RECEIVED
BY ดวงใน DATE 8/1/52

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ (BRT R_251007)

การศึกษาการกระจายของยีน OS2AP ระดับประชากรในข้าวหอมมะลิ ข้าววัชพืชและข้าวป่าโดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายในพื้นที่ปลูกข้าวหอมมะลิทุ่งกุลาร้องไห้

โดย

รศ. ดร. ปรีชา ประเทพา และคณะ

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

9 มกราคม 2552

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ (BRT R_251007)

การศึกษาการกระจายของยีน OS2AP ระดับประชากรในข้าวหอมมะลิ ข้าววัชพืชและข้าวป่าโดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายในพื้นที่ปลูกข้าวหอมมะลิทุ่งกุลาร้องไห้

โดย

รศ. ดร. ปรีชา ประเทพา และคณะ

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

9 มกราคม 2552

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษาการกระจายของยีน OS2AP ระดับประชากรในข้าวหอมมะลิ ข้าววัชพืชและข้าวป่าโดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายในพื้นที่ปลูกข้าวหอมมะลิทุ่งกุลาร้องไห้

โดย

รศ. ดร. ปรีชา บ่ระเทพา และคณะ

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

(ก)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย (โครงการ BRT) ผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณโครงการ BRT ที่ได้ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยข้าวมาอย่างต่อเนื่อง ทำให้ผู้วิจัยสามารถผลิตผลงานวิจัยวิทยาศาสตร์พื้นฐานที่สามารถนำไปตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติได้ อันเป็นแนวทางยกระดับความรู้ความสามารถของนักวิจัยวิทยาศาสตร์พื้นฐานให้มีมาตรฐานเข้าสู่ความเป็นสากลมากขึ้น

บทคัดย่อ

ยีน OS2AP (หรือยีนที่เรียกชื่ออย่างอื่นคือ BADH2 หรือ fragrance (fgr) gene) กำหนดการสร้างสารหอมชนิด 2AP (2-acetyl-1-pyrroline) ซึ่งพบในเมล็ดข้าวที่มีความหอม ยีน BADH2 มีสองอัลลีลคือ *BADH2* และ *badh2* ซึ่งอัลลีลด้อย *badh2* ของยีนนี้จะกำหนดการสร้างสารหอม งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ 2 ประการคือ 1) ตรวจสอบการปรากฏของอัลลีลด้อยของยีน BADH2 ในประชากรของข้าววัชพืช ที่ขึ้นปะปนกับข้าวหอมมะลิในทุ่งกุลาร้องไห้ และ 2) ตรวจสอบอัลลีล BADH2 ในข้าวหอมมะลิที่อยู่ในบริเวณเดียวกันกับข้าววัชพืช เทคนิคที่ใช้ศึกษาคือเทคนิค PCR และ polyacrylamide electrophoresis

ข้าววัชพืชจำนวน 215 ต้นที่เก็บตัวอย่างเพื่อใช้สำหรับการทดลองนี้ จากผลการตรวจสอบพบว่าข้าววัชพืชเหล่านี้มี 3 จีโนไทป์คือ *BADH2/BADH2, BADH2/badh2* และ *badh2/badh2* ความถี่ของอัลลีล *badh2* มีค่าเท่ากับ 0.547 ผลจากการใช้สถิติการทดสอบไค-สแควร์ พบว่าการกระจายของยีนนี้ในประชากรข้าววัชพืชอยู่ภาวะสมดุลตามกฎฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก

ผลจากการวิเคราะห์ยีโนไทป์ของข้าวหอมมะลิจำนวน 66 รวง (1250 เมล็ด) ที่อยู่ร่วมกันกับข้าววัชพืช พบว่าข้าวหอมมะลิไม่ปรากฏอัลลีล BADH2 ข้าวหอมมะลิมีจีโนไทป์แบบเดียวคือ *badh2/badh2* ผลจากการวิเคราะห์นี้ชี้ให้เห็นว่าการถ่ายเทยีนในสภาพธรรมชาติในทิศทางจากข้าววัชพืชที่มีจีโนไทป์แบบ *BADH2/BADH2* และ *BADH2/badh2* ไปยังข้าวหอมมะลิเกิดขึ้นได้น้อยมากหรือไม่เกิดขึ้นเลย ทำให้ไม่เกิดความกังวลว่าข้าววัชพืชเหล่านี้ส่งผลกระทบในเชิงลบต่อคุณภาพข้าวหอมมะลิ

Abstract

The gene population of weedy rice (*Oryza sativa* f. spontanea) is expected to play important role in increasing the genetic diversity of cultivated rice (*Oryza sativa* L.). A candidate gene (*fgr/BADH2*) homologous to *betaine aldehyde dehydrogenase* is responsible for aroma metabolism in fragrant rice varieties. The presence of a dominant BADH2 allele encoding betaine aldehyde dehydrogenase inhibits the synthesis of 2-acetyl-1-pyrroline (2AP), a potent flavor component in rice fragrance. By contrast, its recessive alleles, *badh2*, induce 2AP formation. The present study was carried out to determine the presence of the recessive allele of the fragrance gene of the weedy rice population in an important rice growing area of Northeastern Thailand. Among the 215 weedy rice plants examined, three genotypes, *BADH2/BADH2*, *BADH2/badh2* and *badh2/badh2* were detected. Frequencies of the *badh2* allele showed a high value of 0.547. A test of goodness-of-fit was performed to assess the evolutionary processes influencing this gene locus. The test indicate that the evolutionary process did not play a significant role in influencing the gene locus (χ^2= 3.5, P >0.05). The *badh2* allele was not found in the wild rice populations used in this study. This finding strongly supports the hypothesis that the *badh* 2 allele in the weedy rice population originated from fragrant rice cultivars.

Weedy rice occur sympatrically with Thai Hom Mali rice, and gene flow is known to occur. The present study to survey the specific DNA marker (i.e., allele *BADH2*) in 1250 Thai Hom Mali rice progeny in a naturally occurring population of Thai Hom Mali rice. It was found that Thai Hom Mali rice progeny did not carry the allele BADH2. This result indicated that gene flow from weedy rice, which carrying genotypes BADH2/BADH2 and BADH2/badh2 to Thai Hom Mali rice is likely not occurred. This will suggest that weedy rice occurred naturally in Thai Hom Mali rice fields have no negative effects to cooking quality of Thai Hom Mali rice.

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

ยีน *BADH2* (*betaine aldehyde dehydrogenase 2)* ที่พบในจีโนมข้าวเป็นยีนที่มีความสำคัญยีนหนึ่ง ยีนนี้จะกำหนดการสังเคราะห์เอ็นไซม์ betaine dehydrogenase 2 ที่มีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์สารหอม (volatile aroma compound) ชนิดหนึ่งคือ 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) ซึ่งเป็นสารให้ความหอมหลักในพันธุ์ข้าวหอม สารหอมชนิดนี้เป็นสิ่งกำหนดคุณภาพการหุงต้มของข้าวหอมมะลิของไทยคือ ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ 15 ยีน BADH2 มีตำแหน่งอยู่ที่โครโมโซมคู่ที่ 7 ของจีโนมข้าว ยีนนี้มี 2 อัลลีลส์ คืออัลลีลเด่น (BADH2) และ อัลลีลด้อย (badh2) อัลลีลด้อยเกิดขึ้นจากการกลายบริเวณ exon 7 โดยมีการขาดหายไปของเบสจำนวน 7 เบส ทำให้เกิดความบกพร่องในสายพอลีเปปไทด์ และไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ ส่งผลทำให้ข้าวสามารถผลิตสารหอม 2AP ได้

ข้าววัชพืช *(Oryza sativa f. spontanea)*เกิดขึ้นจากการผสมข้ามระหว่างข้าวปลูก (*O. sativa*) และข้าวป่า (*O. rufipogon*) ที่ขึ้นอยู่เดิมก่อนนำข้าวปลูกมาปลูกข้าวหอมมะลิที่ใช้เป็นเชื้อพันธุ์ที่มีจีโนไทป์ที่สามารถผลิตสารหอมได้ ข้าววัชพืชมีทั้งจีโนไทป์ที่ผลิตสารหอมได้ และที่ผลิตสารหอมไม่ได้ ดังนั้นจึงมีโอกาสที่อัลลีลเด่นที่มีอยู่ในประชากรข้าววัชพืชจะผสมกับอัลลีลด้อยในประชากรข้าวหอมมะลิ ส่งผลทำให้เกิดข้าวหอมมะลิรุ่นลูกมีจีโนไทป์ที่ไม่สามารถผลิตสารหอมได้ คุณภาพความหอมในประชากรข้าวหอมมะลิอาจเปลี่ยนแปลงไปในทางลบ อย่างไรก็ตามสมมติฐานนี้ได้พิสูจน์แล้วจากการศึกษานี้ว่า ข้าวหอมมะลิรุ่นลูกไม่พบอัลลีลเด่นในประชากร ซึ่งเป็นหลักฐานระดับโมเลกุลชี้ให้เห็นว่าการถ่ายเทยีนจากข้าววัชพืชอาจจะไม่เกิดขึ้นหรือเกิดขึ้นน้อยมากซึ่งการศึกษานี้ไม่สามารถตรวจพบได้ ซึ่งต้องใช้การวางแผนการทดลองแบบอื่นเพื่อยืนยันต่อไป

Executive Summary

It is already reported that the aroma of Thai Hom Mali rice is associated with amount of 2-acetyl-1-pyrroline (2AP). In addition, the levelof 2AP is controlled by a recessive gene encoding betaine aldehyde dehydrogenase 2 (BADH2) on chromosome 8 of rice. An eight base pair deletion on BADH2 gene (or badh2 allele) is responsible for aroma whereas normal BADH2 gene present in non-fragrant rice. Wild rice and weedy rice found in the Thai Hom Mali rice fields were determined on the presence of the badh2 allele. I was found that weedy rice populations carried the badh2 allele, but not for wild rice populations. The badh2 allele found in weedy rice population may have originated from Thai Hom Mali rice. Furthermore, gene flow from weedy rice with the normal BADH2 gene to Thai Hom Mali rice was not detected in this study. Hence, there was no a negative influence of resulting from gene flow to cooking quality (i.e., grain aroma characteristic) of a progeny of Thai Hom Mali rice population which generated from the parents.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
Abstract	ค
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	ง
Executive Summary	จ
สารบัญภาพ	ช
สารบัญตาราง	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 อุปกรณ์และวิธีการ	3
บทที่ 3 ผลการศึกษาและวิจารณ์	6
เอกสารอ้างอิง	11
ภาคผนวก	13

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 2.1	แสดงตำแหน่งที่เก็บข้าววัชพืช ข้าวป่าและข้าวหอมมะลิ	3
ภาพที่ 2.2	ข้าวป่าชนิด *Oryza rufipogon* ในแหล่งน้ำของทุ่งกุลาร้องไห้	4
ภาพที่ 2.3	การเก็บตัวอย่างข้าววัชพืชและข้าวหอมมะลิในแปลง	4
ภาพที่ 3.1	ภาพถ่าย polyacrylamide gel ที่แสดงจีโนไทป์ 3 แบบของยีนBADH2	8

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 3.1	จำนวนตัวอย่างข้าวป่าและข้าววัชพืชและจำนวนจีโนไทป์ที่พบในประชากรข้าวแต่ละชนิด	6
ตารางที่ 3.2	ความถี่ของยีน BADH2 ในประชากรข้าววัชพืช	7

บทนำ ๑

ความหอมของข้าวถูกกำหนดโดยยีน Betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) ซึ่งมีอยู่สองรูปแบบและมีความคล้ายคลึงกันมาก คือ BADH1 และ BADH2 ยีน BADH1 มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 4 ส่วนยีน BADH2 มีตำแหน่งบนโครโมโซมแท่งที่ 8 ยีน BADH2 ที่เกิดการกลายจะเป็นยีนที่กำหนดการสร้างสารหอมระเหยชนิด 2AP (2-acetyl-1-pyrroline) ที่พบในข้าวหอมมะลิของไทยและข้าวบัสมาติของอินเดีย (Bradbury et al. 2005) เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนนี้ระหว่างข้าวหอม (fragrant rice) กับข้าวไม่หอม (non-fragrant rice) พบว่ามีความแตกต่างกันที่เกิดจากการกลายของนิวคลีโอไทด์ทั้งที่เป็นแบบการขาดหายหรือเพิ่มขึ้นของลำดับเบส (insertion/deletion mutation) หรือ สนิปส์ (SNP, Single nucleotide polymorphism) ในพันธุ์ข้าวที่ไม่หอมยีน BADH2 จะทำหน้าที่ได้เป็นปกติคือสร้างเอนไซม์ BADH2 ที่ทำหน้าที่ได้ ในขณะที่พันธุ์ข้าวหอมเอนไซม์ชนิดนี้ถูกสร้างขึ้นจากยีนที่มีการกลายโดยการขาดหายไปของลำดับเบสจำนวน 8 เบส เอนไซม์ชนิดนี้ไม่สามารถทำงานได้ ทำให้มีการสะสมสารหอม 2AP และสามารถตรวจสอบหาปริมาณสารหอมชนิดนี้โดยวิธีการทางเคมีได้

เทคนิควิธีการตรวจสอบยีนที่แสดงความหอมและไม่หอมในข้าว ซึ่งใช้พื้นฐานของเทคนิค PCR ตรวจสอบการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์จำนวน 8 นิวคลีโอไทด์ของ exon 7 ของยีน BADH2 ในข้าวที่สร้างสารหอม 2AP (Bradbury et al., 2005; Shi et al., 2008)

ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ข้าวหอมสายพันธุ์แท้ (aromatic isogenic line) ข้าวไม่หอมที่มีพันธุกรรมแท้ (non-aromatic isogenic line) และข้าวญี่ปุ่นที่ไม่หอมพันธุ์ Nipponbare มียีน Os2AP (หรือ BADH2) ขนาดเดียวกันคือ 5.8 kb ยีนนี้มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 8 ลำดับเบสแบ่งออกเป็น 15 exon คั่นด้วย 14 intron (http://www.freepatentsonline.com/) เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนนี้ระหว่างข้าวหอมและไม่หอม พบความแตกต่างที่ชัดเจนในลำดับเบสของ exon 7 คือ ในข้าวหอมจะมีเบสจำนวน 8 เบส (GATTAGGC) ขาดหายไป ส่วนในพันธุ์ข้าวที่ไม่หอมจะพบเบสชุดนี้ ลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณนี้เกิดการกลายที่เรียกว่า insertion/deletion mutation เมื่อมีเหตุการณ์การกลายในยีน BADH2 บริเวณ exon 7 เบสขาดหายไปนั้น ผลที่ตามมาคือ การถอดรหัสของยีนนี้ได้ mRNA ไม่สามารถทำงานได้ กล่าวคือ ลำดับเบสบนสาย mRNA จะเกิดรหัสหยุดเกิดขึ้นภายในสาย

(premature stop codon) ทำให้การแปลรหัสเป็นโปรตีนที่เป็นเอนไซม์นั้น เป็นโปรตีนที่ผิดปกติคือมีขนาดสั้นกว่าปกติ และต่อมาจะเกิดการสลายตัวไป (nonsense-mediated mRNA decay, NMD) ซึ่งเป็นปรากฏการณ์ธรรมชาติในระบบการแสดงออกของยีนเพื่อป้องกันการแปลรหัสเป็นโปรตีนที่ผิดปกติ อาจส่งผลร้ายต่อสิ่งมีชีวิตได้ (Hentze and Kulozik, 1999)

เหตุการณ์การถ่ายเทยีน (gene flow) ระหว่างข้าววัชพืชกับข้าวหอมมะลิมีโอกาสที่จะเกิดขึ้นได้มากในสภาพธรรมชาติ ข้าวป็นพืชผสมตัวเอง แต่อย่างไรก็ตามมีผลการวิจัยที่ระบุว่ามีการผสมข้ามเกิดขึ้นจากการทดลองปลูกข้าวป่า ข้าวปลูกและข้าววัชพืชในระยะห่างๆกันในจีนและเกาหลี ได้ผลการวิจัยที่ชี้ชัดว่ามีการถ่ายเทยีนจากข้าวปลูกมายังข้าวป่าและมายังข้าววัชพืช (Chen et al. 2004) และผลจากการสำรวจข้าววัชพืชในสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว พบว่ามีการถ่ายเทยีนจากข้าวป่า 2 ชนิดคือ *O. nivara* และ *O. rufipogon* (Kuroda et al. 2005) ในทางตรงกันข้ามยีนของข้าวป่าสามารถถ่ายเทมายังข้าวปลูกได้เช่นเดียว มีรายงานการวิจัยที่พบว่า มีดีเอ็นเอจากข้าวป่าสามารถถ่ายทอดมายังจีโนมข้าวปลูกพันธุ์สุพรรณบุรี 1 (Boonchuay et al. 2005)

จากการสังเกตแปลงปลูกข้าวหอมมะลิในบางบริเวณของทุ่งกุลาร้องไห้ พบว่ามีข้าววัชพืชขึ้นปะปนอยู่กับข้าวหอมมะลิ ข้าววัชพืชเหล่านี้เป็นผลลัพธ์ของการผสมข้ามระหว่างข้าวป่าชนิด *O. rufipogon* และข้าวปลูก *O. sativa* ซึ่งอาจจะเป็นข้าวหอมมะลิซึ่งมียีน BADH2 ที่เป็นอัลลีลด้อยและจีโนไทป์ที่สามารถผลิตสารหอมได้ ในขณะที่ข้าววัชพืชอาจจะมีจีโนไทป์ที่ไม่สามารถสร้างสารหอมได้คือจีโนไทป์ BADH2/BADH2 และ BADH2/badh2 และอาจจะมีการถ่ายเทยีนจากข้าววัชพืชไปยังข้าวหอมมะลิ ส่งผลทำให้ข้าวหอมมะลิรุ่นลูกอาจจะมีจีโนไทป์ที่ไม่สร้างสารหอมซึ่งส่งผลทำให้ข้าวหอมมะลิมีคุณภาพความหอมเปลี่ยนแปลงไปจากมาตรฐานอันเนื่องจากมีการปนเปื้อนของเมล็ดข้าวหอมมะลิที่มี จีโนไทป์ที่ไม่สามารถสร้างสารหอม จึงมีแนวคิดที่จะศึกษาเพื่อทดสอบสมมติฐานตามที่ได้กล่าวถึงดังกล่าว

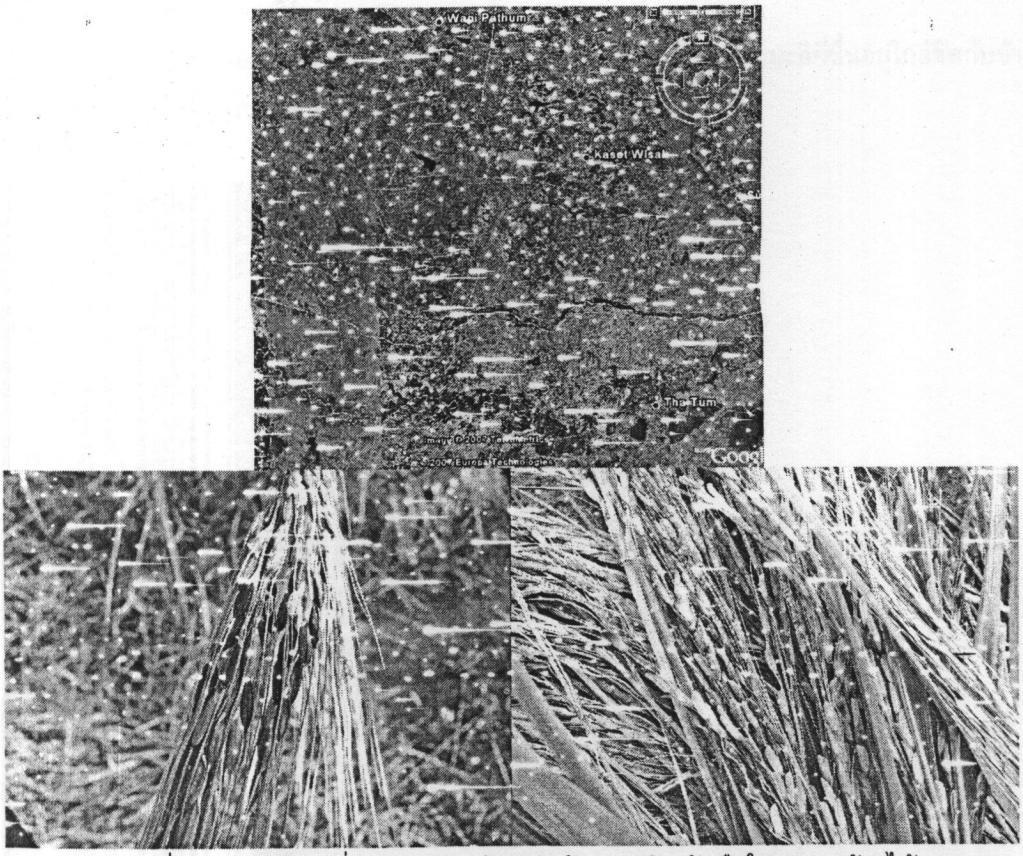
โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ ดังนี้

1) เพื่อสำรวจอัลลีลของยีน BADH2 ในประชากรข้าววัชพืช และข้าวป่าที่ขึ้นอยู่ตามธรรมชาติในทุ่งกุลาร้องไห้โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมาย

2) เพื่อสำรวจอัลลีลเด่นของยีน BADH2 ในประชากรรุ่นลูกของข้าวหอมมะลิที่เก็บตัวอย่างในฤดูเก็บเกี่ยวปี พ.ศ. 2551

1) ตัวอย่างข้าววัชพืชในทุ่งกุลาร้องไห้

จากการสำรวจข้าววัชพืชในเขตทุ่งกุลาร้องไห้ พบว่า พบข้าววัชพืชในแปลงปลูกข้าวหอมมะลิ ในถนนหลวงหมายเลข 2061 ระหว่างอำเภอพยัคฆภูมิพิสัย จังหวัดมหาสารคาม-อำเภอเกษตรวิสัย จังหวัดร้อยเอ็ด ถนนหลวงหมายเลข 214 จากอำเภอสุวรรณภูมิ จังหวัดร้อยเอ็ด-อำเภอท่าตูม จังหวัดสุรินทร์ และภายในใจกลางของทุ่งกุลาร้องไห้ที่พบข้าววัชพืชในแปลงปลูกข้าวที่บ้านหนองบ่อ อำเภอพยัคฆภูมิพิสัย จึงได้กำหนดจุดศึกษาและเก็บตัวอย่างข้าววัชพืช 6 จุด ดังแสดงในภาพดังต่อไปนี้ การศึกษานี้ได้เก็บตัวอย่างข้าววัชพืช และข้าวป่าจากจุดที่ 5 ซึ่งเก็บต้นข้าววัชพืชได้จำนวน 215 ต้น โดยเก็บรวงของแต่ละต้นและเก็บใบธงและเก็บข้าวป่าได้จำนวน 99 ตัวอย่าง



ภาพที่ 2.1 บริเวณที่เก็บตัวอย่างข้าวและตัวอย่างข้าววัชพืชในทุ่งกุลาร้องไห้

ภาพที่ 2.2 ข้าวป่าชนิด *O. rufipogon* ที่พบในหนองน้ำใกล้ๆ กับแปลงปลูกข้าวหอมมะลิในทุ่งกุลาร้องไห้

2) การเก็บตัวอย่างข้าวหอมมะลิรุ่นลูก

ในแปลงปลูกข้าวหอมมะลิที่มีข้าววัชพืชขึ้นปะปนอยู่ จะเลือกต้นข้าวหอมมะลิที่ขึ้นอยู่ใกล้ชิดกับข้าววัชพืช และเก็บรวงจากต้นข้าวหอมมะลิ ได้จำนวน 66 ต้น

ภาพที่ 2.3 การเก็บตัวอย่างข้าววัชพืชและข้าวหอมมะลิจากแปลงปลูกข้าวหอมมะลิ

1) การสกัดดีเอ็นเอจากใบธงของข้าววัชพืช

ใบธงของต้นข้าวตัวอย่างจะใช้สกัดดีเอ็นเอ (DNA of parents) การสกัดดีเอ็นเอจากใบข้าวนั้นจะใช้วิธี CTAB ตามวิธีการของ Doyle and Doyle (1987)

2) การศึกษาดีเอ็นเอของข้าวหอมมะลิรุ่นลูก (progeny)

เมล็ดที่เก็บไว้ประมาณ 2 เดือนของข้าวหอมมะลิจะนำมาเพาะเมล็ดโดยแยกแต่ละรวง จะได้จำนวนต้นกล้า 66 ชุด แต่ละชุดจะมีจำนวน 5-10 ชุดย่อย การสกัดดีเอ็นเอจะสกัดจากใบอ่อนต้นกล้าอายุ 1 เดือนโดยในแต่ละชุดย่อยจะใช้ใบอ่อนจากต้นกล้าจำนวน 5 ต้น (bulk sample) นำมาสกัดดีเอ็นเอใช้วิธีเดียวกันกับที่ใช้สกัดดีเอ็นเอจากใบธงของข้าววัชพืช

3) 1.2 การศึกษาดีเอ็นเอเป้าหมายที่แสดงความแตกต่างระหว่างอัลลีล *BADH2* และ *badh2* โดยใช้เทคนิค PCR และ polyacrylamide gel electrophoresis ไพรเมอร์ที่ใช้ในกระบวนการปฏิกิริยาลูกโซ่และขั้นตอนต่าง ๆที่ใช้ในการวิเคราะห์มีรายละเอียดในบทความวิจัยท้ายเล่มรายงานฉบับนี้

1.3 การวิเคราะห์ความถี่ของยีน *BADH2* ในประชากรข้าวป่าที่สำรวจและเก็บตัวอย่าง และทดสอบว่าการกระจายของยีนอยู่ในภาวะสมดุลตามกฎฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก หรือไม่นั้น จะใช้การทดสอบทางสถิติแบบ ไค-สแควร์ (Allendorf and Luikart, 2006)

3.1 ความถี่ยีน *BADH2* ในประชากรข้าววัชพืช *O. sativa f. spontanea* และข้าวป่า *O. rufipogon*

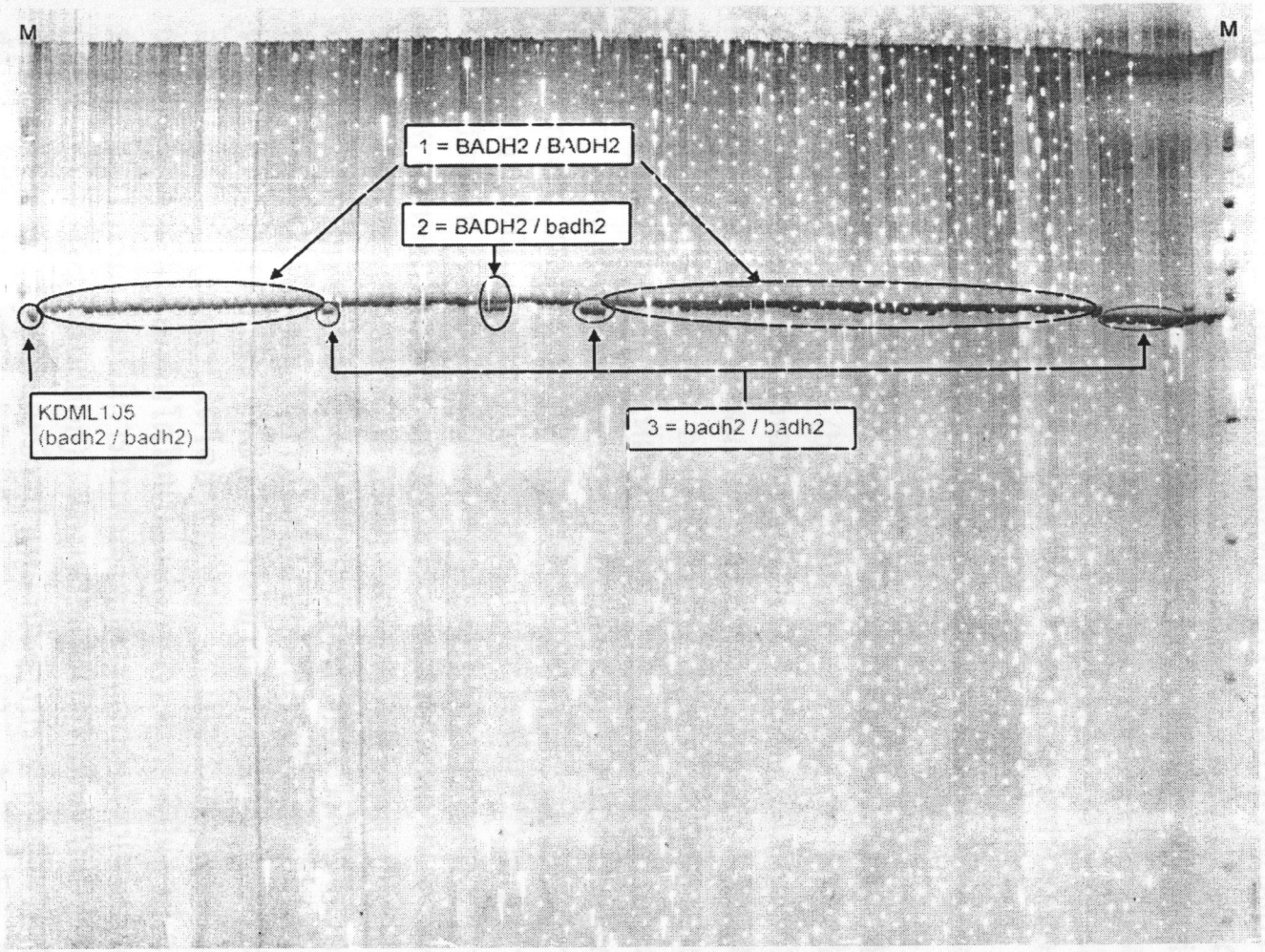
จากผลการวิเคราะห์ยีโนไทป์ของยีน BADH2 ในข้าววัชพืชจำนวน 215 ต้น พบว่าข้าววัชพืชมียีโนไทป์ 3 แบบ คือ NN (homozygous non-fragrant) ND (heterozygote) และ DD (homozygous fragrant) (N หมายถึง ไม่เกิดการกลาย 8-bp deletion ที่ตำแหน่งหนึ่งใน exon7; D หมายถึง เกิดการกลาย 8-bp deletion ตรงตำแหน่งนั้น) มีรายละเอียดแสดงในตารางที่ 1 ในข้าวป่าพบยีโนไทป์แบบเดียวคือ NN

ตารางที่ 1 ข้าววัชพืชและข้าวป่าที่เก็บตัวอย่าง จำนวนตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ จำนวนยีโนไทป์ทั้ง 3 แบบของยีน BADH2

Species/ sites	Location (District, Province, Country)	Latitude (N)	Longitude (W)	Number of plant examined	Genotype		
					NN	ND	DD
O. sativa f. spotanea **Thai Hom Mali rice fields**	Phayakhaphumpisai, Maha Sarakham, Thailand	15° 26'	103° 24'	215	51	93	71
O. rufipogon **Pond, near by Thai Hom Mali rice fields**	Phayakhaphumpisai, Maha Sarakham, Thai and	15° 28'	103° 29'	99	99	0	0

ตารางที่ 2 ความถี่ของอัลลีลของยีน BADH2 ในประชากรข้าววัชพืช การทดสอบ Goodness-of-fit พบว่าไม่มีนัยสำคัญทางสถิติแสดงว่าการกระจายของยีน BADH2 อยู่ในสภาวะสมดุลตามกฎ Hardy-Weinberg

Genotype frequencies			**Total**
BADH2/BADH2	**BADH2/badh2**	**badh2/badh2**	
51	93	71	215
Allele frequencies			
BADH2 allele = 0.453		D allele = 0.547	
Goodness–of-fit χ^2 = 3.5, d.f. =1 (P > 0.05)			



ภาพที่ 1 ภาพถ่ายเจลที่แสดง 3 ยีโนไทป์ (BADH2/BADH2, BADH2/badh2 และ badh2/badh2) ของยีน BADH2 ในข้าววัชพืช

3.2 วิวัฒนาการของยีน BADH2 ในข้าววัชพืช

การศึกษา weed genomics เป็นการศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้าง หน้าที่และวิวัฒนาการของจีโนม ผลที่ได้รับจากการศึกษา จีโนมิก มีความสำคัญในเชิงเศรษฐกิจ กล่าวคือ จะได้ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับความสามารถของวัชพืชในการถ่ายเทยีนระหว่างวัชพืชกับพืชปลูก ซึ่งสามารถใช้ในการทำนายการถ่ายเทยีนระหว่างพืชปลูกที่ผ่านการดัดแปรทางพันธุกรรม หรือ GMO หรือถ้ามีความรู้เกี่ยวกับการบริหารจัดการวัชพืชในกรณีที่วัชพืชได้รับยีนใหม่ๆเข้าสู่ประชากร (Basu et al. 2004) ซึ่งในแต่ละพื้นที่มีการศึกษาความสามารถในการถ่ายเทยีนระหว่างพืชป่า พืชปลูกและวัชพืชเพื่อนำไปใช้เกี่ยวกับการบริหารจัดการพืชดัดแปรพันธุกรรม ตัวอย่างเช่นในภูมิภาคเอเชียใต้ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เป็นแหล่งกำเนิดของข้าว มีผู้สนใจศึกษาเกี่ยวกับการถ่ายเทยีนระหว่างข้าวที่อยู่ในกลุ่มจีโนม AA ความสัมพันธ์ระหว่างศัตรูพืช การออกดอก เพื่อใช้ในการบริหารจัดการทรัพยากรเชื้อพันธุ์ข้าวป่าที่มีอยู่ในธรรมชาติ (Cohen et al. 2008) ตัวอย่างข้าววัชพืชที่สำรวจและเก็บตัวอย่างมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าสัดส่วนของอัลลีลที่สร้างสารหอม (badh2 allele) เท่ากับ 0. 547 ซึ่งมากกว่าสัดส่วนของอัลลีลสร้างสารหอม (BADH2 allele) มีค่าเท่ากับ 0.453 ความถี่ของยีนนี้อยู่ในภาวะสมดุลตามกฎฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก มีข้อค้นพบจากการวิจัยนี้ว่า ยีโนไทป์แบบ badh2/badh2 ไม่พบในข้าวป่าจากตัวอย่างที่เก็บจากทุ่งกุลาร้องไห้ ชี้ให้เห็นว่าอัลลีล badh2 ที่พบในประชากรข้าววัชพืช มีจุดกำเนิดจากข้าวหอมมะลิที่ปลูกในบริเวณนี้ที่เริ่มปลูกข้าวหอมมะลิมากกว่า 20 ปีมาแล้ว โดยมีการถ่ายเทยีนจากข้าวปลูกคือข้าวหอมมะลิไปยังข้าวป่าที่มีถิ่นอาศัยบริเวณนี้ เกิดเป็นข้าววัชพืชที่มีวิวัฒนาการเรื่อยมาจวบจนปัจจุบัน ข้าววัชพืชที่ทุ่งกุลาร้องไห้ที่มีรายงานผลการวิจัยไปแล้วพบว่ามีความหลากหลายทางสัณฐานวิทยาและความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงมาก (Prathepha 2009) และข้าววัชพืชเหล่านี้ยังคงปรากฏให้เห็นในแปลงปลูกข้าวหอมมะลิในทุ่งกุลาร้องไห้ตลอดไปเนื่องจากบริเวณที่พบข้าววัชพืชเป็นบริเวณที่มีข้าวป่าที่มีอายุขัยหลายปีอาศัยอยู่เดิมและมีการทำนาแบบหว่านแห้งแล้วไถกลบ ทำให้ข้าววัชพืชยังไม่มีการกำจัดออกไปจากแปลงปลูกข้าวเหล่านี้ได้โดยธรรมชาติ เมื่อเริ่มฤดูเพาะปลูกใหม่ข้าววัชพืชจะงอกและเจริญเติบโตในแปลงปลูกข้าวหอมมะลิปีแล้วปีเล่า รวมทั้งข้าวป่าที่มีอายุขัยหลายปีมีการสืบพันธุ์โดยการแตกต้นใหม่จากลำต้นเดิม (vegetative reproduction) และเจริญเติบโตในพื้นที่นี้และเกิดการผสมข้ามระหว่างข้าวหอมมะลิและข้าวป่าเหล่านี้สร้างประชากรข้าววัชพืชรุ่นใหม่ขึ้นมาทุกๆปี ซึ่งมีการถ่ายเทยีนระหว่างข้าวปลูกกับข้าวป่าจนได้ลูกผสมเกิดขึ้น

3.3 การถ่ายเทยีนจากข้าววัชพืชมายังข้าวปลูก

การตรวจสอบหาอัลลีลเด่น ของยีน BADH2 ในประชากรข้าวหอมมะลิที่อาจเกิดขึ้นเนื่องจากเกิดการถ่ายเทยีนในทิศทางจากข้าววัชพืชซึ่งมียีโนไทป์ที่ไม่สามารถสร้างสารหอมคือ BADH2/BADH2 และ BADH2/badh2 ซึ่งผลจากการตรวจสอบพบว่าประชากรข้าวหอมมะลิที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ครั้งนี้ ไม่พบอัลลีลเด่น BADH2 ในประชากรข้าวหอมมะลิ ผลจากการวิเคราะห์ครั้งนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาพันธุกรรมของข้าววัชพืชเพื่อหาหลักฐานระดับโมเลกุลสนับสนุนการเกิดขึ้นของข้าววัชพืชในทุ่งกุลาร้องไห้ ซึ่งได้ข้อค้นพบที่กล่าวไว้ดังนี้

"weedy rice in this region might originate from the introgression between cultivated rice and *O. rufipogon*, which often takes place in nature, mostly in a one-way process from cultivated rice to *O. rufipogon*." (Prathepha 2009)

จากข้อค้นพบนี้ทำให้เชื่อได้ว่า การถ่ายเทยีนระหว่างข้าวปลูกไปยังข้าวป่ายังเป็นทิศทางที่เกิดขึ้นได้ง่ายดังที่มีงานวิจัยสนับสนุนแนวคิดนี้ ได้แก่ งานวิจัยของ Song et al. (2003) และ Chen et al. (2004) เป็นต้น ในขณะเดียวกันการถ่ายเทยีนในทิศทางจากข้าววัชพืชหรือจากข้าวป่ามายังข้าวปลูกเกิดขึ้นน้อยหรือไม่เกิดขึ้นเลยอันเนื่องจากสาเหตุใดๆก็ตามนั้น ปัจจุบันยังไม่มีรายงานการศึกษาแต่อย่างใด ข้อค้นพบนี้ ทำให้คลายความกังวลที่ว่าข้าวหอมมะลิในแต่ละฤดูปลูกจะปนเปื้อนจากอัลลีล *BADH2* ที่อาจส่งผลทำให้ประชากรข้าวหอมมะลิมีคุณภาพการหุงต้มด้านความหอมลดลงไปจากมาตรฐาน

เอกสารอ้างอิง

Allendorf F.W. and Luikart G. 2006. Conservation and the genetics of populations. Blackwell Publishing, Malden, Massachusetts.

Basu, C., Halfhill M.D. Mueller, T.C. and Stewart Jr C.N. 2004. Weed genomics: new tools to understand weed biology. Trends in Plant Sciences 9:391-398.

Boonchuay P., Maneechote C. Rerkaserm B. and Jamjod S. 2005. weedy rice contamination in farmer's seed after application of clean seed to topping off weedy rice panicle methods. Pp. 155-160, in Maneechote C. and Jamjod S. (Eds.), Proceeding of Weedy Rice Symposium, 21 October 2005, Bangkok, Thailand. Plant Protrction Research and Development Office, Department of Agriculture, Bangkok.

Bradbury L.M., Fitzgerald T.L., Henry R.J., Jin Q.S. and Waters D.L.E. 2005. The gene for fragrance in rice. Plant Biotechnology Journal 3: 363-370.

Cohen M.B., Arpaia S., Lan L.P., Chau L.M. and Snow A.A. 2008. Shared flowering phenology, insect pests, and pathogens among wild, weedy, and cultivated rice in the Mekong Delta, Vietnam: implications for transgenic rice. Environ. Biosafety Res. 7:73-85.

Doyle J.J. and Doyle J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull. 19:11-15.

Chen L.J., Lee D.S., Song Z.P. Suh H.S. and Lu B.R. 2004. Gene flow from cultivated rice (*Oryza sativa*) to its weedy and wild relatives. Annals of Botany 93: 67-73.

Konishi S., Izawa T., Lin S.Y., Ebana K.,Fukuta Y., Sasaki T. and Yano M. 2006. An SNP caused loss of seed shattering during rice domestication. Science 312: 1392-1396.

Kuroda Y., Sato Y.I., Bounphanousay C., Kono Y. and Tanaka K. 2005. Gene flow from cultivated rice (*Oryza sativa* L.) to wild *Oryza* species-(*Oryza rufipogon* Griff. & *O. nivara* Sharma and Shastry) on the Vientiane plain of Laos. Euphytica 142:75–83.

Hentze M.W., Kulozik A.E. 1999. A perfect message: RNA surveillance **and** nonsense-mediated decay. Cell **96:** 307-310

Prathepha, P., 2009. Seed morphological traits and genotypic diversity of weedy rice (*Oryza sativa f. spontanea*) populations found in the Thai Hom Mali rice fields of north-eastern Thailand. Weed Biol. Manag. (in press)

Shi W., Yang Y., Chen S. and Xu M. 2008. Discovery of a new frangance allele and the development of functional marker for the breeding of fragrant rice varieties. Mol Breed., doi:10.1007/s11032-008-9165-7 (in press).

Song Z.P., Xu X., Wang B., Chen J.K. and Lu B.R. 2003. Genetic diversity in the northernmost *Oryza rufipogon* populations estimated by SSR markers. Theor. Appl. Genet., 107: 1492-1499.

ภาคผนวก

Research article ที่ได้จากผลการวิจัยได้ส่งไปที่วารสาร World Applied Sciences Journal

ournal Search

earch Terms: 1818-4952

otal journals found: 1

he following title(s) matched your request:

ournals 1-1 (of 1)

ORMAT FOR PRINT

ORLD APPLIED SCIENCES JOURNAL

imonthly

SSN: 1818-4952

NT DIGITAL ORGANIZATION SCIENTIFIC INFORMATION-IDOSI, C/0 DR ABDEL RAHMAN M AL-AWAHA, MCGILL UNIV, MONTREAL, CANADA, QUEBEC, 00000

overage

cological Record

ournals 1-1 (of 1)

FORMAT FOR PRINT

© 2008 Thomson Reuters

The *badh2* allele of the fragrance (*fgr/BADH2)* gene is present in the gene population of weedy rice (*Oryza sativa* f. spontanea) from Thailand

Preecha Prathepha

Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Mahasarakham University, Khamriang Sub-district, Kantarawichai District, Maha Sarakham Province 44150 Thailand (phone/fax: +6643754238; e-mail: preecha.p@msu.ac.th)

ABSTRACT

The gene population of weedy rice *(Oryza sativa* f. spontanea) is expected to play important role in increasing the genetic diversity of cultivated rice (*Oryza sativa* L.). A candidate gene *(fgr/BADH2)* homologous to *betaine aldehyde dehydrogenase* is responsible for aroma metabolism in fragrant rice varieties. The presence of a dominant BADH2 allele encoding betaine aldehyde dehydrogenase inhibits the synthesis of 2-acetyl-1-pyrroline (2AP), a potent flavor component in rice fragrance. By contrast, its recessive alleles, *badh2*, induce 2AP formation. The present study was carried out to determine the presence of the recessive allele of the fragrance gene of the weedy rice population in an important rice growing area of Northeastern Thailand. Among the 215 weedy rice plants examined, three genotypes, *BADH2/BADH2*, *BADH2/badh2* and *badh2/badh2* were detected. Frequencies of the *badh2* allele showed a high value of 0.547. A test of goodness-of-fit was performed to assess the evolutionary processes influencing this gene locus. The test indicate that the evolutionary process did not play a significant role in influencing the gene locus (χ^2= 3.5, P >0.05). The *badh2* allele was not found in the wild rice populations used in this study. This finding strongly supports the hypothesis that the *badh 2* allele in the weedy rice population originated from fragrant rice cultivars.

Key Words: crop-to-weed gene flow • weedy rice • *Oryza sativa* f. spontanea• fragrance gene

Intoduction

Weedy rice (*Oryza sativa* f. spontanea) has been reported in the northeastern region of Thailand and it might have originated from the introgression between cultivated rice and wild rice, *Oryza rufipogon* which often takes place in nature mostly in one way from cultivated rice to its wild relative [1].

Weedy rice has negative influences in all tropical and subtropical rice growing regions of the world [2]. In Thailand this weed is a major problem for commercial *Thai Hom Mali rice* production in the northeastern region of the country. *Thai Hom Mali rice* is categorized into two rice varieties, Khao Dawk Mali 105 (KDML 105) and RD 15. These two rice varieties are recognized as premium grade in the world rice market because their grain contains a potent flavor component (2-acetly-1-pyroline (2AP). The retail price of these jasmine rice varieties produced in Thailand is higher than that of non-fragrant rice [3].

Bradbury *et al.*[4] reported that the *badh 2* gene was most likely to be the *fgr* gene in rice (*Oryza sativa*). The presence of null *badh 2* (or recessive allele) of the *fgr* gene enhanced 2AP biosynthesis [5]. Historically, traditional rural practices and modern scientific methods have been employed to determine aromatic traits. These methods have included chewing individual seeds, smelling KOH-treated leaf tissue, and measuring 2AP content using the GC-MS method [6]. The *fgr* locus has been proven to be responsible for rice fragrance because of an eight-base-pair (8-bp) deletion in the *bad 2* allele. Consequently, molecular markers liked to the aromatic trait have been extensively exploited to assist breeders in selecting individuals with this trait. An allele-specific perfect marker was developed with which both *BADH 2* and *badh 2* alleles could be simultaneously detected in a single PCR amplification [7]. More recently, an additional null *fgr* allele of the *fragrance* locus in fragrant rice was developed [5],[8]. In addition, by determining the fragrance genotype and phenotype in a wide range of traditional varieties from 23 counties, Fitzgerald *et al.* [9] suggested that the 8-bp deletion in the *fgr* gene is not the only cause of 2AP synthesis; there is at least one other mutation at a second gene locus.

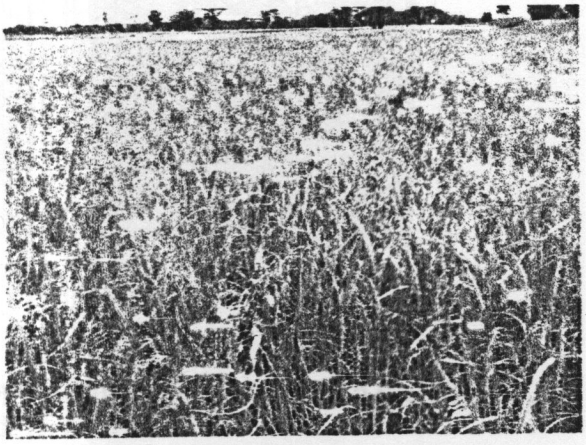
Wild rice (*O. rufipogon* Griff.) populations from Thailand occur along roadsides and rice fields in many locations [10]. *Oryza rufipogon* is thought to be the wild progenitor of *O. sativa* L. The two species hybridize freely, resulting in a conglomerate of hybrids (*O. sativa* f. spontanea) or weedy rice [11]. This weed species is an aggressive weed of rice in many regions of the world [2]. In Thailand, weedy rice infests *Thai Hom Mali rice* production fields in the northeastern region of the country [1]. Rice cultivars cross easily with their related weed form found in direct-seeded paddy fields and produce viable and fertile hybrids; nevertheless, cross-pollination is possible and does indeed take place to some extent, the amount depending largely on climatic and varietal differences. The degree of out-crossing is generally higher in *indica* cultivars and wild species than in *japonica* cultivas [12]. Cross-pollination between wild species of the *Oryza* genus and *O. sativa* cultivars has been reported to occur in natural habitats [11],[13],[14],[15]. Annually, most local Thai farmers in this area used their own self-supplied seed for domestication in the next growing season. These farmer saved seed lots may have dramatically contaminated seed of *Thai Hom Mali rice* with genotype heterozygous, resulting from gene flow between *Thai Hom Mali rice* and weedy rice. In addition, gene flow between cultivated rice and weedy rice, possibly lead to the origin of new weedy rice forms. This event raises the question of the maintenance of cooking quality, i.e. rice grain with fragrance, in *Thai Hom Mali rice* populations despite their co-existence with cultivated weedy forms. The results from a previous assessment to determine whether weedy and wild species can hybridize with rice cultivars to produce fertile offspring of weedy rice in natural conditions of the northeastern region of Thailand, show that gene flow occurred predominantly from *Thai Hom Mali rice* into wild rice [1]. A previous study indicated that some weedy rice is closely related to *O. sativa* while others are related to *O. rufipogon* [16]. In addition Watanabe *et al.* [17] suggested that different rice-growing locations often show different patterns of genetic diversity, depending on the specific combination of germplasm from which weedy rice emerges. In this paper, the weedy rice populations resulted from crop-to-wild gene flow grown in the Thung Kula Ronghai areas, northeastern Thailand were collected and determine the frequencies of fragrance gene (*fgr/BADH2)* by using a PCR assay. Knowledge of the status of the fragrance gene in weedy rice populations in the *Hom Mali rice* fields of northeastern Thailand is useful to in-paddy field management particularly with respect to maintaining cooking quality based on the aromatic characteristic of the

Thai Hom Mali rice that share the same growing area in fields infested with weedy rice that carry the dominant allele of the fragrance gene. While tracing the origin of the *badh 2* allele in the gene population of weedy rice, an abundant number of samples of the Asian wild rice species *O. rufipogon*, which are the original populations grown in swamps in the Thung Kula Ronghai areas, were collected and examined for the *badh2* allele which is responsible for the aromatic characteristic of the fragrance gene.

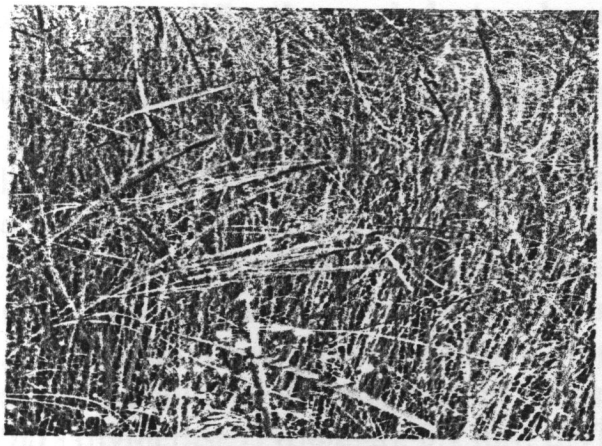
Materials and methodology

Plant materials

In 2007, plant samples were randomly collected by cutting 215 flag leaves from 6 natural populations of weedy rice (*Oryza sativa* f. spontanea) co-occurring within *Thai Hom Mali rice* fields in Northeastern Thailand (Fig. 1). Each flag leaf was placed in a paper bag and kept in a refrigerator (-20°C) until used. During the field survey, 125 individuals of *O. rufipogon* were randomly chosen, and their leaves were collected from the wild rice species. These populations were typical of *O. rufipogon* in the Thung Kula Ronghai areas because they were collected from numerous sites throughout the area of its distribution (Fig. 2).



(A)



(B)

Fig. 1. Paddy field of Thai Hom Mali rice in the Thung Kula Ronghai, northeastern Thailand (A) and weedy rice plant co- occurring in Thai Hom Mali rice fields (B).

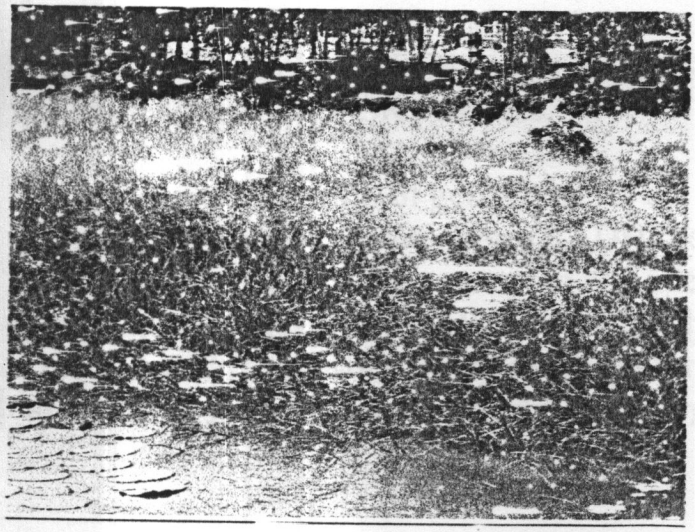


Fig. 2. A typical population of *O. rufipogon* in the Thung Kula Ronghai area, northeastern Thailand.

DNA extraction, PCR amplification and electrophoresis

Genomic DNA was extracted from the leaves of individual plants of the samples using a modified CTAB (cethyltrimetyl ammonium bromide) protocol of Doyle and Doyle [18]. To characterize genotypes of each sample, oligonucleotide primers: F: 5'-TGCTCCTTTGTCAT CACACC-3' and R: 5'-TTTCCACCAAGTTCC AGTGA-3') were used to amplify the fragrance gene located on chromosome 8 as previously reported by Prathepha [19]. Amplifications were performed in a 20 µl reaction mixture containing 2 µl of DNA solution, 50 pmol each of the primer pairs, 2.0 mM $MgCl_2$, 2 units *Taq* polymerase (Promega), 0.1 mM dNTPs. Cycling conditions were 94°C (5 min); then 40 cycles of 94°C (1 min), 60°C (1 min), 72°C (1.5 min), and a final extension of 72°C (5 min). In this experiment, the DNA template from a fragrant rice, Khao Dawk Mali 105 (KDML 105) and a non-fragrant rice, Chai-nart 1 (CN1), were used as positive and negative controls, respectively, for comparison of bands resulting from PCR between fragrant and non-fragrant rice. The PCR products were separated in 4.5% polyacrylamide denaturing gels of 200x125x1 mm (length x width x thickness). After electrophoresis, the bands were stained with silver-stain. The PCR product of approximately 396 bp obtained from KDML 105 was present in every sample with the recessive allele (the 8 bp deletion), whereas the dominant allele gave a product of approximately 404 bp from the cultivar CN 1. From the PCR assay, heterozygote can be discriminated by the presence of both PCR products.

For identification of genotypes for the fragrance gene in the rice samples, the non-fragrance allele (BADH2) of the fragrance gene was used as molecular marker. The genotypic and allelic frequencies of weedy rice plant samples were computed based on Hardy-Weinberg formulations. Goodness-of-fit statistics were calculated for the figure observed compared to values expected using the Hardy-Weinberg equilibrium.

Results

Among the 215 weedy rice plants examined for the *badh 2* allele of the fragrance gene, three genotypes, namely *BADH2/BADH2* (homozygous non-fragrant), *BADH2/badh2* (heterozygote) and *badh2/badh2* (homozygous fragrant) were detected (Fig.3). Frequencies of the *badh2* allele showed a high value of 0.547. Test of goodness-of-fit was performed to assess the evolutionary processes influencing this gene locus. The test indicated the evolutionary processes did not have a significant influence (χ^2= 3.5, P >0.05). This can be indicative that the fragrance locus of weedy rice population was in Hardy-Weinberg equilibrium (Table 1). On the other hand, the *badh2* allele of the fragrance gene was not found in the wild rice samples examined (Fig. 4).

Table 1 Statistical analysis of fragrance gene (*fgr/BADH2*) in sample of weedy rice from Thung Kula Ronghai, northeastern Thailand. Goodness-of-fit testing showed not significant difference suggesting that locus of the fragrance gene is conformed to Hardy-Weinberg equilibrium.

Genotype frequencies			Total
BADH2/BADH2	**BADH2/badh2**	**badh2/badh2**	
51	93	71	215
Allele frequencies			
BADH2 allele = 0.453		badh2 allele = 0.547	
Goodness–of-fit χ^2 = 3.5, d.f. = 1 (P > 0.05)			

Discussion and conclusion

Gene flow can be estimated using direct or indirect methods. For flowering plants, pollen and seed are the two major vectors of gene flow. Much of the work on gene flow has been conducted using indirect methods, such as morphological traits [20] or DNA assay [12]; [21]. In this study DNA marker on the fragrance gene was analyzed and revealed that the cultivar allele (i.e., *badh 2* allele of the fragrance gene) persist at high frequencies in naturally occurring weedy rice populations in Thailand. The *badh2* allele was not found in the wild rice populations used in this study. This evidence strongly supports the hypothesis that the *badh 2* allele in weedy rice population originated from the fragrant rice cultivars. The occurrence of the crop-to-wild gene flow was detected by scoring a simple sequence repeat (SSR) molecular marker [12].

Weedy rice (*Oryza sativa* f. spontanea) is an important resource for breeding and studying the evolution of rice [22]; [23]. Several studies of their genetic characteristics showed that weedy rice strains also appear to be differentiated into *indica* and *japonica* types based on morphological and physiological traits, isozymes, and DNA markers [22], [24], [25]. Weedy rice possesses useful genes conferring tolerance to various biotic and abiotic stress [26]. One advantage of employing weedy rice in a breeding program is that hybrid sterility is not observed, when weedy rice is crossed with cultivars, due to their genetic similarity to cultivars [14]. In this respect, weedy rice is expected to play an important role in increasing the genetic diversity of cultivated rice [22]. However, most weedy rice strains possess seeds with red pericarps and are frequently referred to as red rice although some strains have white pericarps [1]. Morphologically, weedy rice is highly variable and appears to be an intermediate between wild and cultivated rice. Long-term sympatric distribution has led to similarities between weedy and cultivated rice through natural hybridization and introgression, making the control of weedy rice very difficult when compared with other weeds. In Northeastern Thailand weedy rice has re-emerged in the rice planting region of Thunk Kula Ronghai. This region produces rice with the best cooking quality based on the aroma grain characteristic of the two fragrant rice varieties (i.e., Khao Dawk Mali 105 and RD 15). The occurrences of weedy rice in other areas of northeastern region of Thailand have already caused considerable problems for rice production in the region. If it continues to spread, larger production related weed problems may occur, becomes more

frequent and propagate between regions while the manpower needed for weed control diminishes.

The knowledge of the genetics of Thailand's weedy rice hinders the design of effective practical tools and methods for weedy rice management. The results of this study will augment our knowledge and help fill the gaps in our understanding of the levels and distribution of the *badh 2* allele. The results will also provide guidance for effective control programs and assist in the exploration of the origins of weedy rice which may be useful in developing a breeding program.

Acknowledgements

The author thank V. Pilap for laboratory assistance. This work was supported by the TRF/BIOTEC Special Program for Biodiversity Research and Training grant BRT R_251007 and Mahasarakham University.

References

[1] Prathepha P. Seed morphological traits and genotypic diversity of weedy rice *(Oryza sativa* f. spontanea) populations found in Thai Hom Mali rice fields of northeastern Thailand. Weed Biol Manag 2009; (in press).

[2] Mortimer M, Pandey S, Piggin C. In: Baki BB, Chin DV, Mortimer M, Eds. Proceedings of Wild and Weedy Rice in Rice Ecosystems in Asia. A review. Weedy rice: approaches to ecological appraisal and implications for research priorities. Los Banos, Philippines: International Rice Research Institute 2000; 97-105.

[3] Qiu ZJ, Zhang YS. Why fragrance rice produced in Thailand can be sold worldwide? (Chinese) *World Agric. (China)* 2003; 2:33-6.

[4] Bradbury LMT, Henry RJ, Jin Q, Reinke RF, Waters DLE. A perfect marker for fragrance genotyping in rice. Mol Breed 2005; 16: 279-83.

[5] Chen S, Yang Y, Shi WW, Ji Q, He F, Zhang Z, Cheng Z, Liu X, Xu M. *Badh2*, encoding betaine aldehyde dehydrogenase, inhibits the biosynthesis of 2-acetyl-1-pyrroline, a major component in rice fragrance. Plant Cell 2008; 20:1850-61.

[6] Yang DS, Lee KS, Jeong OY, Kim KJ, Kays SJ. Characterization of volatile aroma compounds in cooked black rice. J Agric Food Chem 2008; 56:235-40.

[7] Bradbury LMT, Fitzgerald TL, Henry RJ, Jin QS, Waters DLE. 2005b. The gene for fragrance in rice. Plant Bio J 2005; 3: 363-70.

[8] Shi W, Yang Y, Chen S, Xu M. Discovery of a new fragrance allele and the development of functional marker for the breeding of fragrant rice varieties. Mol Breed 2008; doi:10.1007/s11032-008-9165-7.
[9] Fitzgerald TL, Waters DLE, Henry RJ. The effect of salt on betaine aldehyde dehydrogenase transcript levels and 2-acetyl-1-pyrroline concentration in fragrant and non-fragrant rice *(Oryza sativa)*. Plant Sci 2008: doi:1016/j.plantsci.2008.06.005.

[10] Prathepha P. Genetic variation of wild rice populations from Thailand and the Lao PDR based on molecular markers. Pak J Biol Sci 2008; 11:26-33.

[11] Song ZP, Lu BR, Zhu YG, Chen JK. Gene flow from cultivated rice to the wild species *Oryza rufipogon* under experimental field conditions. New Phytol 2003; 157: 657-65.

[12] Oka Hi. Weedy form of rice. In: Origin of cultivated rice. Elsevier Japan Sci Soc Press, AmsterdamTokyo, 1988;107-14.

[13] Langevin SA, Clay K, Grace JB. 1990. The incidence and effects of hybridization between cultivated rice and its related weed red rice (*Oryza sativa* L.). Evolution 1990; 44:1000–8.

[14] Chen LJ, Lee DS, Song ZP, Suh HS, Lu BR. Gene flow from cultivated rice (*Oryza sativa*) to its weedy and wild relatives. Ann Bot 2004; 93:67-73.
[15] Suh HS, Wang F, Yuan QH, Shi L, Qian Q, Liu WG, Kuang BG, Zeng DL, Liao YL, Cao B, Jia SR. A large-scale field study of transgene flow from cultivated rice (*Oryza sativa*) to common wild rice (*O. rufipogon*) and barnyard grass (*Echinochloa crusgalli*). Plant Biotechnol J 2006; 4: 667-76.

[16] Vaughan KL, Ottis VB, Prazak-Havey AM, Sneller C, Chandler JM, Park WD. Is all red rice found in commercial rice really *Oryza sativa*? Weed Sci 2001; 49:468-76.

[17] Watanabe H, Vaughan DA, Tomooka N. 2000. In: Baki BB, Chin DV, Mortimer M, Eds. Weedy rice complexes: Case studies from Malaysia, Vietnam, and Surinam. Proceedings of Wild and Weedy Rice in Rice Ecosystems in Asia. A review. Los Banos, Philippines: International Rice Research Institute, 2000; 25-34.

[18] Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Focus 1987; 12:13-5.

[19] Prathepha P. The fragrance *(fgr)* gene in natural populations of wild rice *(Oryza rufipogon* Griff.). Genet Resour Crop Evol 2009; (DOI: 10.1007/s10722-008-9337-7).

[20] Kuroda Y, Sato YI, Bounphanousay C, Kono Y, Tanaka K. Gene flow from cultivated rice (*Oryza sativa* L.) to wild *Oryza* species (*Oryza rufipogon* Griff. and *O. nivara* Sharma and Shastry) on the Vientiane plain of Laos. Euphytica 2005; 142: 75-83.

[21] Song ZP, Zhu W, Rong J, Xu X, Chen JK, Lu BR. Evidences of introgression from cultivated rice to *Oryza rufipogon* (Poaceae) populations based on SSR fingerprinting: implications for wild rice differentiation and conservation. Evol Ecol 2006; 20:501-22.

[22] Suh HS, Sato YI, Morishima H. Genetic characterization of weedy rice (*Oryza sativa* L.) based on morpho-physiology, isozymes and RAPD markers. Theor Appl Genet 1997; 94: 316-21.

[23] Gu XY, Kianian SF, Foley ME. Phenotypic selection for dormancy introduced a set of adaptive haplotypes from weedy into cultivated rice. Genetics 2005; 171:695-704.

[24] Cho YC, Chung TY, Suh HS 1995. Genetic characteristics of Korean weedy rice *(Oryza sativa* L.) by RFLP analysis. Euphytica 1995; 86:103-10.

[25] Ishikawa R, Toki N, Imai K, Sato Y, Yamagishi H, Shimamoto Y, Ueno K, Morishima H, Sato T. 2005. Origin of weedy rice grown in Bhutan and the force of genetic diversity. Genet Resour Crop Evol 2005; 52: 395-403.

[26] Oh CS, Choi YH, Lee SJ, Yoon DB, Moon HP, Ahn SN.

Mapping of quantitative trait loci for cold tolerance in weedy

rice. Breed Sci 2004; 54: 373-80.

Fig.3 Polyacrylamide gel electrophoresis of the BADH2 gene by using PCR of 99 accessions of weedy rice (*O.sativa* f. spontanea) and a fragrant rice cultivar (cv. KDML105) which used as positive control for fragrant homozygous (*badh2/badh2)*

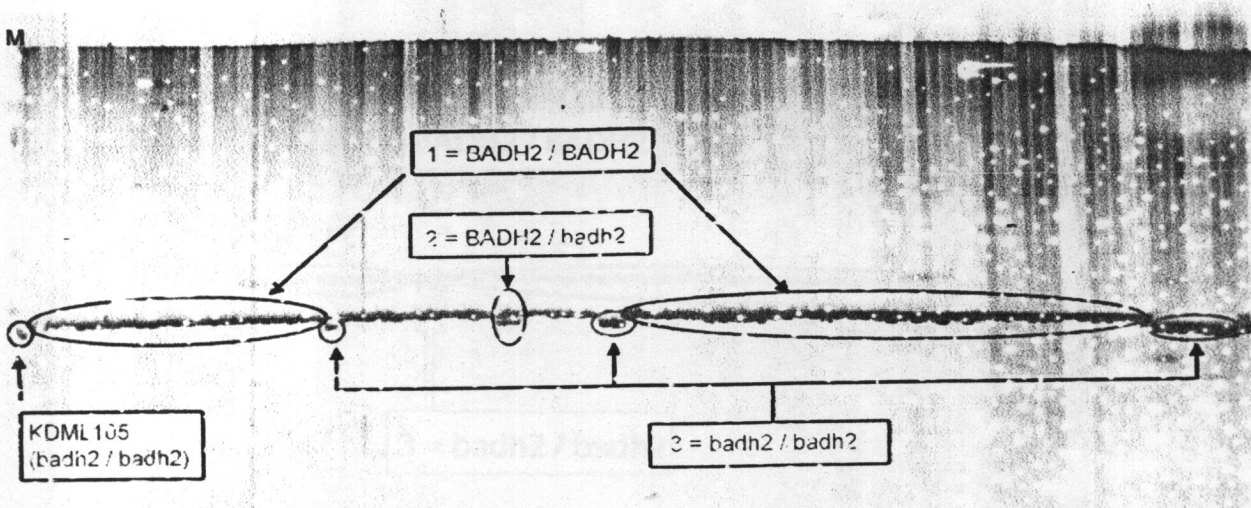


Fig.4 Polyacrylamide gel electrophoresis of the BADH2 gene by using PCR of 99 accessions of wild rice (*O. rufipogon)* carried genotype of non-fragrant homozygous (1=BADH2/BADH2), and a fragrant rice cultivar (cv. Hom Nangh Nuan) carried fragrant homozygous (3=badh2/badh2)which used as positive control for fragrant homozygous (*badh2/badh2)*.