ปัจจุบันข้าววัชพืชได้แพร่ระบาดไปทั่วพื้นที่นาในเขตภาคกลางของประเทศไทย ทำให้ผลผลิตของข้าวเสียหาย สาเหตุสำคัญที่ทำให้ข้าววัชพืชแพร่ระบาดอย่างรวดเร็วคือการปนไปกับเมล็ดพันธุ์ ดังนั้นการทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของข้าววัชพืชในเมล็ดพันธุ์ข้าวปลูกโดยตรวจสอบลักษณะสัณฐานของเมล็ด ลักษณะสรีระและระดับโมเลกุล โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 การทดลอง คือการทดลองที่ 1 ประเมินลักษณะประชากรข้าววัชพืชที่ขึ้นระบาดในแปลงปลูกของเกษตรกรในนาข้าวจากจังหวัดในภาคกลาง และการทดลองที่ 2 ประเมินการปนเปื้อนของพันธุกรรมข้าวป่าในเชื้อพันธุ์ข้าวปลูก

การทดลองที่ 1 ได้สุ่มเก็บประชากรข้าววัชพืชจากแปลงที่พบการระบาดจาก 14 จังหวัดในเขตภาคกลาง ภาคเหนือตอนล่างและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รวม 38 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 40-100 รวง ประเมินลักษณะสีเปลือกเมล็ด สีเยื่อหุ้มเมล็ด รูปร่างเมล็ด การมีหางที่ปลายเมล็ดและความยาวหาง บันทึกความยาวรวง จำนวนระแง้ต่อรวง จำนวนเมล็ดทั้งหมดต่อรวง จำนวนเมล็ดลีบต่อรวง และจำนวนเมล็ดร่วงต่อรวง พบว่าภายในประชากรข้าววัชพืชมีความหลากหลายในทุกลักษณะที่วัด พบลักษณะสีเปลือกเมล็ดทั้งหมด 4 แบบ ตั้งแต่สีฟางจนถึงดำ โดยพบสีฟางมากที่สุด (78.6%) น้อยที่สุดคือสีดำ (0.1%) ที่เหลือพบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 11.8-0.3% เยื่อหุ้มเมล็ดมีทั้งสีแดง (61%) และขาว (39%) พบเมล็ดเรียว (83.7%) และป้อม (16.3%) การมีหางที่ปลายเมล็ดภายในรวงพบชนิดมีหาง (0.6%) ไม่มีหาง (61.8%) และมีหางบางเมล็ด (16.3%) มีค่าเฉลี่ยความยาวรวงอยู่ระหว่าง 20.7-39.9 ซม. ค่าเฉลี่ยจำนวนระแง้อยู่ระหว่าง 5.6-13.2 ระแง้ต่อรวง มีค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อรวง 43.6-113.1 เมล็ด ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เมล็ดลีบ 10.3-75.8% และค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เมล็ดร่วงอยู่ระหว่าง 2.1-

74.8% จากนั้นสุ่มเมล็ดข้าววัชพืชแต่ละตัวอย่างมาปลูกทดสอบรุ่นลูกในกระถางตัวอย่างละ 30 ต้น ปลูกข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 เป็นพันธุ์เปรียบเทียบ วัดลักษณะทางสัณฐานและสรีระ รวม 24 ลักษณะ พบว่าลักษณะภายในประชากรข้าววัชพืชมีทั้งแบบที่เหมือนข้าวปลูกพันธุ์สุพรรณบุรี 1 และแตกต่างออกไป พบลักษณะของข้าววัชพืชที่แตกต่างจากข้าวปลูกคือ ทรงกอเอน กาบใบสีม่วง แผ่นใบมีสีม่วงที่ริม เขี้ยวใบมีสีแดง ปลายยอดเมล็ดมีสีแดง เกสรตัวเมียสีม่วง รวงชนิดจับกันปานกลางและแผ่กระจาย พบบางต้นเมล็ดมีหาง พบทั้งหางสีขาวและแดง ระยะเวลาที่ออกดอกของข้าววัชพืชพบทั้งออกดอกก่อน ออกดอกพร้อมกับข้าวปลูกและออกดอกหลังข้าวปลูก มีค่าเฉลี่ยความกว้างและยาวของใบธง และความสูงที่ระยะเก็บเกี่ยวสูงกว่าข้าวปลูก พบสีเปลือกเมล็ดเป็นสีฟางขีดน้ำตาลแดงจนถึงดำและเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เมล็ดร่วงสูงกว่าข้าวปลูกและพบบางตัวอย่างที่มีลักษณะไม่ร่วง

การทดลองที่ 2 สุ่มเก็บตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ จากเกษตรกร ร้านจำหน่ายเมล็ดพันธุ์ และผู้ผลิตเมล็ดพันธุ์เอกชน รวม 93 ตัวอย่าง ประกอบด้วยพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ชัยนาท 1 ชัยนาท 80 ปทุมธานี 1 และพิษณุโลก 2 แบ่งการประเมินลักษณะเป็น 2 ขั้นตอนคือ การประเมินลักษณะเมล็ด โดยสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ตัวอย่างละ 200 เมล็ด เพื่อมาประเมินลักษณะสัณฐานของเมล็ด พบว่ามีลักษณะที่พบในข้าววัชพืชปนในตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ คือ เยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง การมีหางของเมล็ด เปลือกสีฟางขีดน้ำตาลแดง โดยพบในอัตรา 0.35% 0.05% และ 0.04% ของจำนวนเมล็ดทั้งหมด ตามลำดับ เมื่อนำลักษณะทั้ง 3 มาพิจารณาร่วมกัน พบว่าทั้ง 93 ตัวอย่างพบปนทั้งหมด 18 ตัวอย่าง คิดเป็น 19.4% ซึ่งพบในพันธุ์สุพรรณบุรี 1 (25.4%) ชัยนาท 80 (50%) แต่ไม่พบในพันธุ์ปทุมธานี 1 พิษณุโลก 2 และชัยนาท 1 ขั้นตอนที่สองเป็นการประเมินในรุ่นลูก สุ่มตัวอย่างมาแยกเพาะเมล็ดในกระถางพลาสติก เมื่ออายุต้นกล้า 20 วันย้ายปักดำในกระถางรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า ปลูกประชากรละ 50 ต้น โดยปลูกข้าวปลูกจากเมล็ดพันธุ์คัด พันธุ์สุพรรณบุรี 1 ชัยนาท 1 ชัยนาท 80 ปทุมธานี 1 และพิษณุโลก 2 เป็นพันธุ์เปรียบเทียบ เมื่อถึงระยะออกรวง บันทึกอายุออกดอกของแต่ละต้น ที่ระยะเก็บเกี่ยว วัดความสูงจนถึงคอรวง บันทึกลักษณะเมล็ดเช่นเดียวกับการทดลองแรก พบว่าภายในตัวอย่างที่นำมาปลูกทดสอบยังคงพบลักษณะที่แตกต่างจากพันธุ์คัดโดยพบบางต้นภายในตัวอย่าง ข้าวปลูกพันธุ์สุพรรณบุรี 1 และชัยนาท 1 มีอายุออกดอกเฉลี่ยแตกต่างจากพันธุ์คัด 5 และ 2 ตัวอย่างตามลำดับ แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างความสูงของตัวอย่างข้าวปลูกและพันธุ์คัด ลักษณะสัณฐานเมล็ดพบปนสูงสุดในลักษณะเมล็ดมีหาง 3.36% สีเปลือกเมล็ดสีฟางขีดน้ำตาลและเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงพบมีค่าการปนเท่ากันคือ 0.07% ของจำนวนเมล็ดที่วัดทั้งหมด เมื่อพิจารณาทั้งหมด 93 ตัวอย่างพบลักษณะเมล็ดมีหางปนภายในตัวอย่างมากที่สุด 19 ตัวอย่าง (20.4%) รองลงมาคือ เยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง 3 ตัวอย่าง (3.2%) และเปลือกสีฟางลายน้ำตาลแดง 2 ตัวอย่าง (2.2%) พบในตัวอย่าง

ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ชัยนาท 1 และ พิษณุโลก 2 เท่ากับ 3.2% 16.7% และ 16.7% ของแต่ละพันธุ์ตามลำดับ ไม่พบในพันธุ์ปทุมธานี 1 และชัยนาท 80 เมื่อนำลักษณะสัณฐานทั้ง 3 ลักษณะมาพิจารณาร่วมกัน พบว่าในการทดสอบรุ่นลูกนี้ ภายในตัวอย่างทั้ง 93 ตัวอย่างพบปนทั้งหมด 23 ตัวอย่าง และพบการปนในตัวอย่างที่ซ้ำกับการทดสอบสัณฐานเมล็ด 2 ตัวอย่าง นอกจากนั้น เมื่อเก็บตัวอย่างใบจากต้นที่มีลักษณะภายนอกเหมือนข้าวปลูกจากการทดสอบรุ่นลูกนี้ จำนวน 35 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 10 ต้น ไปตรวจสอบในระดับ DNA โดยใช้ microsatellite marker จำนวน 4 ตัว ประกอบด้วย RM1 RM341 RM444 และ 586 ผลการตรวจสอบพบ allele ของข้าวพันธุ์อื่นและข้าวป่าจากจังหวัดกาญจนบุรีและกรุงเทพปนอยู่ภายในประชากร พันธุกรรมที่พบเป็นแบบ homozygous genotype ทั้งหมด เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง primer พบว่า RM586 ตรวจพบการปนของข้าวป่ามากที่สุดโดยคิดเป็น 2.4% ส่วน RM1 ตรวจพบน้อยที่สุดคือ 0.6% ขณะที่ RM341 และ RM1 ตรวจพบการปนของข้าวพันธุ์อื่นได้มากที่สุดคิดเป็น 6% และเมื่อใช้ primer ทั้ง 4 ตัวร่วมกันตรวจพบข้าวป่า 10 ต้น และข้าวพันธุ์อื่น 25 ต้น คิดเป็น 2.8% และ 7.1% ของจำนวนต้นที่ตรวจทั้งหมด โดยพบปนใน 10 ตัวอย่างจาก 35 ตัวอย่าง (28.6%) เมื่อแยกพิจารณาภายในตัวอย่างของแต่ละพันธุ์พบว่าตัวอย่างข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 พบ allele ข้าวพันธุ์อื่นปน 1.1% และข้าวป่า 1.8% พันธุ์พิษณุโลก 2 พบ allele ข้าวพันธุ์อื่นและข้าวป่าปน 3.3 และ 13.3% ตามลำดับ ตัวอย่างข้าวพันธุ์ชัยนาท 80 พบ allele ข้าวพันธุ์อื่น 35% เมื่อรวมผลการตรวจสอบทั้งหมดพบว่าวิธีการตรวจสอบสัณฐานเมล็ดพบการปนเปื้อน 18 ตัวอย่าง จากการปลูกทดสอบรุ่นลูกพบเพิ่มอีก 21 ตัวอย่าง และการตรวจโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลพบอีก 4 ตัวอย่าง รวมพบตัวอย่างที่มีข้าววัชพืชปนทั้งหมด 43 ตัวอย่าง คิดเป็น 46%

การตรวจสอบการปนเปื้อนโดยการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเมล็ดเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวกในการตรวจสอบการปนเปื้อนของข้าววัชพืชในเบื้องต้นในประชากรข้าววัชพืชที่ยังมีความแตกต่างกับข้าวปลูก แต่การตรวจสอบในระดับ DNA ยังพบการปนเปื้อนจากพันธุกรรมจากข้าวป่าเพิ่มเติมจากที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า และเมื่อใช้วิธีการตรวจสอบร่วมกันจะให้ผลการตรวจสอบที่แม่นยำและถูกต้องยิ่งขึ้นจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าภายในเชื้อพันธุ์ข้าวของเกษตรกรพบการปนเปื้อนของข้าวพันธุ์อื่นและข้าวป่าภายในตัวอย่าง ถึงแม้เมล็ดจะมีลักษณะภายนอกเหมือนข้าวปลูกทุกประการแต่ภายในยังคงพบการปนเปื้อนของพันธุกรรมข้าวป่า แสดงว่าเกิดการแลกเปลี่ยนยีน (gene flow) ภายในแปลงปลูก หากเกษตรกรนำเมล็ดพันธุ์เหล่านี้ไปใช้ปลูกทำให้เกิดการระบาดของข้าววัชพืชในวงกว้าง

Weedy rice (*Oryza sativa*), the noxious weed problem in rice field, has spread widely in the central plain of Thailand, resulting in serious yield losses. Contamination of rice seed with weedy rice is the main cause for weedy rice spreading into new areas. Therefore, the objective of this study was to determine the extent of weedy rice seed contamination in rice seeds using morphological, physiological characterization and DNA analysis. The study consisted of two experiments. Experiment 1 was the characterization of weedy rice populations collected from farmer's fields and Experiment 2 was the determination of weedy rice contamination in crop rice seed.

In experiment 1, 38 weedy rice samples were collected from the infested fields in 14 provinces. Samples were recorded for hull color, pericarp color, seed shape, awning and awn length, panicle length, number of primary branches per panicle, unfilled seed per panicle, seed per panicle and seed shattering. Variation within and among weedy rice samples in all characters were found in different degrees among the samples and

characteristics evaluated. Hull color of weedy rice exhibited 8 different types varied from light straw to black, with 42.2% of straw color and only 0.1% of black hull, other types found in the range of 36.2 to 0.3%. For pericarp colors, 61% red and 39% white were found. About 84% of seed with slender shape and 16% with round shape were found. Three different types of seed awning within panicle were exhibited, 61.8% awnless, 16.3% tip awned and 0.6% awned. Average panicle length was ranging from 20.7 to 39.9 cm. Primary branches per panicle were found in the range of 5.6 to 13.2. Seed per panicle was ranging from 43.1 to 113.1. Percentage of seed shattering was between 2.1 to 74.8 and unfilled seed was between 10.3 to 75.8%. Then weedy rice seeds were randomly selected for progeny test in pots, 30 seeds per sample, and 10 plants per pot. Twelve morphological and 12 physiological characters were recorded and compared to Suphanburi 1 (SPR1) crop rice grown from breeder seed. Progeny test showed variation within weedy rice sample and showed various degree of deviation from SPR1 breeder seed, such as spreading tillers (16.3%), purple leaf sheath (10%) and blade (2.3%), red apiculus (11.2%) and auricle (11.2%), purple stigma (11.1%), intermediate panicle type (4.8%) and open panicle type (1.9%), seed with red (8.5%) or white awn (86.9%), tip awn (1.9%), early to late heading date (70 to 139 days), wider and longer flag leaf, taller plant at harvesting stage, hull color varied from straw with brown strip to black, red pericarp and higher percentage of seed shattering.

The second experiment was conducted to evaluate rice seed characteristics and progeny test. Ninety three samples were collected from farmers and local commercial seed sellers consisted of Suphanburi 1 (SPR1), Chainat 1 (CNT1), Chainat 80 (CNT80), Pathumtani 1 (PTT1) and Phisanuloke 2 (PSL2) rice varieties. Two hundred randomly chosen seeds per sample were characterized. Weedy rice characters found included red pericarp (0.36%), seed awning (0.05%) and straw with brown strip hull (0.04%).

Combining the three morphological characters of seed detected 18 samples from the 93 samples (19.4%) contamination with at least one character. In this test, contaminations were found in SPR1 (25.4%), PSL2 (11.1%) and CNT80 (50%), but not from PTT1 and CNT1. Then, progeny testing were conducted with 50 plants per sample in 1 x 1.5 m^2 tray and compared with breeder seed of each variety. Heading date, plant height and seed characteristics as described in previous experiment were recorded. Deviation in heading date from breeder seed was found in farmers' seed variety SPR1 and CNT1, 5 and 2 samples, respectively. Weedy rice seeds characteristics were found in seed awning, straw with brown strip hull and red pericarp, with 3.36%, 0.07% and 0.07% of the total number of seed tested, respectively. Within the 93 samples, 19 samples were found to contaminate with seed with awn (20.4%), 3 samples with red pericarb and straw with brown strip hull (3.2%), which were found in SPR1, CNT1 and PSL2 with 3.2%, 16.7% and 16.7% of each variety, respectively. Combining the three morphological characters of seed in this progeny test detected 23 samples from the 93 samples and two samples were repeated to those found at the first screening. During the progeny test, leaf sample from plants that looked the same as the standard check of each variety from 35 samples, 10 plants per sample were collected for DNA analysis. Four microsatellite markers, RM1, RM341, RM444 and RM586, were used. Wild rice alleles from Kanchanaburi and Bangkok and also other crop rice alleles were detected within the samples. All alleles found in each plant were homozygous. Among the four microsatellite markers, RM586 showed the highest efficient marker detecting wild allele with 2.4% and RM1 was the lowest with 0.6% while RM341 and RM1 found 6% contamination of alleles from other rice varieties. Combining 4 markers together, 10 plants were found to contain wild rice alleles and 25 plants with other crop rice allele, which accounted for 2.8% and 7.1% of total number of plants, respectively. Among the 35 samples, 10 samples were contaminated with wild rice

alleles and other crop varieties alleles (28.6%). Within SPR1 samples, 1.1% was assigned to other crop rice allele and 1.8% to wild rice allele. Within PSL2 samples, 3.3% was other crop allele and 13.3% was wild allele. Within CNT80, only other crop allele was found (35%), no such wild allele was detected. When combine all screening, contamination of weedy rice was found in 18 samples from 93 samples using seed characteristics, 21 more contaminated samples were detected by progeny testing and 4 from DNA analysis which make total contamination at 46.2% (43 samples from total 93).

Weedy rice contamination detected by using seed morphology was rapid, easy, simple and convenient basic method. Molecular analysis at DNA level could increase the accuracy and liability. The present study showed the presence of weedy rice seeds and other crop rice contamination in farmers' rice seed. Although farmers' rice seeds were visually clean, wild rice alleles were still detected indicating gene flow between crop rice and weedy rice. Using contaminated rice seeds will increase weedy rice problem.