

ความหลากหลายอัลลีลของยีน *BADH2* และโมเลกุลไมโครแซทเทลไลต์ ในข้าวหอมพื้นเมืองที่สูง

Diversity of *BADH2* Alleles and Microsatellite Molecules in Highland Fragrant Rice Landraces

ภักจิรา จันทร์อินทร์¹ ศันสนีย์ จำจด^{1, 2} นริศ ยิ้มแย้ม³ และ ต่อนภา พุสดี^{1, 2*}
Phukjira Chan-in¹, Sansanee Jamjod^{1, 2}, Narit Yimyam³ and Tonapha Pusadee^{1, 2*}

¹ภาควิชาพืชศาสตร์และปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

¹Department of Plant and Soil Sciences, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

²ศูนย์วิจัยข้าวล้านนา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

²Lanna Rice Research Center, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

³ภาควิชาเกษตรที่สูงและทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

³Department of Highland Agriculture and Natural Resources, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

*Corresponding author: Email: tonapha.p@cmu.ac.th

(Received: 10 April 2018; Accepted: 16 July 2018)

Abstract: Fragrance is one of the most highly valued grain quality traits in rice. The fragrant rice is fetching very high price in the world market and the consumers demand is increasing over the world. Highland rice landraces has unique characteristics, containing high level of genetic diversity and some populations are fragrant rice. Therefore, the purposes of this study were to evaluate the genetic diversity and fragrant allelic variation of highland fragrant rice landraces in northern Thailand. Genetic diversity were assessed by using 12 microsatellite loci. Sensory test for aroma and headspace - gas chromatography (HS-GC) for 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) in grain were evaluated. Re-sequencing at exon 7 of *BADH2* was performed. The result showed that Buer Ner Moo contained low level of genetic diversity illustrated by heterozygosity ($h = 0.012$) and average gene diversity ($H_s = 0.015$) in spite of high level of genetic differentiation ($F_{ST} = 0.941$). Probably, it is the consequence from farmer's selection and preferences, as well as the genetic drift from the genetic bottleneck which was the consequence of farmers' seed conserving for next season and adaptation to the specific local environment. There was *BADH2* allelic variation found among the nine Buer Ner Moo populations, while BNM4 had the highest 2AP concentration (2.96 ppm) and illustrated the *badh2-E7* deletion on *BADH2* gene similar to KDML105 and PTT1, the popular fragrant rice in Thailand. The present results suggested that "Buer Ner Moo" rice landraces could be potentially introduced as genetic resources for fragrant rice breeding program by pure-line selection method or improved variety. The genetic analysis of rice landraces could also be used as a decision-making tool in the selection for conservation strategies.

Keywords: Fragrant rice, highland local rice, 2-acetyl-1-pyrroline, *BADH2* gene

บทคัดย่อ: ความหอมเป็นหนึ่งในลักษณะคุณภาพเมล็ดที่ทำให้ข้าวหอมมีมูลค่าสูง ในตลาดโลก เนื่องจากมีกลิ่นหอมที่เป็นเอกลักษณ์ ในขณะที่ความต้องการบริโภคข้าวหอมก็เพิ่มสูงขึ้นทั่วโลก ข้าวพันธุ์พื้นเมืองมีลักษณะทางพันธุกรรมที่เป็นเอกลักษณ์ มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง และพบว่าบางประชากรข้าวพื้นเมืองเป็นข้าวที่มีกลิ่นหอม ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมและอัลลีลของยีนที่ควบคุมลักษณะความหอมในข้าวหอมพื้นเมืองที่สูงทางภาคเหนือของประเทศไทย โดยประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์จำนวน 12 ตำแหน่ง และประเมินความหอมในเมล็ดข้าวด้วยวิธีการเบื้องต้นโดยการดมและประเมินปริมาณสาร 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) ด้วยวิธี headspace - gas chromatography (HS-GC) รวมทั้งศึกษาอัลลีลบริเวณเอกซอน 7 ของยีน *BADH2* จากการศึกษาพบว่าข้าวพันธุ์ บือเนอโม มีค่าความหลากหลายภายในประชากรต่ำ ($H_s = 0.015$) แต่มีค่าความแตกต่างระหว่างประชากรสูง ($F_{ST} = 0.941$) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการคัดเลือกในลักษณะความหอมและรูปร่างเมล็ดของเกษตรกร รวมถึงการเปลี่ยนแปลงความถี่ของอัลลีล (genetic drift) จากกระบวนการ genetic bottleneck ซึ่งเป็นผลมาจากการเก็บเมล็ดพันธุ์ของเกษตรกรสำหรับปลูกในปีถัดไป และการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมท้องถิ่น ความหลากหลายของ *BADH2* อัลลีลในกลุ่มประชากรข้าวบือเนอโมทั้ง 9 โดยประชากรข้าวบือเนอโม 4 มีปริมาณ 2AP สูงที่สุด (2.96 ppm) และมีการขาดหายไปของยีน *BADH2* แบบ *badh2-E7* ที่คล้ายคลึงกับข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 และปทุมธานี 1 ที่เป็นพันธุ์ข้าวหอมยอดนิยมของประเทศไทย ซึ่งผลที่ได้ชี้ให้เห็นว่าข้าวพื้นเมืองพันธุ์บือเนอโมสามารถใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมเพื่อพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอมได้ โดยการปรับปรุงพันธุ์ให้เป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์หรือพัฒนาให้เป็นพันธุ์สมัยใหม่ นอกจากนี้การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมข้าวพันธุ์พื้นเมืองยังสามารถใช้เป็นตัวตัดสินใจในการเลือกแนวทางในการอนุรักษ์พันธุ์ข้าว

คำสำคัญ: ข้าวหอม ข้าวพื้นเมืองที่สูง 2-acetyl-1-pyrroline ยีน *BADH2*

คำนำ

ข้าวที่มีกลิ่นหอมเป็นกลุ่มข้าวที่ได้รับความนิยมมากในปัจจุบัน เนื่องจากข้าวหอมเป็นข้าวที่มีคุณภาพในการบริโภค มีความนุ่ม มีกลิ่นหอม ทำให้ได้รับความนิยม และเกิดความต้องการในการบริโภคข้าวหอมที่เพิ่มมากขึ้น (รัตน และคณะ, 2559) จึงเกิดการขยายตัวของตลาดข้าวหอม แต่มีความสามารถในการผลิตได้ต่ำ เนื่องจากมีความสามารถในการปรับตัวต่อสภาพแวดล้อม การทนโรค และแมลงต่ำ อีกทั้งยังพบว่าข้าวหอมบางสายพันธุ์สามารถเพาะปลูกได้เพียงฤดูเดียว แต่ในกลุ่มข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่เป็นเอกลักษณ์ มีความสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมท้องถิ่นได้ดี มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงทั้งภายในประชากร และระหว่างประชากร และยังพบว่าบางกลุ่มของประชากรข้าวพื้นเมืองเป็นกลุ่มข้าวที่มีกลิ่นหอมอีกด้วย ดังนั้นข้าวพันธุ์พื้นเมืองจึงสามารถนำมาใช้เป็นฐานพันธุกรรมในการ

คัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ได้ หรือนำไปพัฒนาให้เป็นสายพันธุ์ข้าวที่บริสุทธิ์ได้ในอนาคต

สำหรับลักษณะความหอมในข้าวถือเป็นลักษณะพิเศษที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ที่มีผลต่อการบริโภคและเป็นตัวกำหนดราคาข้าว ทั้งในตลาดภายในประเทศและต่างประเทศ (Sakthivel *et al.*, 2009) และยังทำให้ข้าวหอมมีมูลค่าสูงกว่าข้าวทั่วไป โดยลักษณะของกลิ่นหอมในข้าวเกิดจากการผสมผสานของสารหอมระเหยหลายชนิด แต่กลิ่นหอมหลักที่พบในข้าวหอมเกิดจากสาร 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) ที่มีกลิ่นคล้ายข้าวโพดคั่วหรือกลิ่นใบเตย (Buttery *et al.*, 1982) ซึ่งจากการศึกษาลักษณะความหอมพบว่า ลักษณะความหอมถูกควบคุมด้วยยีนเดี่ยว ที่ตำแหน่ง *tgr* บนโครโมโซมคู่ที่ 8 (Ahn *et al.*, 1992) เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Bradbury *et al.* (2005) ที่พบลักษณะการเกิดการขาดหายไปของ 8 นิวคลีโอไทด์และการเกิด single nucleotide polymorphism (SNPs) 3 ตำแหน่งบนเอกซอน 7 นอกจากนี้ Amarawathi *et al.* (2008) ยังพบการเกิดการ

ขาดหายไปแบบไม่ต่อเนื่องของ 5+3 นิวคลีโอไทด์ และเกิด SNP 1 ตำแหน่งบนเอกซอน 7 ของยีน *badh2* รวมถึงการเกิดการเพิ่มขึ้นของนิวคลีโอไทด์จำนวน 7 นิวคลีโอไทด์ บนเอกซอน 8 เป็นต้น ต่อมาพบว่าลักษณะความหอมถูกควบคุมด้วยยีน *badh2* บนโครโมโซมคู่ที่ 8 และยีน *badh1* บนโครโมโซมคู่ที่ 4 ตามลำดับ (Bradbury *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2008; Shao *et al.*, 2011) โดยการเกิดการกลายพันธุ์บนยีน *badh2* จะนำไปสู่กระบวนการการสะสมสาร 2AP ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอัลลีลของยีนที่ควบคุมลักษณะความหอม (*BADH2*) ในข้าวหอมพื้นเมืองและประเมินความหลากหลายของข้าวหอมพื้นเมืองที่สูงทางภาคเหนือของประเทศไทย เพื่อนำข้าวหอมพื้นเมืองมาใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมในด้านการปรับปรุงพันธุ์ข้าวและสามารถนำไปพัฒนาให้เป็นสายพันธุ์ข้าวหอมที่มีประสิทธิภาพได้ในอนาคตเพื่อสร้างเอกลักษณ์และสามารถพัฒนาให้เป็นสินค้าสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์ต่อไปได้ นอกจากนั้นยังเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อการพัฒนาพันธุ์ข้าวหอมชนิดอื่น ๆ เพื่อให้สอดคล้องกับความต้องการของตลาดและผู้บริโภคที่เพิ่มมากขึ้นได้

อุปกรณ์และวิธีการ

พันธุกรรม

งานวิจัยนี้ใช้ข้าวหอมพันธุ์พื้นเมืองที่สูง พันธุ์ป้อนเณมู จำนวน 3 ชื่อพันธุ์ จากเกษตรกร 9 ราย ได้แก่ พันธุ์ป้อนเณมู (BNM1-6) ป้อนเณมูโพธิ์ (BNM7-8) และป้อนเณมูพะโด (BNM9) ในพื้นที่ทางภาคเหนือของประเทศไทย และใช้พันธุ์เปรียบเทียบกับจำนวน 5 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ข้าวป้อนเณมู มช. (BNM-CMU) เจ้าเปลือกด้า (JPD) ขาวดอกมะลิ 105 (KDML105) ปทุมธานี 1 (PTT1) และสันป่าตอง 1 (SPT1) ในการศึกษาที่จะแบ่งเมล็ดพันธุ์ข้าวออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนแรกนำไปประเมินความหอมและส่วนที่สองนำไปปลูกเพื่อศึกษาในระดับโมเลกุล

การประเมินความหอม (2AP: 2-acetyl-1-pyrroline)

ประเมินความหอมขั้นต้นด้วยวิธีการดมกลิ่นโดยอาสาสมัคร โดยนำเมล็ดข้าวที่แกะเปลือกหุ้มเมล็ด

ออก จำนวน 1 กรัม ใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร เติมน้ำละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 1.7% ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ปิดหลอดทดลอง และแช่เมล็ดทิ้งไว้ นาน 10 นาที (ดัดแปลงจากวิธีของ งามชื่น, 2547) จากนั้นนำมาทดสอบด้วยการดมกลิ่นโดยใช้ผู้ทดสอบจำนวน 10 คน ดมกลิ่นหอมของข้าวที่ละตัวอย่าง โดยทิ้งช่วงห่าง 10 วินาที บันทึกข้อมูลที่ได้จากผู้ทดสอบ โดยมีเกณฑ์การให้คะแนนความหอม (aroma score) ดังนี้ คะแนน 2 มีกลิ่นหอมขึ้นจมูกหรือมีกลิ่นหอมคล้ายกลิ่นใบเตย คะแนน 1 มีความหอมน้อยกว่าระดับคะแนน 2 หรือมีกลิ่นหอมอ่อน ๆ และคะแนน 0 ไม่มีกลิ่นหอม หลังจากการประเมินความหอมในขั้นต้นด้วยการดม (sensory test) นำเมล็ดข้าวกลั่นจำนวน 10 กรัม วิเคราะห์หาปริมาณสาร 2AP ด้วยวิธี headspace - gas chromatography (HS-GC) (Wongpornchai *et al.*, 2004) ณ ห้องปฏิบัติการเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การสกัดดีเอ็นเอ และปฏิกิริยาพีซีอาร์

เพาะเมล็ดข้าวทั้ง 14 พันธุ์ในแก้วพลาสติก และย้ายลงปลูกในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร กระถางละ 5 ต้น ที่โรงเรือนทดลอง สาขาวิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เมื่อต้นข้าวอายุครบ 1 เดือน เก็บตัวอย่างใบข้าว แบบแยกต้น บดตัวอย่างใบข้าวให้ละเอียดโดยใช้ไนโตรเจนเหลวก่อนสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ที่ดัดแปลงจากวิธีของ Doyle and Doyle (1987) และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (polymerase chain reaction: PCR) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ที่มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 10X buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 25 มิลลิโมลของ $MgCl_2$ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, 25 มิลลิโมลของ dNTP ปริมาตร 0.08 ไมโครลิตร, Forward และ Reverse primer (100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) อย่างละ ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร, 5 ยูนิตต่อไมโครลิตรของ *taq*-DNA polymerase (Thermo Scientific) ปริมาตร 0.05 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นบริสุทธิ์ (ddH_2O) ปริมาตร 8.0 ไมโครลิตร

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนความหอม (*badh2*)

ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนความหอมบริเวณเอกซอน 7 ในตัวอย่างข้าวทั้ง 14 ประชากร ได้แก่ พันธุ์ BNM1-9, BNM-CMU, JPD และใช้ข้าวหอมพันธุ์ KDML105, PTT1 และ SPT1 ที่เป็นพันธุ์ไม่หอม เป็นพันธุ์มาตรฐานเปรียบเทียบ (positive และ negative control ตามลำดับ) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับยีนความหอม (*Badh2/badh2*) (ตารางที่ 1) โดยเริ่มปฏิกิริยาพีซีอาร์ในขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที ตามด้วย 40 รอบของ 94 องศาเซลเซียส 45 วินาที, 50 องศาเซลเซียส 45 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที และขั้นตอน final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วยการแยกขนาดของแถบดีเอ็นเอ (band) โดยใช้เทคนิค 1.5% agarose gel electrophoresis จากนั้นตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอจากการย้อมสี MaestroSafe™ Nucleic Acid Stains (MAESTROGEN, Taiwan) ภายใต้เครื่อง BLoO K LED transilluminator (GeneDireX) ก่อนการส่งผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท MacroGen ประเทศเกาหลี และนำผลข้อมูลลำดับ นิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบความเหมือนกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Badh2/badh2* ในข้าวที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank ได้แก่ ข้าวพันธุ์ SuYuNuo เป็นพันธุ์ข้าวหอม และพันธุ์ Nanjing11 เป็นพันธุ์ข้าวไม่หอม (accession numbers EU7703020 และ EU710319.1 ตามลำดับ) ของ national center for biotechnology information (NCBI), USA ด้วยโปรแกรม BLAST

(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) และโปรแกรม MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016) จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์ haplotype network เริ่มจากการสร้างข้อมูล haplotype ด้วยโปรแกรม DnaSP version 5.10.1 (Librado and Rozas, 2009) และตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่าง haplotype โดยใช้วิธีการ median joining (MJ) haplotype network โดยใช้โปรแกรม Network 5.0 (Bandelt *et al.*, 1999)

ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมข้าวหอมพันธุ์พื้นเมือง

สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าว 13 ประชากร ได้แก่ พันธุ์พื้นเมือง 9 ประชากร (BNM1-9) และพันธุ์เปรียบเทียบ 4 ประชากร (BNM-CMU, JPD, KDML105 และ PTT1) ด้วยเทคนิค microsatellite marker จำนวน 12 ตำแหน่ง (ตารางที่ 2) (www.gramene.org) โดยเริ่มปฏิกิริยาพีซีอาร์ในขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที ตามด้วย 40 รอบของ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 50-55 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที และขั้นตอน final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที แยกขนาดของแถบดีเอ็นเอ (band) โดยใช้เทคนิค 10% polyacrylamide gel electrophoresis ตรวจสอบการเกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการย้อมสี MaestroSafe™ Nucleic Acid Stains (MAESTROGEN, Taiwan) ภายใต้เครื่อง BLoO K LED transilluminator (GeneDireX) แล้วบันทึกภาพด้วยกล้องดิจิทัล วิเคราะห์แยกชนิดย่อยของข้าว (subspecies type) โดยใช้ organelle markers จำนวน 3 ตำแหน่ง

Table 1. A list of pairs used for sequencing *badh2/Badh2* alleles on exon 7

Primer	Sequence (5'-3')	Size of PCR (bp)	Reference
Badh2P5	F: CCTCCGTGTTAATGCAGCTC	1026	Shao <i>et al.</i> (2011)
	R: CATAGCAAGTGGCATGTACC		
Badh2P6	F: GGTTGGTCTTCCTTCAGGTG	926	
	R: GTCCTTCCTAACTGCCTTCC		
FM <i>badh2-E7</i>	F: GGTTGCATTTACTGG	260/268 bp	Shi <i>et al.</i> (2008)
	R: CAGTGAAACAGGCTG		

F: Forward primer, R: Reverse primer

Table 2. Sequences of microsatellite markers used in the study

Primer	Chr.	Sequence (5'-3')	Repeat motif	Tm. (°C)	Expected size (bp)
RM84	1	F: TAAGGGTCCACAAGAGT R: TTGCAAATGCAGCTAGAGTAC	(TCT)10	55	113
RM318	2	F: GTACGGAAAACATGGTAGGAAG R: TCGAGGGAAGGATCTGGTC	(GT)15	55	134-154
RM251	3	F: GAATGGCAATGGCGCTAG R: ATGAGGTTCAAGATTGATC	(CT)29	55	95-154
RM241	4	F: GAGCCAAATAAGATCGCTGA R: TGAAAGCAGCAGATTTAGTG	(CT)31	55	100-160
RM122	5	F: GAGTCGATGTAATGTCATCAGTGC R: GAAGGAGGTATCGCTTTGTTGGAC	(GA)7A(GA)2A(GA)11	55	227
RM584	6	F: AGAAAGTGGATCAGGAAGGC R: GATCCTGCAGGTAACACAC	(CT)14	55	169
RM11	7	F: TCTCCTCTTCCCCGATC R: ATAGCGGGCGAGGCTTAG	(GA)17	55	140
RM477	8	F: TCTCGCGGTATAGTTGTGC R: ACCACTACCAGCCTCTG	(AATT)5	55	218-227
RM316	9	F: CTAGTTGGGCATACGATGGC R: ACGCTTATATGTTACGTCAAC	(GT)8-(TG)9(TTTG)4(TG)4	55	152-251
RM258	10	F: TGCTGTATGTAGCTCGACC R: TGGCCTTTAAAGCTGTAGC	(GA)21(GGA)3	55	148
RM167	11	F: GATCCAGCCTGAGGAACACGT R: AGTCCGACCACAAGGTGCGTTGTC	(GA)16	55	128
RM247	12	F: TAGTGCCGATCGATGTAACG R: CATATGGTTTTGACAAAGCG	(CT)16	55	119-173

F: Forward primer, R: Reverse primer

ตามวิธีการของ Okoshi *et al.* (2015) วิเคราะห์ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยวิเคราะห์โครงสร้างประชากรโดยใช้โปรแกรม STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000), ความแปรปรวนทางพันธุกรรม (AMOVA) และจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วยวิธี principle coordinate analysis (PCA) โดยใช้โปรแกรม GenAlEx version 6.1 (Peakall and Smouse, 2006) และคำนวณค่าระยะห่างระหว่างพันธุกรรม (genetic distance) (Nei, 1973) ด้วยโปรแกรม FSTAT version 2.9.3 (Goudet, 2001)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ความหอม

จากการประเมินปริมาณ 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) พบว่าข้าวทั้ง 13 ประชากร ยกเว้นพันธุ์ SPT1 มีระดับความหอมที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยข้าวพันธุ์ KDML105 มีปริมาณของ 2AP สูงที่สุด รองลงมาได้แก่ BNM-CMU, BNM4 และ PTT1 ตามลำดับ โดยมีปริมาณ 2AP อยู่ในช่วง

4.48-2.14 ppm ในขณะที่ประชากรอื่น ๆ มีปริมาณของ 2AP ในเมล็ดต่ำ อยู่ในช่วง 0.46 - 2.07 ppm ซึ่งสอดคล้องกับการประเมินความหอมเบื้องต้นด้วยการดม

(sensory test) (ตารางที่ 3) ที่พบว่าพันธุ์ KDML105 มีความหอมมาก

Table 3. The nucleotide substitution and in/del positions of *badh2*, concentration of 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) by HS-CG technique and sensory test in 9 highland fragrant rice landraces and 4 cultivars rice

Population	Nucleotide position								Concentration of 2AP (ppm)		Sensory test ^{###}
	3684	4169	4171	4173-4180	4181	4500	4652	4747			
SuYuNuo**	insertion G	T	T	8 deletion	T	G	C	T	-	-	-
KDML105	insertion G	T	T	8 deletion	T	G	C	T	4.48	a	Strong aromatic
BNM_CMU	insertion G	T	T	8 deletion	T	G	C	T	3.28	b	Moderately aromatic
BNM4	insertion G	T	T	8 deletion	T	G	C	T	2.96	c	Moderately aromatic
PTT1	insertion G	T	T	8 deletion	T	G	C	T	2.14	d	Moderately aromatic
BNM1	-	A	A	No deletion	C	A	G	C	2.07	de	Moderately aromatic
BNM8	-	A	A	No deletion	C	A	G	C	1.95	ef	Moderately aromatic
BNM5	-	A	A	No deletion	C	A	G	C	1.84	fg	Moderately aromatic
BNM3	-	A	A	No deletion	C	A	G	C	1.74	g	Non aromatic
BNM2	-	A	A	No deletion	C	A	G	C	1.57	h	Non aromatic
BNM7	-	A	A	No deletion	C	A	G	C	1.57	h	Moderately aromatic
BNM9	-	A	A	No deletion	C	A	G	C	1.43	i	Moderately aromatic
BNM6	-	A	A	No deletion	C	A	G	C	1.43	i	Moderately aromatic
JPD	insertion G	A	A	No deletion	C	G	C	T	0.46	j	Non aromatic
SPT1	-	A	A	No deletion	C	A	G	C	ND	-	Non aromatic
Nanjing11**	-	A	A	No deletion	C	A	G	C	-	-	-
F-test									*		
LSD _{0.05}									0.13		
CV (%)									3.63		

[#] Concentration of 2AP (ppm) by using headspace - gas chromatography (HS-GC) method (Wongpomchai *et al.*, 2004), ^{###} Sensory test from 10 testers, * Significant at 5% level, ** Check varieties from NCBI accession numbers EU770320 and EU710319. 1 respectively, *ND* not determined

ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *Badh2* และความสัมพันธ์ haplotype network

จากการใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะเจาะจงกับยีน *Badh2* ที่มีการขาดหายไปบริเวณเอกซอน 7 (FMBad2-E7) ที่จะให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 260 คู่เบส สำหรับอัลลีลชนิดที่มีการขาดหายไป 8 คู่เบส ที่บริเวณเอกซอน 7 (*badh2-E7*) และ 268 คู่เบส สำหรับอัลลีลชนิดที่ไม่มีการขาดหายไป (*Badh2*) พบว่าข้าวพันธุ์ BNM4, BNM-CMU, PTT1 และ KDML105 มีการขาดหายไปแบบ *badh2-E7* ที่เป็นตำแหน่งเดียวกันกับพันธุ์เปรียบเทียบกับ SuYuNuo ที่ได้จาก NCBI (accession numbers EU770320) (ตารางที่ 3)

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณเอกซอน 7 ที่ได้จากการทำพีซีอาร์ข้างต้นมาหาความสัมพันธ์ด้วย haplotype network (ภาพที่ 1) พบว่า สามารถแบ่งข้าวทั้ง 14 ประชากร ได้ เป็น 3 ชนิด โดย haplotype ที่ 1 ประกอบด้วยประชากร BNM1, BNM2, BNM3, BNM5, BNM6, BNM7, BNM8, BNM9 และ SPT1 โดยจัดเป็นข้าวกลุ่มไม่หอมที่ไม่พบลักษณะการขาดหายไปแบบ *badh2-E7* haplotype ที่ 2 ประกอบด้วยกลุ่มข้าวหอมที่มีการขาดหายไปแบบ *badh2-E7* ได้แก่ ประชากร BNM4, BNM-CMU, KDML105 และ PTT1 และ haplotype ที่ 3

คือ ประชากร JPD โดยจะพบว่าประชากร JPD มีลักษณะการเกิด SNPs ที่ตำแหน่งอื่น ๆ คล้ายคลึงกับกลุ่มข้าวที่ยีนความหอม (haplotype ที่ 2) แต่ไม่พบลักษณะการขาดหายไปแบบ *badh2-E7*

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวหอมพื้นเมือง

เมื่อนำดีเอ็นเอของข้าว 13 ประชากร ได้แก่ พันธุ์พื้นเมือง 9 ประชากร (BNM1-9) และพันธุ์เปรียบเทียบกับ 4 ประชากร (BNM-CMU, JPD, KDML105 และ PTT1) มาวิเคราะห์แยกชนิด (species type) โดยใช้ organelle markers จำนวน 3 ตำแหน่ง พบว่าข้าวทุกพันธุ์มี species type เป็นชนิด *indica* ทั้งหมด และเมื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล microsatellite จำนวน 12 ตำแหน่ง พบว่าข้าวหอมพื้นเมืองมีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม ($h = 0.012$) และค่าเฉลี่ยความหลากหลายภายในประชากร ($H_s = 0.015$) ต่ำ แต่มีค่าความแตกต่างระหว่างประชากรสูง ($F_{ST} = 0.941$) (ตารางที่ 4) เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนทางโมเลกุล (AMOVA) ภายในประชากรและระหว่างประชากรของข้าวหอมพันธุ์พื้นเมืองที่แบ่งกลุ่มตามชื่อเรียกของเกษตรกร พบว่าความแตกต่างที่เกิดขึ้นเกิดจากความ

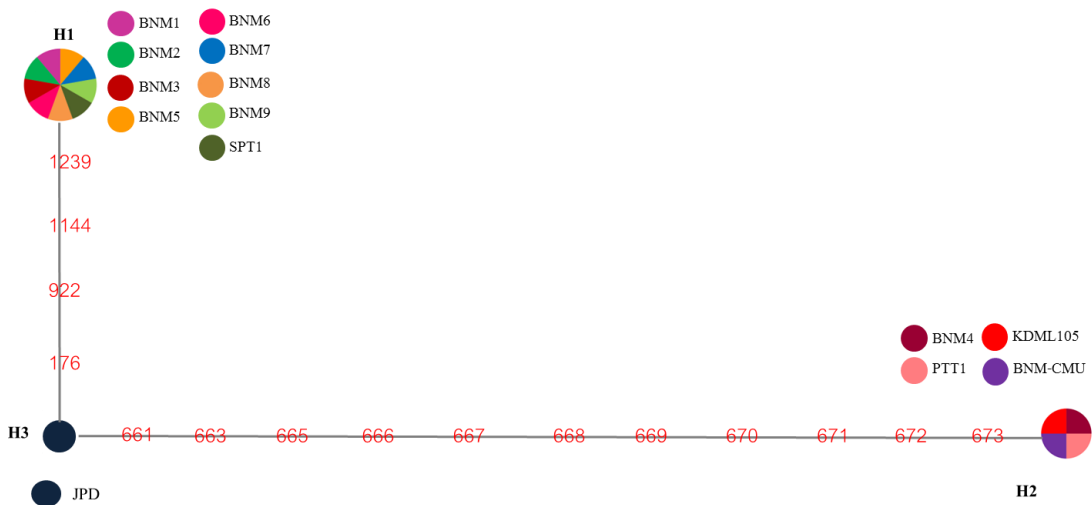


Figure 1. The haplotype network of *BADH2* gene. Letters next to circle correspond to the haplotype name. The number on the lines indicates the position of nucleotide substitution polymorphisms. The color in the circle corresponds to the rice accessions. The size of each circle is proportional to the number of individuals possessing that haplotype

Table 4. Genetic diversity of 9 highland fragrant rice landraces (BNM1-BNM9) and 4 cultivars rice (BNM-CMU, JPD, KDML105 and PTT1) based on 12 microsatellite markers and species type based on 3 organelle markers

Varieties	Population	N	n	H _e	H _s	H _T	F _{ST}	Species type*
Buer Ner Moo	BNM1	1	5	0				<i>indica</i>
	BNM2	1	5	0				<i>indica</i>
	BNM3	1	5	0				<i>indica</i>
	BNM4	1	5	0				<i>indica</i>
	BNM5	1	5	0.027				<i>indica</i>
	BNM6	1	5	0.027				<i>indica</i>
Total (BNM1-BNM6)		6	30	0.009	0.011	0.169	0.934	
Buer Ner Moo Po Phi	BNM7	1	5	0.027				<i>indica</i>
Buer Ner Moo Pha Do	BNM8	1	5	0				<i>indica</i>
Buer Ner Moo Pha Do	BNM9	1	5	0.027				<i>indica</i>
Total (BNM7-BNM9)		3	15	0.018	0.022	0.152	0.854	
Total Local varieties		9	45	0.012	0.015	0.251	0.941	
Improved varieties (BNM-CMU and JPD)		2	10	0.11	0.138	0.244	0.436	<i>indica</i>
Commercial varieties (KDML105 and PTT1)		2	10	0	0	0.315	1	<i>indica</i>
All check varieties		4	20	0.055	0.069	0.33	0.791	
Overall		13	65	0.025	0.031	0.36	0.919	

Number of accessions (N), number of individual (n), gene diversity (H_e), average gene diversity (H_s), total gene diversity (H_T), and genetic differentiation among subpopulations (F_{ST}), *according to Okoshi *et al.* (2015)

แตกต่างระหว่างพันธุ์ 42% และเกิดจากความแตกต่างระหว่างประชากร 54% และเกิดจากความแตกต่างระหว่างต้นเพียงแค่ 4% (ตารางที่ 5)

ความหลากหลายภายในประชากรที่ต่ำ แต่ความแตกต่างระหว่างประชากรที่สูง ที่พบในข้าวหอมพื้นเมืองที่สูงของข้าว “พันธุ์ป้อนอมู” ในการศึกษาครั้งนี้ อาจเป็นผลมาจากการคัดเลือกในลักษณะความหอม และความชอบในลักษณะอื่น ๆ เช่น ลักษณะรูปร่างเมล็ดที่แตกต่างกันของเกษตรกรแต่ละราย รวมถึงความเกี่ยวข้องของพันธุ์ข้าวกับวัฒนธรรมในกลุ่มชาติพันธุ์ (Tu *et al.*, 2007) และการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมในท้องถิ่น (local adaptation) (Pusadee *et al.*, 2009) โดยผ่านการคัดเลือกโดยธรรมชาติ (สภาพภูมิอากาศ โรคและแมลง) ผสมผสานกับการคัดเลือกของเกษตรกร (farmers' selection) ที่อาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม

โดยการคัดเลือกเฉพาะ phenotype ที่ต้องการ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความถี่ของอัลลีล (genetic drift) เนื่องจากกระบวนการ genetic bottleneck ที่ทำให้ความแปรปรวนภายในประชากรลดน้อยลง เพิ่มความแตกต่างระหว่างประชากร (Hufbauer and Roderick, 2005) และเพิ่มการเข้าสู่ homogeneity ของข้าวพันธุ์พื้นเมือง เนื่องจากการปลูกและคัดเลือกเก็บบาง genotype เพื่อเพาะปลูกในฤดูกาลต่อไป

โครงสร้างประชากร

เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรม โดยใช้โปรแกรม STRUCTURE พบว่ากลุ่ม (K = the number of distinct genetic groups) ที่ได้จากการประมาณ ad hoc statistic ΔK ได้แก่ K = 2 และ K=3 โดยที่ K=2 สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวทั้ง 13 ประชากรได้เป็น 2 กลุ่ม

Table 5. Analysis of molecular variance (AMOVA) results for 45 individuals of 9 highland fragrant rice landraces populations which divided by the name of species collected from the farmer

Source	df	SS	MS	Variance component	% of the total variance
Among varieties	1	47.40	47.40	0.89	42
Among populations	7	81.53	11.65	1.15	54
Among individuals	36	6.40	0.18	0.09	4
Total	89	135.33		2.13	100

โดยกลุ่มแรกประกอบด้วย ประชากร BNM4, BNM-CMU, KDML105, และ PTT1 ซึ่งพบว่าสอดคล้องกลุ่มของข้าวที่มีปริมาณ 2AP สูง (สีเทาอ่อน) และกลุ่มที่สองประกอบด้วย ประชากร BNM1, BNM2, BNM3, BNM5, BNM6, BNM7, BNM8, BNM 9, และ JPD ซึ่งสอดคล้องกับกลุ่มข้าวที่มีปริมาณ 2AP ต่ำ (สีเทาเข้ม) แต่อย่างไรก็ตามพบว่าประชากร BNM-CMU และ JPD ยังคงมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมของทั้งสองลักษณะ (admixture) (ภาพที่ 2a)

ส่วนที่ K=3 แบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวทั้ง 13 ประชากรได้เป็น 3 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกเป็นกลุ่มประชากรข้าวพื้นเมืองที่มีชื่อพันธุ์ป้อนเณมู ได้แก่ BNM1-BNM6 (สีดำ) ส่วนกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มประชากรข้าวที่มีชื่อพันธุ์ป้อนเณมูโพรี ได้แก่ BNM7 และ BNM8, ป้อนเณมูพะโด่ ได้แก่ BNM9 และเจ้าเปลือกด้า (JPD) (สีเทาอ่อน) และกลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มที่ประกอบด้วยประชากร BNM-CMU KDML105 และ PTT1 (สีเทาเข้ม) ซึ่ง BNM-CMU มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมของทั้งสองลักษณะ (admixture) เนื่องจากเป็นประชากรที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์ BNM และ PTT1 (ภาพที่ 2b)

การจัดกลุ่มทางพันธุกรรม (principle component analysis)

จัดกลุ่มความคล้ายกันทางพันธุกรรม (principle component analysis, PCA) ของตัวอย่างข้าวที่ศึกษาโดยเปรียบเทียบภายในกลุ่มตัวอย่างข้าวทั้งหมด 13 ประชากร (ภาพที่ 3) สามารถอธิบายความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นได้ 56.28% แบ่งกลุ่มข้าวทั้งหมดได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ตามแกน Coor. 1 โดยทางซ้ายของกราฟ

ประกอบด้วยประชากรข้าวที่มีปริมาณ 2AP สูง จัดให้อยู่ในกลุ่มของข้าวที่มีกลิ่นหอม (สีเทาอ่อน) ประกอบด้วย BNM4, BNM-CMU, KDML105 และ PTT1 ส่วนประชากรข้าวที่อยู่ทางขวามือของกราฟประกอบด้วยข้าวที่มีปริมาณ 2AP ต่ำ จัดให้อยู่ในกลุ่มของข้าวไม่หอม (สีเทาเข้ม) ประกอบด้วย BNM1-3, BNM5-9 และ JPD แต่เมื่อพิจารณา Coor.2 ประกอบ พบว่าสามารถแยกข้าวออกเพิ่มได้เป็น 3 กลุ่ม โดยข้าวที่อยู่ทางขวามือของกราฟได้แก่ประชากรข้าวป้อนเณมู (BNM 1-6) ส่วนประชากรขวาล่าง ได้แก่ประชากรข้าวป้อนเณมูโพรี (BNM7 และ BNM8), ป้อนเณมูพะโด่ (BNM9) และเจ้าเปลือกด้า (JPD) และประชากรทางด้านซ้ายของกราฟ ได้แก่ประชากรข้าวป้อนเณมู มช. (BNM-CMU), ขาวดอกมะลิ 105 (KDML105) และปทุมธานี 1 (PTT1)

ข้าวหอมพันธุ์พื้นเมืองที่ศึกษาครั้งนี้มีโครงสร้างประชากรตามความหอมและชื่อพันธุ์ที่เกษตรกรเรียกต่างกัน เนื่องจากเกษตรกรในแต่ละท้องถิ่นจะมีการเรียกชื่อพันธุ์ข้าวแต่ละพันธุ์แตกต่างกัน ตามลักษณะภายนอกที่ตนเองคัดเลือก เช่น ตามลักษณะรูปร่างเมล็ด หรือสีของเมล็ด ซึ่งข้าวป้อนเณมูที่ศึกษาครั้งนี้เป็นข้าวของกลุ่มชาติพันธุ์ปกากะญอซึ่งคำว่า โพรี แปลว่า เมล็ดเล็ก และคำว่า พะโด่ แปลว่า เมล็ดใหญ่ จะเห็นได้ว่าเป็นคำขยายที่ใช้เรียกลักษณะของเมล็ด แสดงให้เห็นถึงการคัดเลือกของเกษตรกรที่ขอบรูปร่างของเมล็ดข้าวที่แตกต่างกัน รวมถึงแม้ในบางครั้งจะเป็นข้าวชนิดเดียวกันหรือมีชื่อพันธุ์ข้าวที่เหมือนกันแต่อาจจะเป็นคนละพันธุ์กัน ซึ่งชื่อเรียกอาจจะเรียกตามพื้นที่ที่อาศัย หรือเรียกตามลักษณะที่ปรากฏให้เห็น (ฉวีวรรณ, 2543) ผลที่ได้มีความคล้ายคลึงกับงานศึกษาของ Ootsuka *et al.* (2014) ที่ศึกษาความ

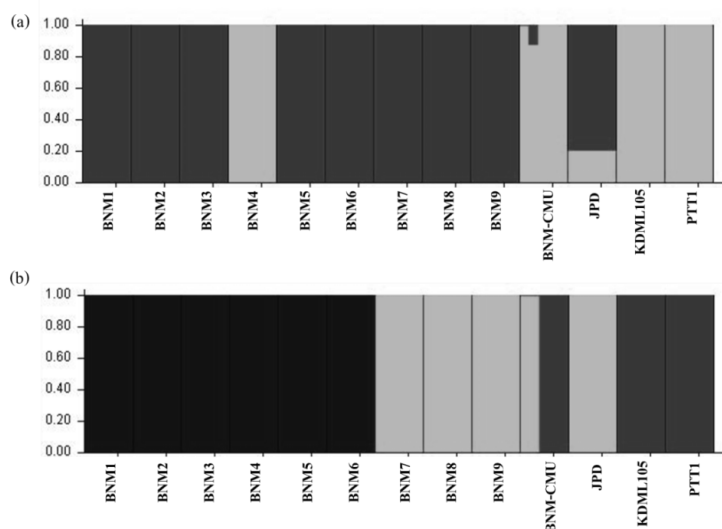


Figure 2. Population assignment using STRUCTURE analysis of 9 highland fragrant rice landraces populations and 4 cultivars rice with K=2 (a) and K=3 (b) clusters. Each bar representing each population consists of 5 individuals

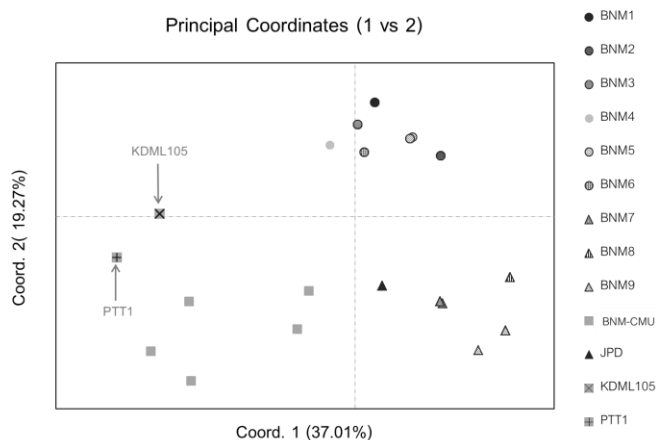


Figure 3. Principle Component Analysis (PCA) of 9 highland fragrant rice landraces population and 4 cultivars rice based on 12 microsatellite markers. Different symbols of highland fragrant rice landraces represent different group which divided by the name of species collected from the farmer and different colors of highland fragrant rice landraces samples represent different fragrance group

หลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวหอมพันธุ์พื้นเมืองญี่ปุ่นและการมีอัลลีลใหม่ที่เกี่ยวข้องกับยีนความหอมในภาคเหนือของประเทศไทย โดยทดสอบในกลุ่มข้าวหอมที่เป็นพันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์สมัยใหม่ จำนวน 82 พันธุ์ เมื่อจัดกลุ่มความคล้ายกันทางพันธุกรรม (principle

component analysis, PCA) ซึ่งสามารถแบ่งข้าวได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ ข้าวญี่ปุ่นพันธุ์พื้นเมืองไม่หอมและพันธุ์ปรับปรุงสมัยใหม่, ข้าวหอมพื้นเมืองญี่ปุ่น และข้าวหอมพันธุ์ต่าง ๆ จากหลาย ๆ แหล่งที่มา และยังสามารถแบ่งกลุ่มข้าวหอมพื้นเมืองญี่ปุ่นออกจากข้าวพันธุ์

พื้นเมืองไม่หอมได้อย่างชัดเจน นอกจากนี้ยังพบว่าภายในประชากรข้าวหอมพันธุ์พื้นเมืองจำนวน 5 สายพันธุ์ เป็นพันธุ์ข้าวพื้นเมืองไม่หอม ซึ่งมีชื่อเรียกเดียวกันกับพันธุ์ที่หอม แสดงให้เห็นว่าถึงแม้จะมีชื่อพันธุ์เดียวกันแต่ก็มีลักษณะของความหอมและยีนความหอมที่แตกต่างกัน

สรุป

จากการศึกษาในระดับโมเลกุลของประชากรข้าวป๊อเนอมุทั้ง 9 ประชากร พบว่าข้าวพันธุ์ป๊อเนอมุ มีค่าความหลากหลายภายในประชากรต่ำ แต่มีค่าความแตกต่างระหว่างประชากรสูง และสามารถแบ่งข้าวได้เป็น 2 กลุ่มตามลักษณะอัลลีลของยีนความหอม และยังพบว่าข้าวพันธุ์ ป๊อเนอมุ 4 (BNM4) มีปริมาณสารความหอม 2AP สูง (2.96 ppm) ใกล้เคียงกับข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 และยีน *Badh2* บริเวณเอกซอน 7 มีอัลลีลแบบ *badh2-E7* ที่คล้ายคลึงกับข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 และปทุมธานี 1 ที่เป็นพันธุ์ข้าวหอมที่นิยมปลูกในประเทศไทย สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอม โดยการปรับปรุงพันธุ์ให้เป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์หรือพัฒนาเป็นพันธุ์สมัยใหม่ เพื่อสร้างเอกลักษณ์และสามารถพัฒนาให้เป็นสินค้าเฉพาะถิ่นหรือสินค้าที่มีเอกลักษณ์ที่มีสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์ต่อไปได้นอกจากนี้การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมข้าวพันธุ์พื้นเมืองยังสามารถใช้เป็นตัวตัดสินใจในการเลือกแนวทางในการอนุรักษ์พันธุ์ข้าวได้ไม่ว่าจะเป็นการอนุรักษ์ในถิ่นที่อยู่ (*in situ*) หรือการอนุรักษ์นอกถิ่นที่อยู่อาศัย (*ex situ*)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณงบประมาณในการวิจัย จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (TRG5780091) สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เอกสารอ้างอิง

- งามขึ้น คงเสรี. 2547. คุณภาพข้าวและการตรวจสอบข้าวหอมมะลิไทย. เอกสารวิชาการ. กรมวิชาการเกษตร และ สำนักงานเศรษฐกิจอุตสาหกรรม, กรุงเทพฯ. 124 หน้า.
- ฉวีวรรณ วุฒิญาโน. 2543. ข้าวพื้นเมืองไทย. เอกสารวิชาการ. ศูนย์ปฏิบัติการและเก็บเมล็ดเชื้อพันธุ์ข้าวแห่งชาติ สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 215 หน้า.
- รัตน ม่วงรัตน์ จารุวรรณ จินดากุล และ วรณัฐ อินันบุตร. 2559. การสกัดร่วมกับการกักเก็บสารหอม 2-Acetyl-1-Pyrroline จากใบเตยด้วยแป้งข้าวเจ้าที่ผ่านการเกิดเจลลิตในเซชันภายใต้สภาวะหม้อนึ่งอัดไอเพื่อใช้เคลือบข้าวขาวฟิเจอร์. วารสารเกษตร 33(2): 299-310
- Ahn, S.N., C.N. Bollich and S.D. Tanksley. 1992. RFLP tagging of a gene for aroma in rice. Theoretical and Applied Genetics 84(7-8): 825-828.
- Amarawathi, Y., R. Singh, A.K. Singh, V.P. Singh, T. Mohapatra, T.R. Sharma and N.K. Singh. 2008. Mapping of quantitative trait loci for basmati quality traits in rice (*Oryza sativa* L.). Molecular Breeding: New Strategies in Plant Improvement 21(1): 49-65.
- Bandelt, H.J., P. Forster and A. Rohlf. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Molecular Biology and Evolution 16: 37-48.
- Bradbury, L.M.T., R.J. Henry, Q. Jin, R.F. Reinke and D.L.E. Waters. 2005. A perfect marker for fragrance genotyping in rice. Molecular Breeding 16(4): 279-283.
- Buttery, R.G., L.C. Ling and B.O. Juliano. 1982. 2-acetyl-1-pyrroline: An important aroma component of cooked rice. Chemistry and Industry 12: 958-959.

- Chen, S., Y. Yang, W. Shi, Q. Ji, F. He, Z. Zhan and M. Xu. 2008. *Badh2*, encoding betaine aldehyde dehydrogenase, inhibits the biosynthesis of 2-acetyl-1-pyrroline, a major component in rice fragrance. *Plant Cell* 20(7): 1850-1861.
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Goudet, J. 2001. FSTAT version 2. 9. 3. A program to estimate and test gene diversities and fixation indices. (Online). Available: <https://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm> (October 11, 2016).
- Hufbauer, R. A. and G. K. Roderick. 2005. Microevolution in biological control: mechanisms, patterns, and processes. *Biological Control* 35(3): 227-239.
- Kumar, S., G. Stecher and K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33: 1870-1874.
- Librado, P. and J. Rozas. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70: 3321-3323.
- Okoshi, M., K. Matsuno, K. Okuno, M. Ogawa, T. Itani and T. Fujimura. 2015. Genetic diversity in Japanese aromatic rice (*Oryza sativa* L.) as revealed by nuclear and organelle DNA markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 63(2): 199-208.
- Ootsuka, K., I. Takahashi, K. Tanaka, T. Itani, H. Tabuchi, T. Yoshihashi and R. Ishikawa. 2014. Genetic polymorphisms in Japanese fragrant landraces and novel fragrant allele domesticated in northern Japan. *Breeding Science* 64(2): 115-124.
- Peakall, R. and P.E. Smouse. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology* 6: 288-295.
- Pritchard, J.K., M. Stephens and P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Pusadee, T., S. Jamjod, Y. C. Chiang, B. Rerkasem and B. A. Schaal. 2009. Genetic structure and isolation by distance in a landrace of Thai rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(33) : 13880-13885.
- Sakthivel, K., R.M. Sundaram, N.S. Rani, S.M. Balachandran and C.N. Neeraja. 2009. Genetic and molecular basis of fragrance in rice. *Biotechnology Advances* 27(4): 468-473.
- Shao, G.N., A. Tang, S.Q. Tang, J. Luo, G.A. Jiao, J. L. Wu and P.S. Hu. 2011. A new deletion mutation of fragrant gene and the development of three molecular markers for fragrance in rice. *Plant Breeding* 130(2) : 172-176.
- Shi, W., Y. Yang, S. Chen and M. Xu. 2008. Discovery of a new fragrance allele and the development of functional markers for the breeding of fragrant rice varieties. *Molecular Breeding* 22(2): 185-192.
- Tu, M., B.R. Lu, Y. Zhu and Y. Wang. 2007. Abundant within-varietal genetic diversity in rice germplasm from Yunnan province of

China revealed by SSR fingerprints.

Biochemical Genetics 45(11-12): 789-801.

Wongpornchai, S., K. Dumri, S. Jongkaewwattana
and B. Siri. 2004. Effects of drying methods
and storage time on the aroma and milling
quality of rice (*Oryza sativa* L.) cv. Khao
Dawk Mali 105. Food Chemistry 87: 407-
414.
