R251149

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษาการกระจายของยีน Os2AP ระดับประชากรในข้าวป่า (*Oryza rufipogon* Griff.) ในไทย ลาวและกัมพูชา โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

An assessment of OS2AP gene distribution in natural wild rice populations (Oryza rufipogon Griff.) in Thailand Laos and Cambodia by using PCR-based DNA markers

โดย

รศ. ดร. ปรีชา ประเทพา และคณะ

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

29 ตุลาคม 2551

RECEIVED
BY [illegible] DATE 29/10/51

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษาการกระจายของยีน Os2AP ระดับประชากรในข้าวป่า (*Oryza rufipogon* Griff.) ในไทย ลาวและกัมพูชา โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

An assessment of OS2AP gene distribution in natural wild rice populations (Oryza rufipogon Griff.) in Thailand Laos and Cambodia by using PCR-based DNA markers

โดย

รศ. ดร. ปรีชา ประเทพา และคณะ

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

29 ตุลาคม 2551

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษาการกระจายของยีน Os2AP ระดับประชากรในข้าวป่า (*Oryza rufipogon* Griff.) ในไทย ลาว และกัมพูชา โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

โดย

รศ. ดร. ปรีชา ประเทพา และคณะ

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย (โครงการ BRT) ผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณโครงการ BRT ที่ได้ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยยืนของข้าวมาอย่างต่อเนื่อง ทำให้ผู้วิจัยสามารถผลิตผลงานวิจัยวิทยาศาสตร์พื้นฐานที่สามารถนำไปตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติได้ อันเป็นแนวทางยกระดับความรู้ความสามารถของนักวิจัยวิทยาศาสตร์พื้นฐานให้มีมาตรฐานเข้าสู่ความเป็นสากลมากขึ้น

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาหลักฐานคือยีนที่กำหนดการสร้างสารหอม 2AP (2-acetyl-1-pyroline) ในข้าวป่าชนิด *Oryza rufipogon* Griff. ที่เป็นบรรพบุรุษของข้าวปลูกเอเชีย (*Oryza sativa* subspecies indica, japonica) เพื่อยืนยันสมมติฐานที่นักวิทยาศาสตร์ได้เสนอในการวิชาการที่กล่าวว่า ข้าวปลูกมีการเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการมาจากข้าวป่า โดยใช้ยีนหอมเป็นหลักฐานโดยใช้เทคนิค PCR และ polyacrylamide gel electrophoresis

ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างดีเอ็นเอของข้าวป่าที่เก็บตัวอย่างจากไทย ลาวและกัมพูชา จำนวน 229 ตัวอย่าง พบว่า ในประชากรข้าวป่ามียีนกำหนดความหอมคือยีน *BADH2* (betaine aldehyde dehydrogenase 2) มีอัลลีลด้อย *badh2* ที่เกิดจากการกลายของเบส ทำให้เบสจำนวน 8 เบสหายไปในลำดับเบสของ exon 7 ของยีนนี้ ส่งผลทำให้ข้าวที่มีอัลลีลนี้สะสมสารหอม 2AP ในสัดส่วนที่เป็นความถี่เท่ากับ 0.23 และเมื่อวิเคราะห์ความถี่ของยีนนี้ในประชากรข้าวป่าโดยใช้การทดสอบไค-สแควร์ พบว่ายีนนี้อยู่ในภาวะสมดุลตามกฎของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก

จากหลักฐานที่พบดังกล่าวนี้ นำไปสู่การเป็นหลักฐานที่สนับสนุนสมมติฐานที่กล่าวว่า ยีนหอมพบในข้าวป่าที่เป็นบรรพบุรุษของข้าวปลูก และข้าวปลูกที่มีความหอมปัจจุบันนี้เกิดการการที่ชาวนาในสมัยโบราณได้นำข้าวป่าที่มียีโนไทป์ที่มีความหอมมาปลูกและคัดเลือกจนได้ลักษณะทางการเกษตรที่ดีแล้วยังมีการคัดเลือกลักษณะที่เป็นความหอมอีกด้วย

Abstract

The Asian cultivated rice, *Oryza sativa* L. (spp. *indica* or *japonica*), is assumed to have originated from one or both of the two wild Asian species, *O. rufipogon* Griff. and *O. nivara* Sharma and Shastry. They occur throughout the monsoon Asia and west Oceania. Fragrance is the most important trait among the domesticated characters of basmati and jasmine rice of Asia. The gene for fragrance in a scented rice shows the presence of a mutated portion (i.e., an eight base pair deletion in exon 7) that result in its loss of its function of fragrance. In the present study, 229 wild rice *O. rufipogon* accessions were genotyped for this locus using a PCR assay. The wild rice species contained the mutated allele of the fgr gene at a low frequencies of 0.23. The surveyed populations were in Hardy–Weinberg equilibrium. This observation supports the hypothesis that the allele for fragrance was already present in the wild rice, and that this trait appeared in scented rice cultivars because of selection by the farmers of genotypes possessing this character during the process of domestication.

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

ยีนกำหนดการสร้างสารหอมในข้าวเป็นยีนที่มีความสำคัญยีนหนึ่ง ยีนนี้จะกำหนดการสังเคราะห์เอ็นไซม์ BADH2 (betaine dehydrogenase 2) ที่มีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์สารหอม 2AP ซึ่งสารหอมชนิดนี้เป็นสิ่งกำหนดคุณภาพการหุงต้มของข้าวหอมพันธุ์ต่างๆ ยีนกำหนดการสร้างสารหอมในข้าวป่าซึ่งเป็นบรรพบุรุษของข้าวปลูกได้ผลการศึกษายีนนี้โดยศึกษาจากดีเอ็นเอเครื่องหมายคือ การกลายแบบ InDel (8-bp deletion) จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการ BRT และองค์ความรู้จากการวิจัยของโครงการนี้ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ เป็นบทความวิจัยแรกที่ปรากฏในวงการวิชาการที่รายงานการพบยีนการสร้างสารหอมในข้าวป่า และนำไปสู่ผลงานที่สร้างความก้าวหน้าในด้านองค์ความรู้ด้านวิวัฒนาการของข้าวเผยแพร่สู่วงการวิทยาศาสตร์ในระดับสากล

Executive Summary

The fragrance (*fgr)* gene of Asian rice (*O. sativa* L.) is of interest in rice domestication. This gene is responsible for the production of the aromatic compound 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) in rice. In the present study, the fragrance gene in wild rice (*O. rufipogon* Griff.) populations were examined for investigating of molecular evidence to support the hypothesis that the fragrance gene was already present in wild, and that this trait appeared in aromatic rice cultivars because of selection by the farmers. This finding is very important to science, therefore the outcome from this research work is a published research article in international journal, resulting from supporting of BRT funding agency. This means that basic knowledge in terms of genetic background in wild rice has been emerged issue for all scientists.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
Abstract	ค
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	ง
Executive Summary	จ
สารบัญภาพ	ช
สารบัญตาราง	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 อุปกรณ์และวิธีการ	4
บทที่ 3 ผลการศึกษาและวิจารณ์	11
เอกสารอ้างอิง	15
ภาคผนวก	17

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1.1	ข้าวป่าที่เป็นบรรพบุรุษข้าวปลูกเอเชีย	5
ภาพที่ 2.1-2.3	แหล่งที่เป็นถิ่นอาศัยข้าวป่าในไทย ลาวและกัมพูชา	8
ภาพที่ 3.1	ภาพถ่ายเจลที่แสดงยีโนไทป์ของยีนหอมในข้าวป่าที่ศึกษา	13

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	รายละเอียดของถิ่นอาศัยและจำนวนยีโนไทป์ของยีนหอมในข้าวป่าที่ใช้ศึกษา	11
ตารางที่ 2	ผลการวิเคราะห์ความถี่ยีนตามกฎฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก	12

บทนำ ๑

ข้าวปลูกเอเชีย (*Oryza sativa* L.) มีจีโนมแบบ AA มีบรรพบุรุษคือข้าวป่าชนิด *Oryza rufipogon* ซึ่งมีจีโนมแบบเดียวกันกับข้าวปลูก การปลูกข้าวเกิดขึ้นเมื่อมนุษย์ในอดีตได้นำข้าวป่าที่ขึ้นอยู่ตามท้องทุ่ง หนองน้ำ ข้าวป่าเหล่านั้นมีความหลากหลายทางพันธุกรรมมาก เมื่อนำมาปลูกและมีการคัดเลือกลักษณะต่าง ๆตามที่ชาวนาต้องการ ก่อให้เกิดความหลากหลายของสายพันธุ์ข้าว คาดว่ามีสายพันธุ์ข้าวไม่น้อยกว่า 200,000 สายพันธุ์ทั่วโลก (Khush, 1997) ลักษณะทางการเกษตรของข้าวที่สำคัญ ๆ ได้แก่ ปริมาณอะมิโลส (ข้าวเหนียว ข้าวเจ้า) สีข้าวกล้อง (pericarp color) การร่วงของเมล็ด (seed shattering) ความหอมในเมล็ด (grain aroma) ซึ่งในประชากรข้าวป่าดั้งเดิมน่าจะพบยีนที่กำหนดลักษณะเหล่านี้อยู่ในยีนพูล

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

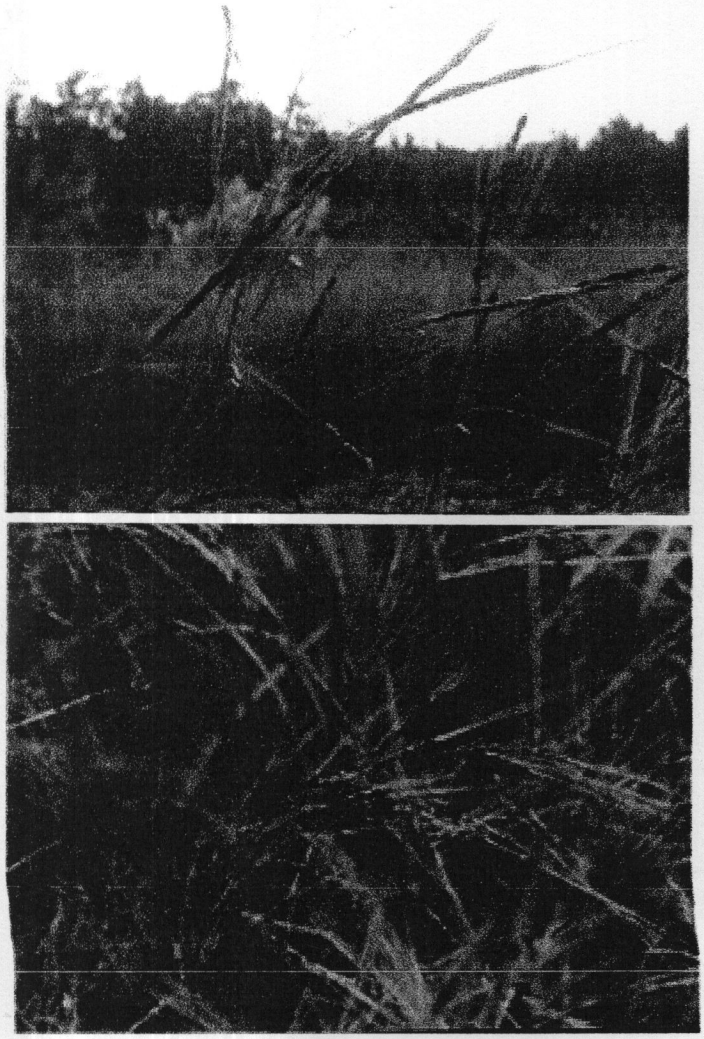
เทคนิควิธีการตรวจสอบยีนที่แสดงความหอมและไม่หอมในข้าว ซึ่งใช้พื้นฐานของเทคนิค PCR ตรวจสอบการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์จำนวน 8 นิวคลีโอไทด์ของ exon 7 ของยีน BADH2 ในข้าวที่สร้างสารหอม 2AP (Bradbury et al., 2005; Shi et al., 2008)

ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ข้าวหอมสายพันธุ์แท้ (aromatic isogenic line) ข้าวไม่หอมที่มีพันธุกรรมแท้ (non-aromatic isogenic line) และข้าวญี่ปุ่นที่ไม่หอมพันธุ์ Nipponbare มียีน Os2AP 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 Os2AP 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) และผลจากการศึกษาพันธุศาสตร์ทั้งแบบดั้งเดิมและระดับโมเลกุล มีข้อค้นพบที่สนับสนุนว่าการเกิดการกลายแบบการขาดหายไปของลำดับเบสจำนวน 8 เบสใน exon 7 เป็นกลไกทางโมเลกุลที่ควบคุมการสะสมสาร 2AP ในพืชชนิดต่างๆที่สามารถสร้างสารชนิดนี้ สารหอม 2AP ในข้าวหอมนั้นตรวจสอบสารหอม 2AP สามารถทำได้ 2 แบบ คือ การดมกลิ่น (sensory test) (Sood and Siddiq, 1978) และวิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพของสารด้วยวิธีการทางเคมี (chemical test) ได้แก่ เทคนิค chromatography (Petrov et al., 1995), gas chromatography/mass spectrometry (GCMS) (Mahatheeranont et al., 1995)

ข้าวป่า 2 ชนิด คือ *Oryza nivara* และ *O. rufipogon* (ภาพที่ 1.1) ซึ่งเชื่อว่าเป็นบรรพบุรุษของข้าวปลูกเอเชีย (*O. sativa* L.) การค้นพบและสามารถแยกยีนที่กำหนดความหอมจากข้าวพันธุ์ปลูก นั้นเป็นแนวทางสำคัญที่จะย้อนรอยสู่การเริ่มต้นปรากฏขึ้นของยีนนี้ในบรรพบุรุษข้าวปลูก ซึ่งหลักฐานทางโมเลกุลจะใช้เป็นเครื่องมือที่สำคัญในการอธิบายถึงจุดกำเนิดของข้าวหอมที่ใช้ลักษณะนี้เป็นแนวทางอธิบายถึงวิวัฒนาการการเพาะปลูกข้าว (rice domestication) โดยเฉพาะการปลูกข้าวป่าที่มียีนควบคุมความหอม จนกลายมาเป็นข้าวปลูกที่มีความหอมมากมายหลายพันธุ์ในปัจจุบัน

จากการตั้งข้อสังเกตนี้ทำให้มีแนวความคิดที่จะศึกษาสถานภาพของยีนที่กำหนดการสร้างสารหอม (Os2AP) ในข้าวป่าชนิด *O. rufipogon* ซึ่งมีการกระจายพันธุ์ในประเทศไทยและประเทศ

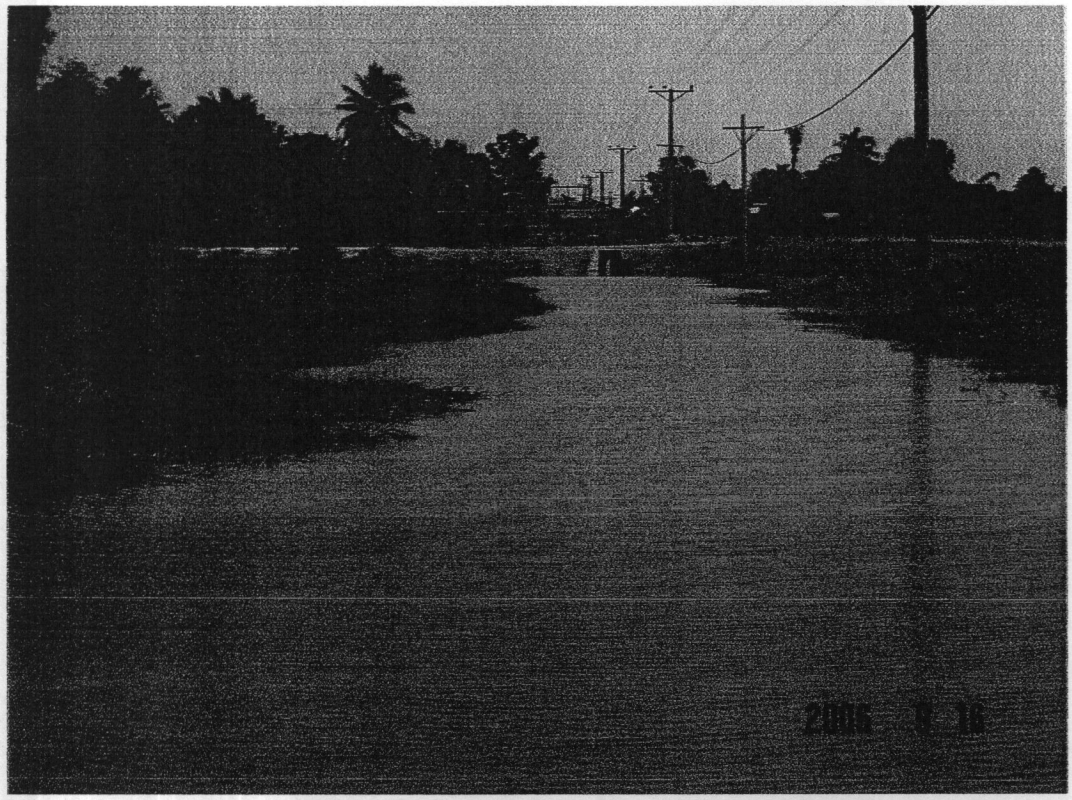
ข้างเคียงคือลาวและกัมพูชาว่ามีการปรากฏของยีนกำหนดการสร้างสารหอมในประชากรข้าวป่าอย่างไรบ้าง ซึ่งผลที่คาดว่าจะได้รับนั้น จะทำให้ทราบว่าสถานภาพของยีนความหอมที่เป็นอัลลีลด้อยในประชากรข้าวป่าว่าเป็นอย่างไร ข้อมูลพื้นฐานที่ได้รับจากการวิจัยนี้อาจนำไปใช้ในการอธิบายเพื่อสนับสนุนว่ายีนความหอมมีวิวัฒนาการร่วมกับวิวัฒนาการการปลูกข้าวหอมหรือไม่อย่างไร?

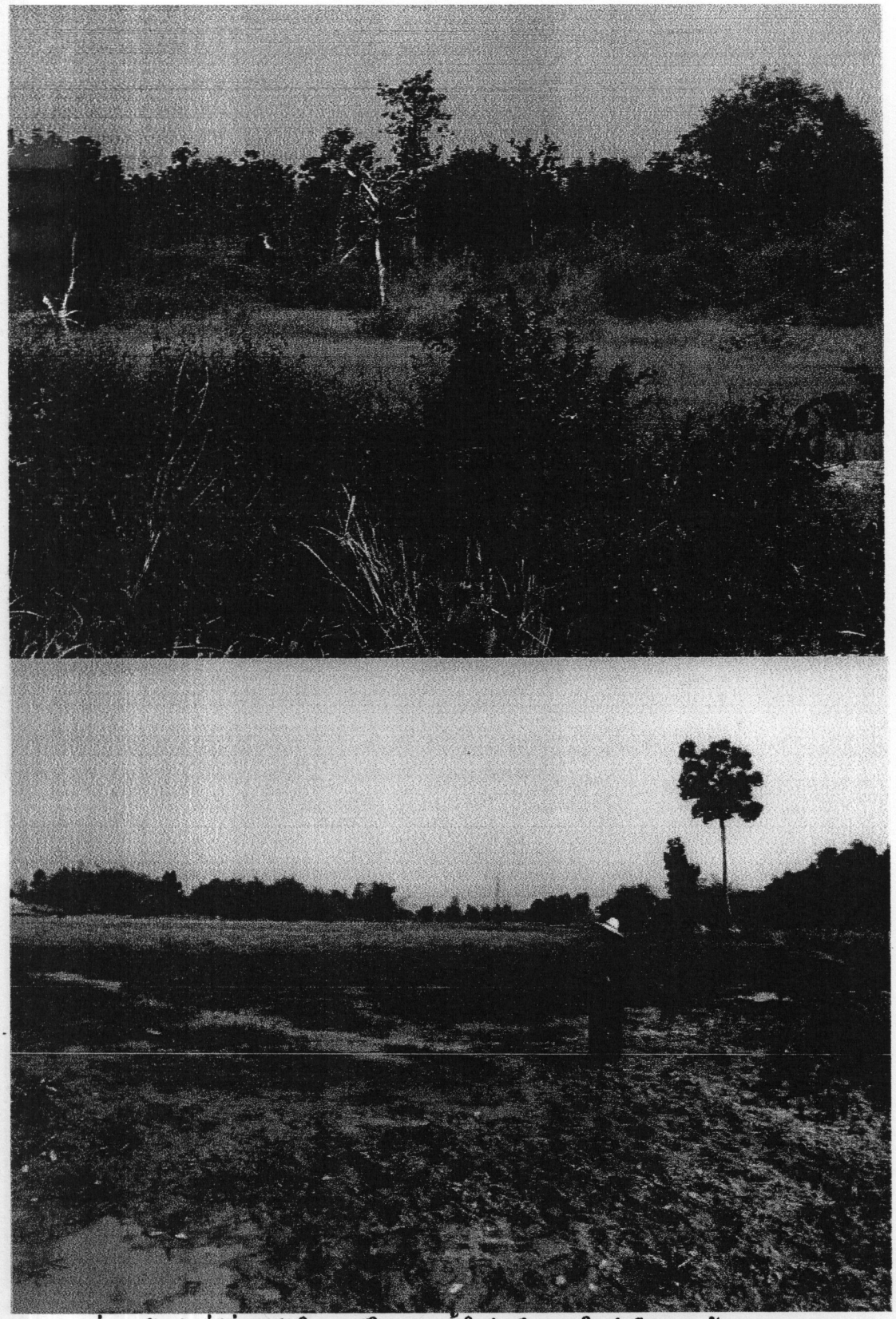


ภาพที่ 1.1 ข้าวป่าชนิด *O. rufipogon* ที่มีอายุหลายปี (perennial type) (บน) และข้าวป่าชนิด *O. nivara* มีอายุปีเดียว (annual type) (ล่าง) ที่มีวิวัฒนาการมาเป็นข้าวปลูกเอเชีย (*O. sativa*)

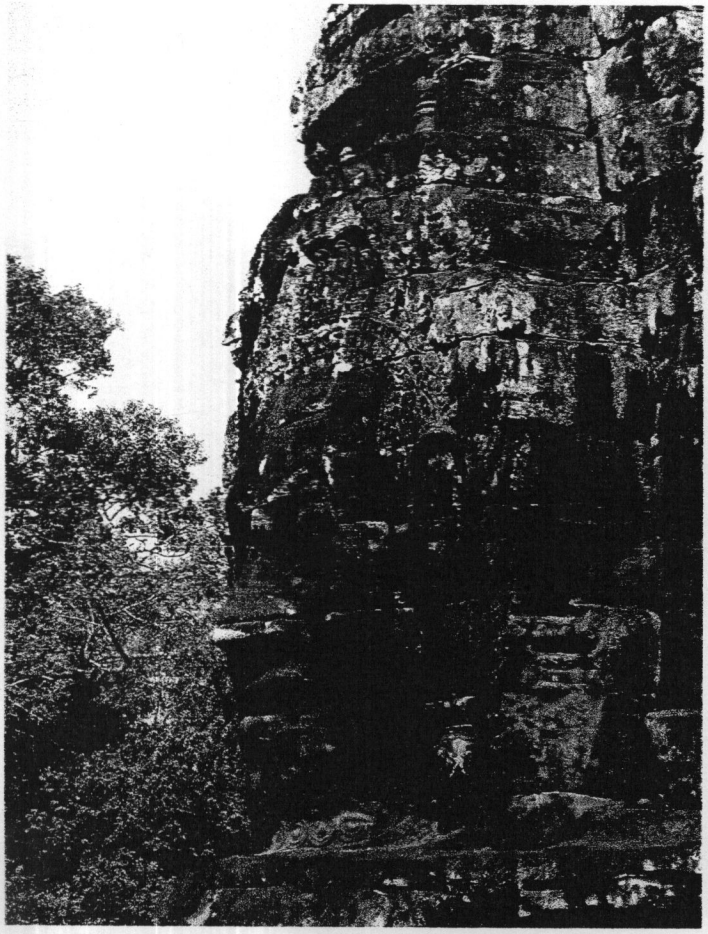
ตัวอย่างข้าวป่าในไทย ลาวและกัมพูชา

เก็บตัวอย่างใบอ่อนหรือลำต้นที่มีส่วนข้อและปล้องของข้าวป่าชนิด *O. rufipogon* เพื่อนำมาใช้สกัดดีเอ็นเอหรือปลูกในกระถางเพื่อเก็บใบอ่อนใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ ข้าวป่าจากไทย ลาวและกัมพูชา ที่เก็บตัวอย่างใช้ในการศึกษามีรายละเอียดแสดงในตารางที่ 1 และภาพประกอบขณะที่เดินทางไปเก็บตัวอย่างข้าวป่า


2006 V 16



ภาพที่ 2.1 ช้าวป่าที่มีถิ่นอาศัยในลาวมีในหนองน้ำในป่า บึงขนาดใหญ่หรือคลองข้างถนน



ภาพที่ 2.2 ช้าวป่าที่มีถิ่นอาศัยในกัมพูชาที่บริเวณหนองน้ำข้างถนน

ภาพที่ 2.3 ข้าวป่าที่มีถิ่นอาศัยในไทย (บึงทุ่งหงส์ พิษณุโลก และหนองหาน สกลนคร)

ขั้นตอนการศึกษา มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1) การสกัดดีเอ็นเอและปฏิกิริยาลูกโซ่

1.1 การสกัดดีเอ็นเอจากใบข้าวนั้นจะใช้วิธี CTAB ตามวิธีการของ Doyle and Doyle (1987)

1.2 การศึกษาดีเอ็นเอเป้าหมายที่แสดงความแตกต่างระหว่างอัลลีล *BADH2* และ *badh2* โดยใช้เทคนิค PCR และ polyacrylamide gel electrophoresis ไพรเมอร์ที่ใช้ในกระบวนการปฏิกิริยาลูกโซ่และขั้นตอนต่างๆที่ใช้ในการวิเคราะห์มีรายละเอียดในบทความวิจัยท้ายเล่มรายงานฉบับนี้

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

3.1 ความถี่ยีน *BADH2* ในประชากรข้าวป่า *O. rufipogon*

จากผลการวิเคราะห์ยีโนไทป์ของยีน BADH2 ในข้าวป่าจำนวน 229 ต้น พบว่าข้าวป่ามียีโนไทป์ 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

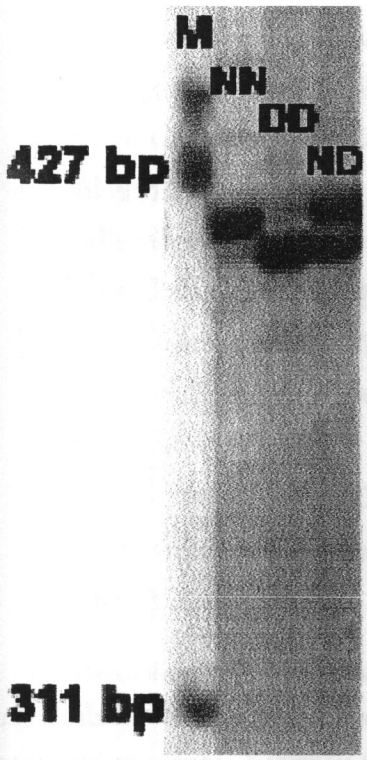
ตารางที่ 1 ตำแหน่งของประชากรข้าวป่าที่เก็บตัวอย่าง จำนวนตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ จำนวนยีโนไทป์ทั้ง 3 แบบของยีน BADH2

Sites	Location (District, Province, Country)	Latitude (N)	Longitude (W)	Number of plant examined	Genotype		
					NN	ND	DD
Ban Klang Noi swamp	Muang, Nakhon Phanom, Thailand	17 08.66	104 46.50	5	1	4	0
Nong Han swamp	Muang,Sakon Nakhon, Thailand	17 07.21	104 12.56	49	44	5	0
Nong Yart swamp	Muang, Nakhon Phanom, Thailand	17 22.65	104 44.25	15	11	4	0
Thung Hong swamp	Wat Boat, Phisanulok, Thailand	17 00.16	100 21.32	3	2	1	0
Nong Vai swamp	Nasaithong, Vientiane, Laos	18 05.18	102 31.79	54	25	17	12
Ban Soa swamp	Muang, Chiangrai, Thailand	19 30.02	099 48.84	16	1	15	0

Ban Non Bor swamp	Phayakhaphumpisai, Maha Sarakham, Thailand	15 26.68	103 24.16	11	11	0	0
Road side ditches	Kasetwisai, Roi Et, Thailand	15 38.56	103 41.33	13	13	0	0
Road side ditches	The Vientiane Plain, Vientiane, Laos	17 52.21 18 19.74	102 39.37 102 40.92	21	12	6	3
Forested swamp	The Vientiane Plain, Vientiane, Laos	18 10.25	102 37.89	36	20	15	1
Siem Riap swamp	Siem Reap, Cambodia	13 41.07	103 81.28	6	1	4	1

ตารางที่ 2 ความถี่ของอัลลีลของยีน BADH2 ในประชากรข้าวป่าจากไทย ลาว และกัมพูชา การทดสอบ Goodness-of-fit พบว่าไม่มีนัยสำคัญทางสถิติแสดงว่าการกระจายของยีน BADH2 อยู่ในสภาวะสมดุลตามกฎ Hardy-Weinberg

Genotype frequencies			**Total**
NN	**ND**	**DD**	
141	71	17	229
Allele frequencies			
N allele = 0.77		D allele = 0.23	
Goodness–of-fit χ^2 = 3.4, d.f. =1 (P > 0.05)			



ภาพที่ 3.1 ภาพถ่ายเจลที่แสดง 3 ยีโนไทป์ (NN, ND และ DD) ของยีน BADH2 ในข้าวป่า

3.2 วิวัฒนาการของยีน BADH2 ในข้าวป่าละข้าวปลูก

การศึกษาประวัติศาสตร์การปลูกพืชหลายชนิดมีการศึกษาโดยใช้หลักฐานทางโบราณคดีและหลักฐานทางพันธุศาสตร์ เช่น ข้าวโพด ข้าวสาลี มะเขือเทศ และข้าว (Zeder et al., 2006) เมล็ดข้าวปลูกที่พบในบริเวณที่ขุดค้น ไม่สามารถที่จะระบุได้ว่าเป็นซับสปีชีส์ ใด (subspecies *indica* หรือ *japonica*) โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Vitte et al., 2004) ดังนั้นถ้าจะเข้าใจประวัติศาสตร์การปลูกข้าวให้ดียิ่งขึ้น จำเป็นต้องใช้ข้อมูลจากการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ ของประชากรข้าวดั้งเดิมทั้งข้าวป่าและข้าวปลูก (Doebley et al., 2006) ผลที่ตามมาหลังจากที่มีรายงานผลการศึกษาลำดับเบสของจีโนมข้าวทั้ง 2 ซับสปีชีส์ ทำให้มีการศึกษาถึงตำแหน่งของยีนที่กำหนดลักษณะทางการเกษตรที่สำคัญๆ ปัจจุบันพบว่ามีการค้นพบและรายงานตำแหน่งละลำดับเบสของยีนข้าว ได้แก่ Waxy gene (กำหนดการสร้างแป้งอมิโลส) Rc gene (กำหนดการสร้างสารสีแดงในเนื้อเยื่อ pericarp)(Sweeney et al., 2006) SHA1 (กำหนดการร่วงง่ายของเมล็ด) (Konishi et al., 2006) และ BADH2 gene (กำหนดการสร้าง

สารหอม 2AP)(Bradbury et al., 2005) ยีน SHA1 ที่พบในข้าวปลูกเป็น อัลลีลด้อย ซึ่งไม่พบในข้าวป่า ผลจากการศึกษาในยีน BADH2 พบในข้าวป่าที่เป็นบรรพบุรุษข้าวปลูก ซึ่งยีนตำแหน่งนี้เป็นยีนที่มีอยู่แล้วในข้าวป่าและมนุษย์ได้นำข้าวป่าที่มีความหลากหลายของยีนที่กำหนดการสร้างสารหอม 2AP มาปลูกและคัดเลือกข้าวป่าที่มีอัลลีลแสดงความหอมอยู่ในข้าวปลูกที่มีความหอมในปัจจุบัน แนวคิดที่นำพืชป่าที่มียีนดั้งเดิมมาปลูกจนกลายเป็นพืชปลูกที่มียีนดั้งเดิมหรือยีนมีการกลายไปจากยีนดั้งเดิมนี้เสนอโดย Sweeney and McCouch (2007) ซึ่งการค้นพบยีนที่กำหนดการสร้างสารหอมในข้าวป่าซึ่งเป็นผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ เป็นข้อมูลสนับสนุนงานวิจัยอื่นๆ ที่พบว่าอัลลีลที่กำหนดการเพิ่มขนาดของผลในมะเขือเทศหรือยีนที่กำหนดการเพิ่ม apical dominance ในข้าวโพด อัลลีลที่กล่าวถึงนี้พบในพืชป่าที่เป็นบรรพบุรุษของพืชปลูกเหล่านี้ (Nesbitt and Tanksley, 2002)

จากแนวคิดการเกิดการเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการของข้าวป่า จากตัวอย่างข้าวป่าที่สำรวจและเก็บตัวอย่างมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าสัดส่วนของอัลลีลที่ไม่สร้างสารหอม (N allele) เท่ากับ 0.77 ซึ่งมากกว่าสัดส่วนของอัลลีลสร้างสารหอม (D allele) มีค่าเท่ากับ 0.23 และแยกได้เป็นยีโนไทป์แบบ heterozygous มีสัดส่วนร้อยละ 31 และยีโนไทป์แบบ homozygous สัดส่วนดังกล่าวนี้อยู่ในภาวะสมดุลตามกฎฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก มีข้อค้นพบจากการวิจัยนี้ว่า ยีโนไทป์แบบ DD ไม่พบในข้าวป่าจากตัวอย่างที่เก็บจากประเทศไทย ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า ตัวอย่างที่มียีโนไทป์ DD นี้ไม่ได้เก็บตัวอย่างในกลุ่มตัวอย่างครั้งนี้ หรืออาจเป็นเพราะข้าวป่าที่มียีโนไทป์ DD อาจสูญพันธุ์ไปแล้ว อัลลีลด้อยของยีนกำหนดการสร้างสารหอมคือ *badh2* ที่พบในข้าวป่าและข้าวปลูกนั้น ทำให้มีหลักฐานที่แสดงให้เห็นว่าข้าวป่ามีอัลลีลด้อยนี้อยู่เดิมก่อนที่มนุษย์จะนำข้าวป่ามาปลูกและคัดเลือกจนได้ข้าวปลูกที่มีอัลลีลด้อยดังกล่าวทำให้ได้ข้าวหอมในปัจจุบัน หลักฐานที่ยืนยันว่าอัลลีลด้อยของยีน *BADH2* มีอยู่ในประชากรข้าวป่าอยู่แล้ว คือ พบว่ามีอัลลีลด้อยในประชากรข้าวป่าที่ไม่มีข้าวปลูกอยู่ใกล้กันทำให้ประชากรข้าวป่าแหล่งนี้แยกจากข้าวปลูกอย่างเด็ดขาด (หรือ isolated population) ประชากรข้าวป่านี้พบในหนองน้ำธรรมชาติในป่าเต็งรังของสปป. ลาว ส่วนประชากรข้าวป่าอื่นๆที่พบความถี่ของอัลลีลด้อยในสัดส่วนที่มาก เช่น ในประชากรข้าวป่าจากจังหวัดเชียงราย (บ้านเสาร์) และหนองหวาย (สปป. ลาว) อาจมีสาเหตุมาจากการถ่ายเทยีนจากข้าวหอมพันธุ์ กข 6 และ/หรือ ขาวดอกมะลิ 105 ไปยังประชากรข้าวป่าเหล่านั้นได้ ดังที่มีรายงานการถ่ายเทยีนระหว่างข้าวปลูกกับข้าวป่าจนได้ลูกผสมเกิดขึ้น (Song et al., 2003; Chen et al., 2004) ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นจากงานวิจัยนี้ คือบทความวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ภาคผนวกของเอกสารเล่มนี้)

เอกสารอ้างอิง

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

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.

Doebley J., Gaut B.S. and Smith B.D. 2006. The molecular genetics of crop domestication. Cell 29: 1309-1321.

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.

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

Louis M., Bradbury T., Henry R.J., Jin Q., Reinke R.F. and Waters D.L.E. 2005. A perfect marker for fragrance genotying in rice. Molecular Breeding 16: 279-283.

Mahatheeranont, S., Promdang S. and Chaimpiriyakul A. 1995. Volatile aroma compound of Khao Dawk Mali 105. Kasetsart J. (Nat. sci.), 29: 508-514

Nesbitt T.C. and Tanksley S.D. 2002. Comparative sequencing in the genus Lycopersicon. Implications for the evolution of fruit size in the domestication of cultivated tomatoes. Genetics 162: 365-379.

Petrov M., Danzart M., Giampaoli P., Faure J. and Richard H. 1996. Rice aroma analysis Discrimination between a scented and a non scented rice. Sci Aliments, 16:347–360 .

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.

Sood B.C. and Sidiq E.A. 1978. A rapid technique for scent determination in rice. Indian J. Genetic Plant Breed., 38: 268-271.

Sweeney M.T., Thomson M.J., Pfeil B.E., McCouch S. 2006. Caught red-handed: *Rc* encodes a basic helix-loop-helix protein conditioning red pericarp in rice. Plant Cell, 18:283–294

Sweeney M. and McCouch S.R. 2007. The complex history of the domestication of

rice. Annals of Botany 100: 951-957.

Vitte C., Ishii T., Lamy F., Brar D. and Panaud O. 2004. Genomic paleontology provides evidence for two distinct origins of Asian rice (*Oryza sativa* L.). Mol. Gen. Genomics 272: 504-511.

Zeder M.A., Emshwiller E., Smith B.D. and Bradley D.G. 2006. Documenting domestication: the intersecton of genetics and archaeology. Trends Genet. 22: 139-155.

ภาคผนวก

Research article ที่ได้จากผลการวิจัยที่วารสาร Genetic Resources and Crop Evolution รับลงตีพิมพ์แล้ว

Genetic Resources and Crop Evolution
An International Journal
© Springer Science+Business Media B.V. 2008
10.1007/s10722-008-9337-7

Research Article

The fragrance (*fgr*) gene in natural populations of wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.)

Preecha Prathepha[1] ✉

(1) Department of Biotechnology, Mahasarakham University, Main Road, Muang District, Mahasarakham, 44000, Thailand

✉ **Preecha Prathepha**
Email: preecha.p@msu.ac.th

Received: 2 January 2008 **Accepted:** 14 April 2008 **Published online:** 10 May 2008

Abstract The Asian cultivated rice, *Oryza sativa* L. (spp. *indica* or *japonica*), is assumed to have originated from one or both of the two wild Asian species, *O. rufipogon* Griff. and *O. nivara* Sharma and Shastry. They occur throughout the monsoon Asia and west Oceania. Fragrance is the most important trait among the domesticated characters of basmati and jasmine rice of Asia. The gene for fragrance in a scented rice shows the presence of a mutated portion (i.e., an eight base pair deletion in exon 7) that result in its loss of fragrance. In the present study, 229 wild rice *O. rufipogon* accessions were genotyped for this locus using a PCR assay. The wild rice species contained the mutated allele of the fgr gene at a low frequencies of 0.23. The surveyed populations were in Hardy–Weinberg equilibrium. This observation supports the hypothesis that the allele for fragrance was already present in the wild rice, and that this trait appeared in scented rice cultivars because of selection by the farmers of genotypes possessing this character during the process of domestication.

Keywords Aromatic rice - Fragrance gene - *Oryza rufipogon* - Rice domestication - Wild rice

Introduction

The perennial *Oryza rufipogon* Griff. is distributed throughout tropical Asia and Oceania, and the annual *O. nivara* Sharma and Shastry is restricted to tropical continental Asia (Vaughan *1989*). These two wild rice species have played important roles as valuable genetic resources in yield rice breeding programs (Xiao et al. *1998*; Tian et al. *2006*). There have been many recent publications concerning rice domestication (e.g., Konishi et al. *2006*; Londo et al. *2006*; Sweeney and McCouch *2007*). Sweeney and McCouch (*2007*) stated that there is still continuing debate over whether *O. rufipogon*, the perennial species, *O. nivara*, the annual species, or possibly both were the direct ancestors of Asian cultivated rice (*O. sativa* L.). Over the past decade, researchers have begun to identify the specific genes that control some of the most important morphological changes associated with domestication (Doebley et al. *2006*).

Among the domesticated genes, the *frg* gene of Asian rice (*O. sativa*) is of interest in rice domestication and improvement. This gene is responsible for the production of the aromatic compound 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) in rice. Nowadays, the demand for fragrant rice has increased markedly in both traditional and non-traditional rice consuming countries, and the consumers are willing to pay a premium price for fragrant rice (Bradbury et al. *2005a*). Fortunately, the availability of the rice genome sequence has provided an opportunity to discover the gene responsible for fragrance by the comparison of the sequences of fragrant and non-fragrant genotypes. This allowed the re-sequencing of genes and genomic sequences in a fragrant genotype demonstrating a recessive gene located on chromosome 8 that controls the level of aromatic compound 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) (Bradbury et al. *2005b*). The structure of the fragrance gene (*fgr*) comprises 15 exons interrupted by 14 introns. Fragrance is a recessive trait, the alleles from fragrant varieties all showed the presence of mutations (i.e., the 8 bp deletion in exon 7), resulting in a loss of function of the fragrance gene product. Bradbury et al. (*2005a*) suggested that fragrance in the two domesticated rice types, basmati and jasmine rice, apparently originated from a common ancestor and may have evolved in a genetically isolated population, or may be the outcome of a separate domestication event.

Investigations of the geographic and genetic distribution of alleles existing in Asian wild rice will allow scientists to better understand the gene pool of the ancestors of Asian cultivated rice and provide an evolutionary perspective to conservation and germplasm management of wild rice. By tracing the origin of the alleles of domestication genes and the paths they traveled to achieve their current distribution, we will gain fresh insights into the history of human interactions, a history that has not been recorded but is written in the genomes of plants (Sweeney and McCouch *2007*). It is therefore interesting to trace the origin of the *fgr* gene. In the present study, a large number of samples of the Asian wild rice species *O. rufipogon* were collected and examined for the allele, which is responsible for the fragrance of the *fgr* gene by using a polymerase chain reaction (PCR) assay.

Materials and methods

Plant materials

The Asian wild rice samples with the perennial form *O. rufipogon* used in the present study. A total of 229 accessions were collected from the northern, northeastern and central regions of Thailand, the Plain of Vientiane of the Lao PDR and Siem Reap Province, Cambodia. Among them, a forested swamp containing this wild rice was of particular interest as it is an isolated population well away from cultivated rice fields. The collection was made between May and December 2005–2007. The collection sites are listed in Table 1. The exact location of each site was documented using a global positioning system (GPS) from GARMIN (iQue 3600, Garmin Co. Ltd.). Young leaves were collected individually from at least three individuals per population. *O. rufipogon* is a spreading perennial plant with vegetative growth. Samples were collected randomly at an interval of at least 5 m from one another to prevent the collection of multiple samples from a single gene, as suggested by Gao (*2004*).

Table 1 Location of the populations of *O. rufipogon* in the present work and distribution of allele of the *fgr* gene

Sites	Location (District, Province, Country)	Latitude (N)	Longitude (W)	Number of plant examined	Genotype		
					NN	ND	DD
Ban Klang	Muang, Nakhon Phanom,	17°	104° 46.50′	5	1	4	0

Noi swamp	Thailand	08.66′					
Nong Han swamp	Muang,Sakon Nakhon, Thailand	17° 07.21′	104° 12.56′	49	44	5	0
Nong Yart swamp	Muang, Nakhon Phanom, Thailand	17° 22.65′	104° 44.25′	15	11	4	0
Thung Hong swamp	Wat Boat, Phisanulok, Thailand	17° 00.16′	100° 21.32′	3	2	1	0
Nong Vai swamp	Nasaithong, Vientiane, Laos	18° 05.18′	102° 31.79′	54	25	17	12
Ban Soa swamp	Muang, Chiangrai, Thailand	19° 30.02′	099° 48.84′	16	1	15	0
Ban Non Bor swamp	Phayakhaphumpisai, Maha Sarakham, Thailand	15° 26.68′	103° 24.16′	11	11	0	0
Road side ditches	Kasetwisai, Roi Et, Thailand	15° 38.56′	103° 41.33′	13	13	0	0
Road side ditches	The Vientiane Plain, Vientiane, Laos	17° 52.21′	102° 39.37′	21	12	6	3
		18° 19.74′	102° 40.92′				
Forested swamp	The Vientiane Plain, Vientiane, Laos	18° 10.25′	102° 37.89′	36	20	15	1
Siem Reap swamp	Siem Reap, Cambodia	13° 41.07′	103° 81.28′	6	1	4	1

Primer design

A draft sequences of the genome of the Thai rice variety Khao Dawk Mali 105 (KDML 105, *O. sativa* L. subspecies *indica*), a fragrant rice cultivar, and a non-fragrant rice variety were obtained from the freepatentsonline web site (www.freepatentsonline.com/20060168679.html). This document lists the DNA sequences of oligonucleotide primers (i.e., Os2AP-exon7.1F: 5′-TGCTCCTTTGTCAT CACACC-3′ and Os2AP-exon7.1R: 5′-TTTCCACCAAGTTCC AGTGA-3′) (Fig. 1), which were used to amplify the fragrance gene located on chromosome 8. The oligonucleotide primers were synthesized by BSU (BioService Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency, Bangkok, Thailand).

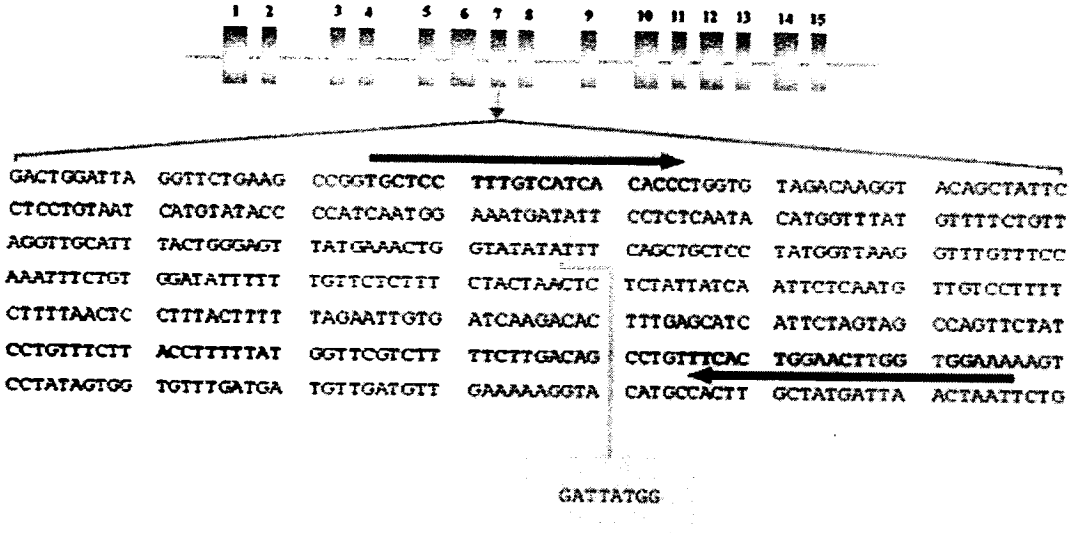


Fig. 1 Schematic representation of the *fgr* gene [Knowledge based Oryza Molecular Biological Encyclopedia (KOME) ID: j023088C02] showing the 8 bp deletion (GATTATGG) occurring between nucleotide A and T (indicated by the open circle) in the DNA sequence of exon 7. Arrows located above or below the bold letters indicate the DNA sequences of forward and reverse primers, respectively

DNA extraction and polymerase chain reaction

Genomic DNA was extracted from the young leaves of each wild rice sample according to the protocol of Doyle and Doyle (*1987*). PCR amplification of the *fgr* gene was performed using the primer pairs as mentioned above. The PCR reaction was 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). Using these primer pairs, the DNA template from a fragrant rice, KDML 105 and a non-fragrant rice, Chainart 1(CN1, *O. sativa* L. subspecies *indica*), were used as positive and negative controls, respectively, in the experiment 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 200 × 125 × 1 mm (length × width × thickness). After electrophoresis, the bands were stained with silver-stain. The PCR product of approximately 396 bp obtained from Thai jasmine rice (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 Thai non-fragrant rice (CN 1). From the PCR assay, heterozygotes can be discriminated by the presence of both PCR products. The PCR products showing the 8 bp deletion and/or non-deletion were further analyzed to confirm that they were the target-amplified fragment using the direct sequencing of the PCR products. These products were purified using a Pharmacia purification kit (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA). The PCR products were analyzed on an ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, Foster City, CA).

The genotypic and allelic frequencies 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 (Allendorf and Luikart *2006*).

Results

The different genotypes and the distribution of the recessive allele of the *fgr* gene in wild rice samples used in the present study are shown in Table 1. Overall, a total number of 17, 71 and 141 individuals were genotyped for DD (allele D, 8 bp deletion), ND (heterozygote) and NN (allele N, non-deletion), respectively. Among theses population surveyed, two populations (Ban Non Bor swamp and a Road side ditches of Thailand) lack the recessive allele of the *fgr* gene. The data from the eleven populations combined shows that 31% of the samples were heterozygous (Fig. 2), this means that this genotype carried one allele, which is the recessive allele of the *fgr* gene. The overall allelic frequencies were 0.23 and 0.77 for D and N alleles, respectively. The distribution did not differ significantly from that expected under Hardy–Weinberg equilibrium ($\chi^2 = 3.4$, $P > 0.05$) (Table 2).

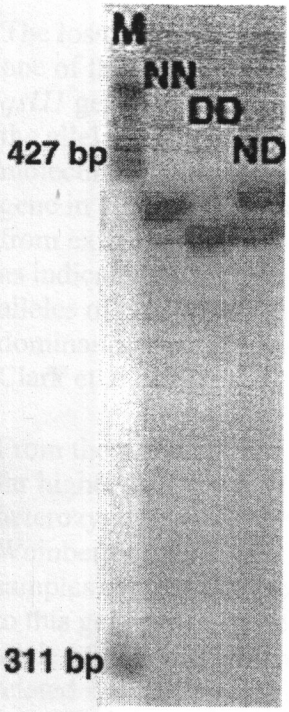


Fig. 2 Photo of PCR products in a 4.5% polyacrylamide gel showing three genotypes (NN = no-deletion of the 8 bp; ND = heterozygote and DD = deletion of the 8 bp) of the *fgr* gene in wild rice (*O. rufipogon* Griff.). M = DNA molecular weight (base pair, bp)

Table 2 Statistical analysis of fragrance gene (*fgr*) in sample of wild rice from Thailand, Laos and Cambodia

Total	Genotype frequencies		
	NN	ND	DD
229	141	71	17

	Allele frequencies	
Goodness-of-fit $\chi^2 = 3.4$, df = 1 ($P > 0.05$)	N allele = 0.77	D allele = 0.23
	$\chi^2 = 3.4$, df = 1 ($P > 0.05$)	

Goodness-of-fit testing showed no significant difference suggesting that locus of the *fgr* gene is in Hardy–Weinberg equilibrium

Discussion

There has been a concerted effort on the part of archaeologists and geneticists to answer a variety of questions regarding the histories of domesticated species such as maize, wheat, tomatoes and rice (Zeder et al. *2006*). Rice grains found at archaeological sites cannot be assigned with any degree of confidence to any subspecies (i.e., *indica* or *japonica*) on the basis of morphology (Vitte et al. *2004*). As a result, a better understanding of the initial domestication and early history of rice domestication will probably be based on the genetic analysis of ancient and present-day populations of domesticated and wild rice (Doebley et al. *2006*).

The loss of the seed-shattering habit of cultivated rice is one such case, and it is thought to be one of the most important trait in rice domestication. Konishi et al. (*2006*) reported that the *qsH1* gene is a major quantitative trait locus involved with seed shattering in rice, however, the allele which disrupts seed shattering has not been found in the progenitor species. The molecular evidence obtained from the present study, however, shows that the allele of the *fgr* gene in cultivated rice is found in its progenitor populations. This genetic locus was selected from existing genetic variation in the wild species and appears fixed within domesticated rice as indicated by Sweeney and McCouch (*2007*). This finding supports the other reports that alleles of genes that contribute to an increase in fruit size in tomatoes or increased apical dominance in maize are found in their wild or feral relatives (Nesbitt and Tanksley *2002*; Clark et al. *2004*).

From the point of view of the evolution of wild rice, the proportion of the N allele (0.77) is far higher than for the D allele (0.23) within the sample surveyed. Overall, 31% were heterozygous, while 69% were homozygous. This proportion is in agreement with Hardy–Weinberg equilibrium. Surprisingly, the fact that the genotype DD was not observed in samples of wild rice from Thailand suggests either that the wild population that was ancestral to this genotype was not sampled in this collection, or that it is now extinct. The recessive allele of *fgr* gene which is responsible for aroma in rice grains was found in two closely related species with an AA genome (e.g., *O. sativa* and *O. rufipogon*), suggesting that the mutation of this locus occurred prior to domestication. These data provide additional evidence for the hypothesis that aromatic rice varieties known today arose from artificial selection through rice domestication by ancient farmers. However, the existence of the recessive allele of the *fgr* gene in the perennial wild rice species does not rule out the possibility of crop to wild rice gene flow. Because natural hybridization among the two species has been reported (Song et al. *2003*; Chen et al. *2004*), the domesticated allele (i.e., the recessive allele of the *fgr* gene) could probably spread to the wild species from fragrant cultivated rice through out-cross pollination. To address this problem, samples of perennial wild rice with 36 individuals used in this study collected from a forested swamp in Vientiane plain of Lao PDR were studied. This area is located in the natural forest and has no cultivated paddy fields nearby. As a result, this population lacks gene flow from cultivated rice. This population also contains the genotype carrying recessive allele of the *fgr* gene. This confirms the hypothesis that the recessive allele of the gene was already present in a progenitor of cultivated rice.

In addition, the recessive allele found in high proportion in other populations such as Nong Vai swamp and Ban Soa swamp, where two fragrant modern rice (i.e., KDML 105 and RD 6, *O. sativa* L. subspecies *indica*) grown nearby. The high proportion of the recessive allele in these two populations and other populations as well, may resulted from out-cross pollination

between wild rice individuals carrying different genotypes (NN, ND and DD) with a fragrant cultivar (DD) and making a population of weedy rice in paddy fields. Consequently, this allele could spread to the wild rice populations through out-cross pollination within the perennial wild rice species. However, weedy rice plants were not sampled in this survey.

This report presents the distribution and the gene frequencies of the allele controlling aromatic flavor of rice grain for samples from the Vientiane plain of Laos, from Cambodia as well as from Thai population. The data obtained serve as a reference for other studies of this gene. It may be noteworthy that some populations containing the recessive allele of the *fgr* gene may be an important source of this trait for further study in the evolution of this gene.

Acknowledgements This study was supported by the TRF/BIOTEC Special Program for Biodiversity Research and Training. The author is grateful to the farmers of Lao PDR for their fieldwork in collection of valuable wild rice samples and V. Pilap for his technical assistance.

References

Allendorf FW, Luikart G (2006) Conservation and the genetics of populations. Blackwell Publishing, Malden, MA

Bradbury LMT, Henry RJ, Jin Q, Reinke RF, Waters DLE (2005a) A perfect marker for fragrance genotyping in rice. Mol Breed 16:279–283
[SpringerLink] ChemPort

Bradbury LMT, Fitzgerald TL, Henry RJ, Jin QS, Waters DLE (2005b) The gene for fragrance in rice. Plant Biotechnol J 3:363–370
PubMed crossref ChemPort

Chen LJ, Lee DS, Song ZP, Suh HS, Lu BR (2004) Gene flow from cultivated rice (*Oryza sativa*) to its weedy and wild relatives. Ann Bot 93:67–73
PubMed crossref ChemPort

Clark RM, Linton E, Messing J, Doebley JF (2004) Pattern of diversity in the genomic region near the maize domestication gene *tb1*. Proc Natl Acad Sci USA 101:700–707
PubMed crossref ChemPort

Doebley J, Gaut BS, Smith BD (2006) The molecular genetics of crop domestication. Cell 29:1309–1321
crossref

Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull 19:11–15

Gao LZ (2004) Population structure and conservation genetics of wild rice *Oryza rufipogon* (Poaceae): a region-wide perspective from microsatellite variation. Mol Ecol 13:1009–1024
PubMed crossref ChemPort

Konishi S, Izawa T, Lin SY, Ebana K,Fukuta Y, Sasaki T, Yano M (2006) An SNP caused loss of seed shattering during rice domestication. Science 312:1392–1396
PubMed crossref ChemPort

Londo JP, Chiang Y, Hung K, Chiang T, Schaal BA (2006) Phylogeography of Asian wild rice, *Oryza rufipogon*, reveals multiple independent domestications of cultivated rice, *Oryza sativa*. Proc Natl Acad Sci USA 103:9578–9583
PubMed | crossref | ChemPort

Nesbitt TC, Tanksley SD (2002) Comparative sequencing in the genus *Lycopersicon*. Implications for the evolution of fruit size in the domestication of cultivated tomatoes. Genetics 162:365–379
PubMed | ChemPort

Song ZP, Xu X, Wang B, Chen JK, Lu BR (2003) Genetic diversity in the northernmost *Oryza rufipogon* populations estimated by SSR markers. Theor Appl Genet 107:1492–1499
PubMed | [SpringerLink] | ChemPort

Sweeney M, McCouch SR (2007) The complex history of the domestication of rice. Ann Bot 100:951–957
PubMed | crossref

Tian F, Li DJ, Fu Q, Zhu ZF, Fu YC, Wang XK, Sun CQ (2006) Construction of introgression lines carrying wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) segments in cultivated rice (*O. sativa* L.) background and characterization of introgressed segments associated with yield-related traits. Theor Appl Genet 112:570–580
PubMed | [SpringerLink] | ChemPort

Vaughan DA (1989) The genus *Oryza* L. current status of taxonomy. IRRI, Manila, The Philippines

Vitte C, Ishii T, Lamy F, Brar D, Panaud O (2004) Genomic paleontology provides evidence for two distinct origins of Asian rice (*Oryza sativa* L.). Mol Gen Genomics 272:504–511
[SpringerLink] | ChemPort

Xiao J, Li J, Grandillo S, Ahn SN, Yuan L, Tanksley SD, McCouch SR (1998) Identification of trait-improving quantitative trait loci alleles from a wild rice relative, *Oryza rufipogon*. Genetics 150:899–909
PubMed | ChemPort

Zeder MA, Emshwiller E, Smith BD, Bradley DG (2006) Documenting domestication: the intersection of genetics and archaeology. Trends Genet 22:139–155
PubMed | crossref | ChemPort