Graduate School, Chulalongkorn University for financial support, of Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University and Pathum Thani Rice Research Center for all laboratory facilities and equipment.

Finally, I am most grateful to members of my family for their love, understanding and encouragement.

TABLE OF CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT.....iv

ENGLISH ABSTRACT.....v

ACKNOWLEDGMENT.....vi

TABLE OF CONTENTS.....vii

LIST OF TABLES.....xi

LIST OF FIGURES.....xii

LIST OF ABBREVIATIONS.....xiii

CHAPTER

I INTRODUCTION.....1

1.1 Introduction 1

1.2 Taxonomy and Breeding behavior.....1

1.3 Origin and Distribution.....2

1.4 Evolution and Geographical Distribution.....3

1.4.1 Asian rice.....4

1.4.1 African rice.....5

1.4.2 Thai rice.....6

1.4.3 Exotic rice.....8

1.5 Molecular Markers.....10

1.5.1 Restriction fragment length polymorphism (RFLP).....10

1.5.2 Randomly Amplified polymorphic DNAs (RAPD).....11

1.5.3 Amplified fragment length polymorphism (AFLP).....14

1.5.4 Microsatellites or Simple Sequence Length Polymorphism (SSLP).....15

1.6 Correlation between genetic variation and phenological index of salt sensitive and tolerannt rice cultivars.....16
1.6.1 Why should salt tolerant/sensitive rice be studied ?.....16
1.6.2 Information about Thai rice in terms of salt tolerance and sensitivity.....18
1.6.2.1 Germination stage.....18
1.6.2.2 Seedling stage.....19
1.6.2.3 Anthesis stage.....19
1.7 Rationale of this research.....19
1.8 Objectives.....20
II MATERIALS AND METHODS.....21
2.1 Rice seeds.....21
2.2 Rice genome DNA extraction.....21
2.3 Enzyme.....21
2.4 DNA primers.....22
2.5 Spectrophotometric measuring of DNA concentration.....23
2.6 Random amplified polymorphic DNA(RAPD) analysis.....23
2.7 Agarose gel electrophoresis.....23
2.8 Statistical procedures.....24
2.8.1 Similarity index.....24
2.8.2 Genetic distance.....25
2.8.3 Dendrograms.....25
2.8.4 Chi-square analysis.....25
2.9 Salt tolerability of rice cultivars at germination stage of growth.....26
2.10 Salt tolerability of rice cultivars at vegetative phase of growth.....26
2.11 Salt tolerability of rice cultivars at reproductive phase.....26
2.12 Chemicals.....26
2.13 Limpinuntana's nutrient solution.....27

III RESULTS.....29
3.1 DNA yield and quality.....29
3.2 Genetic variation by RAPD.....29
3.2.1 Screening of primers.....29
3.2.2 Analysis of genetic variation among 6 salt tolerant and 6 salt sensitive cultivars by primer X9.....40
3.3 Effect of salinity on rice development.....45
3.3.1 Vegetative phase.....45
3.3.1.1 Germination.....45
3.3.1.2 Leaf damage.....45
3.3.1.3 Plant height.....48
3.3.1.4 Tillering.....54
3.3.2 Reproductive phase.....54
3.3.2.1 Ratio of shoot to root dry weight.....54
3.3.2.2 Panicle/plant of 12 rice cultivars under salt stress.....54
3.3.2.3 Filled grains/panicle of 12 rice cultivars under salt stress.....57
3.3.2.4 4100-grain weight(gram) of 12 rice cultivars under salt stress.....57
IV DISCUSSION.....59
4.1 Genetic variation.....59
4.2 Correlation between genetic variation and salt tolerant/sensitive phenological parameters.....62
4.3 Genetic variation and various criteriaa of salt tolerance
4.3.1 Percent germination.....64
4.3.2 Salt tolerance criteria in the vegetative phase.....64
4.3.3 Salt tolerance criteria inreproductive phase.....67

V CONCLUSION.....69

REFERRENCES.....71

APPENDICES.....78

APPENDIX A.....79

APPENDIX B.....85

BIOGRAPHY.....104

LIST OF TABLES

Table Page

1.1 Common name, characteristics, recommended year, and region and country of origin of rice cultivars.....9

3.1 Similarity matrix of 6 rice cultivars with primer X6.....35

3.2 Similarity matrix of 6 rice cultivars with primer X8.....35

3.3 Similarity matrix of 6 rice cultivars with primer X9.....36

3.4 Similarity matrix of 6 rice cultivars with primer X10.....36

3.5 Similarity matrix of 6 rice cultivars with primer C1.....37

3.6 Similarity matrix of 6 rice cultivars with five primers: X6, X8, X9. X10 and C1.....37

3.7 Similarity matrix of 12 rice cultivars with primer X9.....42

3.8 Percent germination of salt tolerant and sensitive rice cultivars under salt stress.....46

3.9 Rice plants injury due to NaCl 8dS/m at vegetative growth state(17 day-old) under greenhouse conditions at the 5 th week.....50

3.10 Effect of salt stress in reproductive phase on yield of biomass, panicle and grain.....56

3.11 100-grain weight (gram) of 12 rice cultivars under salt stress.....58

4.1 Correalation between RAPD anal;ysis of genetic variation and percent leaf damage in 12 rice.....66

LIST OF FIGURES

Figure Page

3.1 Agarose gel electrophorogram showing intact DNA from 12 rice cultivars....30

3.2 RAPD patterns of IR 28 and Pokkali using primer X6, X8, X9, X10 and C1....31

3.3 RAPD patterns of Khao Dawk Mali 105 and Leuang Pratew 123 using primer X6, X8, X9, X10 and C1....32

3.4 RAPD patterns of Look Daeng Pattani and Khao Tah Haeng 17 using primer X6, X8, X9, X10 and C1....34

3.5 Dendrogram for 6 cultivars with X6, X8, X9, X10 and C1 constructed using UPGMA based on similarity coefficient....39

3.6 RAPD patterns of 6 salt tolerant and 6 salt sensitive cultivars using primer X9 41

3.7 Dendrogram for 12 rice cultivars with X9 constructed using UPGMA based on similarity coefficient....44

3.8 Percent germination (%) of salt tolerant cultivars (A) and sensitive cultivars (B) under salt stress....47

3.9 Leaf damage at 3 weeks under salt stress....49

3.10 Damaged leaves (%) of salt tolerant and sensitive cultivars under salt stress....51

3.11 Leaf damage at 5 weeks under salt stress....52

3.12 Plant height of salt tolerant and sensitive rice cultivars under salt stress....53

3.13 Number of tillers/hill under salt stress....55

4.1 Fan-dendrogram showing higher genetic similarity among local rice cultivars comparing to exotic cultivars....61

LIST OF ABBREVIATIONS

A	Absorbance
bp	base pair
^{o}C	degree Celcius
dATP	deoxyadenosine triphosphate
dCTP	deoxycytosine triphosphate
dGTP	deoxyquanosine triphosphate
dTTP	deoxythymidine triphosphate
DMRT	Duncan's multiple range test
dS/m	deciseimens/meter
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
EtBr	Ethidium bromide
kb	kilobase pair
M	Molar
ml	milliliter
mM	millimolar
min	minute
$MgCl_2$	Magnesium chloride
mg	milligram
nm	nanometer
ng	nanogram
PCR	polymerase chain reaction
RAPD	restriction fracment length polymorphism
RNase	Ribonuclease
SDS	sodium dodecyl sulfate
sec	second

TE	Tris EDTA
Tris	Tris (hydroxy methyl) aminomethane
µg	microgram
µl	microliter
µM	micromolar
V	Volt