ยีนความหอมและลักษณะพื้นฐานทางอณูพันธุศาสตร์ของข้าวหอม

Fragrance Gene and Molecular Basis of Fragrant Rice

กมลวรรณ เรียบร้อย[1,2] ศรีสวัสดิ์ ขันทอง[1,2] ธีรยุทธ ตู้จินดา[1] สุรีพร เกตุงาม[2*]

Kamonwan Riabroy[1,2] Srisawat khanthong[1,2] Theerayut Toojinda[1] Sureeporn Kate-ngam[2*]

[1]หน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

[2]ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อุบลราชธานี 34190

[1]Rice Gene Discovery Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), at Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

[2]Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, 34190, Thailand

**Corresponding author: skj2552@hotmail.com*

บทคัดย่อ

ความหอมของข้าวถือเป็นปัจจัยสำคัญหนึ่งของการกำหนดคุณภาพและราคาของข้าว ข้าวหอมจัดเป็นข้าวคุณภาพสูง เป็นที่ชื่นชอบของผู้บริโภคทั้งในประเทศและต่างประเทศ ซึ่งนับวันจะมีความต้องการเพิ่มมากขึ้น จากความก้าวหน้าของการสร้างแผนที่พันธุกรรมและการหาลำดับเบสของข้าว ทำให้ทราบว่ายีนความหอมของข้าว (*badh2*) มีตำแหน่งบนโครโมโซม 8 การขาดหายไปของลำดับเบสของยีนความหอม *badh2* จำนวน 8 เบส บนเอกซอนที่ 7 มีผลทำให้การสังเคราะห์เอนไซม์ betaine aldehyde dehydrogenease ไม่สมบูรณ์ ทำให้มีการสะสมสาร 2-acetyl 1-pyrroline (2AP) ส่งผลให้ข้าวมีกลิ่นหอม จากองค์ความรู้ดังกล่าวนำมาซึ่งแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีกลิ่นหอมได้ บทความนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่ออภิปรายเกี่ยวกับยีนความหอม ลักษณะพื้นฐานทางอณูพันธุศาสตร์ของข้าวหอม และ แนวทางการใช้ประโยชน์ของยีนความหอมในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว

ABSTRACT

Fragrance in rice is considered one of the most important grain quality traits, as it is a key factor in determining market price. Aromatic rice is classified as high quality rice and its demand is not only increasing in the national markets but is also widely recognized in all over the world. With the availability of molecular maps and genome sequences, a major gene for fragrance (*badh2*) was identified on chromosome 8. An 8-bp deletion in the exon 7 of this gene was reported to result in truncation of betaine aldehyde dehydrogenease enzyme whose loss-of-function lead to the accumulation

of a major aromatic compound, 2-acetyl 1-pyrroline (2AP) in fragrant rice. The knowledge from these studies will be useful for breeding aromatic rice. Therefore, the objective of this review is to discuss about fragrance gene, molecular basis of fragrance rice and the utilization of fragrance gene in rice breeding program.

คำสำคัญ: ยีนความหอม, *badh2,* สารหอม 2-acetyl-1-pyrroline (2AP), ข้าวหอม**,** การปรับปรุงพันธุ์ข้าว

Keywords: Fragrance gene, *badh2*, 2-acetyl-1-pyrroline (2AP), aromatic rice, rice breeding

บทนำ

กลิ่นหอมของข้าวถือเป็นมนต์เสน่ห์หนึ่งที่ชวนให้ข้าวน่ารับประทาน และเป็นองค์ประกอบสำคัญที่ทำให้ข้าวหอมมีคุณค่าเพิ่มสูงขึ้น (high premium) ซึ่งเป็นที่ต้องการของผู้บริโภคทั่วโลก ทั้งในเอเชีย สหภาพยุโรป ออสเตรเลีย สหรัฐอเมริกา และตะวันออกกลาง เป็นต้น ข้าวหอมเป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายในกลุ่มของเกษตรกร พ่อค้า และผู้บริโภคมาเป็นเวลาช้านาน เนื่องจากภายในเมล็ดข้าวมีกลิ่นหอมจึงทำให้มีความแตกต่างจากข้าวพันธุ์อื่นซึ่งไม่มีกลิ่นหอม ข้าวหอมมะลิของประเทศไทย และข้าวบาสมาติ (Basmati) ของอินเดียและปากีสถาน ถือเป็นข้าวหอมที่ได้รับความนิยมจากผู้บริโภคมากที่สุด (Sakthivel *et al.*, 2009) นอกจากข้าวหอมเหล่านี้แล้ว ยังมีข้าวหอมอีกหลายพันธุ์ที่เกษตรกรนิยมปลูก เช่น ข้าวพันธุ์ Malagkit Sungsong และ Milagrosa ของประเทศฟิลิปปินส์ พันธุ์ Seratus Malam ของประเทศอินโดนีเซีย พันธุ์ Goolarah ของประเทศออสเตรเลีย พันธุ์ Hieri ของประเทศญี่ปุ่น พันธุ์ Della และ Dellmont ของประเทศสหรัฐอเมริกา เป็นต้น (วาสนา, 2538; Sakthivel *et al.*, 2009) สำหรับประเทศไทย มีพันธุ์ข้าวหอมที่นิยมปลูกอีกหลายพันธุ์ เช่น ปทุมธานี1 กข33 กข6 และหอมชลสิทธิ์ เป็นต้น

กลิ่นหอมของข้าวเกิดจากการผสมผสานของสารหอมระเหยมากมายหลายชนิด แต่กลิ่นหอมหลักที่พบในข้าวหอมเกิดจากสาร 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) ซึ่งเป็นสารที่พบมากในพืชตระกูลใบเตย (*Pandonus amaryllifolins* Rokb) มีความเข้มข้นสูงกว่าข้าวหอมประมาณ 10 เท่า และสูงกว่าข้าวไม่หอมถึง 100 เท่า (วาสนา, 2538) ปริมาณ 2AP ถูกนำมาใช้เป็นมาตรฐานในการกำหนดการซื้อขายข้าวหอม ตัวอย่างเช่น ข้าวหอมมะลิทุ่งกุลาร้องไห้ต้องมีปริมาณสาร 2AP ในปริมาณ 0.1 ไมโครกรัมต่อกรัมขึ้นไป (กรมทรัพย์สินทางปัญญา, 2550) ด้วยความก้าวหน้าทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพในปัจจุบัน ทำให้การศึกษากลไกการสังเคราะห์ความหอมมีความก้าวหน้ามากขึ้น ซึ่งพบว่า สารหอม 2AP จะถูกสังเคราะห์ในวิถี polyamine และมีกรดอะมิโน proline เป็นสารตั้งต้น ซึ่งการแสดงออกดังกล่าวถูกควบคุมด้วยยีนด้อย *badh*2 (betaine aldehyde dehydrogenase homologue 2) หรือยีน *Os2AP* (*Oryza sativa* 2-acetyl-1-pyrroline) โดยปกติยีนเด่น *Badh*2 จะเปลี่ยนสาร γ-aminobutyraldehyde (GABald) เป็นสาร γ-aminobutyric acid (GABA) แต่เมื่อยีนดังกล่าวเกิดการกลายเป็นยีนด้อย *badh*2 ข้าวจะเปลี่ยนสาร GABald เป็นสาร 2AP จึงทำให้ข้าวมีกลิ่นหอม (Bradbury *et al*., 2008; Vanavichit and Yoshihashi, 2010) จากข้อมูลดังกล่าวนำมาซึ่งแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวไม่หอมให้มีกลิ่นหอม ดังนั้นบทความนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่ออภิปรายถึงความก้าวหน้าของการศึกษาเกี่ยวกับยีน

ความหอมในข้าว และแนวทางการใช้ประโยชน์จากองค์ความรู้ดังกล่าว

สารให้ความหอมในข้าว

ความหอมในข้าวเกิดจากการผสมผสานของสารหอมระเหยมากมายหลายชนิด จนกลายเป็นกลิ่นหอมที่เป็นเอกลักษณ์และเป็นจุดเด่นของข้าวหอมแต่ละพันธุ์ โดยสารหอมที่พบในข้าวมีมากกว่า 200 ชนิด เช่น hydrocarbon, alcohol, aldehyde, ketone, acid, ester, phenol, pyridine, pyrazine 2-acetyl-1-pyrroline, alkanal, alk-2-enal, alka-2,4-dienal, 2-pentylfuran, 2-phenylethanol, 2-aminoacetophenoe และ 3-hydroxy-4,5-dimethyl-2 (5H) furanone เป็นต้น (Yajima *et al.*, 1979; Petrov *et al.*, 1996; Widjaja *et al.*, 1996; Mahatheeranont *et al.*, 2001; Vanavichit and Yoshihashi, 2010) การรวมตัวของสารหอมระเหยหลายชนิดที่พบในข้าวนี้ ทำให้ข้าวแต่ละชนิดมีกลิ่นหอมแตกต่างกัน (Bryant and McClung, 2011) เช่น ข้าวหอมมะลิจะมีกลิ่นหอมเหมือนดอกไม้ (flowery aroma) ข้าวบาสมาติมีกลิ่นหอมเหมือนถั่วหอม (nutty aroma) เป็นต้น อย่างไรก็ตามสารให้ความหอมหลักที่พบในข้าว คือ 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) ซึ่งถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1982 โดยมีกลิ่นหอมคล้ายใบเตย หรือข้าวโพดคั่ว สามารถพบได้ทุกส่วนของต้นข้าว ยกเว้นส่วนของราก (Buttery *et al.*, 1983)

จากการศึกษาของ Widjaja *et al.* (1996) ได้รายงานองค์ประกอบของสารหอมระเหยต่างๆ ที่พบในข้าวหอม ซึ่งส่งผลให้ข้าวแต่ละพันธุ์มีกลิ่นหอมแตกต่างกัน โดยเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์ข้าวหอมไทย (Jasmine หรือ ขาวดอกมะลิ 105) พันธุ์ข้าวหอมอินเดียและปากีสถาน (Basmati) พันธุ์ข้าวหอมออสเตรเลีย (Goolarah และ YRF9) และพันธุ์ข้าวไม่หอมออสเตรเลีย (Pelde) พบว่า ข้าวแต่ละพันธุ์มีสารหอมระเหยจำนวนมากและมีปริมาณที่แตกต่างกัน ซึ่งการรวมตัวกันของสารแต่ละชนิดนี้มีผลให้ข้าวมีกลิ่นหอมที่เป็นเอกลักษณ์ของพันธุ์ (Table 1) อย่างไรก็ตามพบว่าสารหอมระเหย 2AP เป็นสารหลักที่ทำให้เกิดกลิ่นหอมในข้าวแต่ละพันธุ์

โครงสร้างของสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline (2AP)

สารหอม 2AP เป็นสารประกอบในกลุ่ม pyrrole มีลักษณะโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนห้าเหลี่ยมที่มีไนโตรเจนเกาะอยู่ภายในวงแหวน โดยมีพันธะระหว่างคาร์บอนกับไนโตรเจนเป็นพันธะคู่ 1 พันธะ และมีหมู่ acetyl เกาะกับคาร์บอนตำแหน่งที่สองมีสูตรโมเลกุล คือ C_6H_9NO (Figure 1) ซึ่งสาร 2AP มีชื่อเรียกอีกอย่างว่า 5-acetyl-3,4-dihydro-2H-pyrroline มีคุณสมบัติทางกายภาพเป็นของเหลวใส ไม่มีสี มีคุณสมบัติเป็นเบสเล็กน้อย เมื่อเก็บไว้นานจะเปลี่ยนเป็นสีแดงหรือสีน้ำตาลเข้ม ระเหยง่าย และไม่เสถียรเมื่ออยู่ในรูปสารบริสุทธิ์ (Buttery *et al.*, 1982)

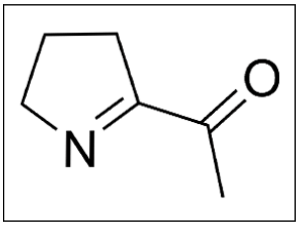

Figure 1 Structure of 2-acetyl-1-pyrroline (Souce: modified from Bradbury *et al.*, 2008).

ยีนสร้างความหอม

จากอดีตจนถึงปัจจุบัน มีการศึกษายีนที่ควบคุมลักษณะความหอมในข้าวอย่างแพร่หลาย นับตั้งแต่การรายงานการวางตำแหน่งยีน (genetic mapping) ควบคุมลักษณะความหอมในข้าวครั้ง

Table 1 Concentrations (μg kg^{-1}, wet/wt) of major volatile compounds[a] and odor description of cooked rice (modified from Widjaja *et al.,* 1996).

Peak number	Compound	Fragrant rice (Location)				Non-fragrant rice	Odor description
		Jasmine (Thai)	Basmati (India/Pakistan)	Goolarah (Australia)	YRF9 (Australia)	Pelde (Australia)	
14	n-Hexanal	1818	829	1498	1396	2038	Green, grass-like
15	2-Hexanone	7	13	7	18	7	Fruity
16	Pyridine	nd	nd	11	9	28	Pungent
19	n-Pentanol	152	130	82	104	160	Fusel oil-like
23	2-Pentylfuran	98	65	118	121	274	Nutty, bean
26	n-Heptanal	78	111	94	102	132	Fruity, fatty
27	2-Heptanone	94	204	70	92	117	Fruity, floral
30	(E)-2-Hexenal	161	598	193	233	294	Green
32	n-Hexanol	78	41	23	60	48	Herbaceous
33	Methyl heptanoate	nd	nd	18	21	26	Green, fruity
36	2-Acetyl-1-pyrroline[b]	[d]	[d]	691	670	15	Sweet, pleasant
	Collidine (TMP)[c]						
37	n-Octanal	[d]	[d]	58	83	105	Slightly fruity
40	6-Methyl-5-hepten-2-one	28	10	32	34	58	Banana-like
41	(E)-2-Heptenal	99	58	108	97	208	Herbaceous
42	1-Octen-3-ol	87	46	57	75	111	Raw mushroom
43	n-Heptanol	32	54	17	30	32	Woody, sweet
47	n-Nonanal	158	125	210	244	429	Floral, fruity
48	2-Nonanone	6	11	4	nd	5	Fruity, herbaceous
53	Benzaldehyde	136	142	78	52	126	Nutty, bitter

Table 1 Continued.

Peak number	Compound	Fragrant rice (Location)				Non-fragrant rice	Odor description
		Jasmine (Thai)	Basmati (India/Pakistan)	Goolarah (Australia)	YRF9 (Australia)	Pelde (Australia)	
54	(E)-2-Octenal	113	55	91	98	192	Green, fatty
55	n-Octanol	49	41	33	52	56	Fruity, floral
58	(E)-2,(E)-4-Heptadienal	[d]	[d]	13	14	26	Hay-like
65	n-Decanal	26	16	24	36	45	Sweet, waxy, floral
69	(E)-2-Nonenal	40	24	36	41	67	Fatty, woody
71	n-Nonaol	19	[d]	14	16	20	Floral, citrus
74	Acetophenone	33	20[d]	24	48	44	Sweet, floral
75	Phenylacetaldehyde	76	25	17	23	21	Sweet (dilute)
77	2-Undecanone	11	[d]	8	9	14	Fruity, floral
82	(E)-2-Decenal	20	19	20	30	34	Waxy
85	(E)-2,(E)-4-Nonadienal	18	8	9	6	21	Waxy
89	2-Phenylethanol	195	703	318	217	353	Sweet, floral
96	(E)-2,(E)-4-Decadienal	50	16	77	97	150	Fatty, waxy
99	2-Tridecanone	nd	nd	nd	nd	2	Oily, nutty
118	Indole[b]	253	91	168	88	102	Floral

Note: [a] Calculations have been divided by the compound's relative recovery factor

[b] Tentatively identified

[c] Internal standard

[d] Coeluted peaks

nd = no data

แรก โดย Ahn *et al.* (1992) กล่าวว่าลักษณะความหอมถูกควบคุมด้วยยีนด้อย ที่ตำแหน่ง *fgr* บนโครโมโซมคู่ที่ 8 โดยมีเครื่องหมายดีเอ็นเอ RG28 อยู่ห่างจากตำแหน่ง *fgr* เป็นระยะทาง 4.5 เซ็นติมอร์แกน (cM) ต่อมามีการรายงานพบว่า ลักษณะความหอมถูกควบคุมด้วยยีน *badh2* (Lorieux *et al.*, 1996; Bradbury *et al.*, 2005a; Wanchana *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006) และปัจจุบันพบว่า ยีนด้อย *badh1* บนโครโมโซมคู่ที่ 4 ก็ทำหน้าที่ควบคุมลักษณะความหอมเช่นกัน (Amarawathi *et al.*, 2008)

การค้นพบยีนความหอม

ทีมนักวิจัยจากหน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สร้างแผนที่ทางพันธุกรรมและแผนที่ทางกายภาพอย่างละเอียด (fine-scale genetic map and physical map) โดยใช้ข้าวสายพันธุ์คู่แฝด (isogenic line) ของข้าวหอมพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เพื่อให้เข้าใกล้บริเวณที่คาดว่าจะมียีนความหอมมากที่สุด ซึ่งมีพื้นที่ครอบคลุมขนาดเท่ากับ 26.7 kb จากการศึกษาพบว่า บริเวณดังกล่าวมียีนเป้าหมายซึ่งคาดว่ามีส่วนในการควบคุมลักษณะความหอมจำนวน 3 ยีน ได้แก่ *Oryza sativa* 2-acetyl-1-pyrroline (*Os2AP*), 3-methyl-crotonyl CoA carboxylase (*MCCase*) และ hyprothetical protein เมื่อนำยีนทั้งสามมาวิเคราะห์การแสดงออกของยีนเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์ข้าวหอม และพันธุ์ข้าวไม่หอม พบว่ายีน *Os2AP* ไม่มีการแสดงออกในข้าวหอมสายพันธุ์คู่แฝด (aromatic isogenic line) ของขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งในสายพันธุ์ข้าวไม่หอมพบการแสดงออกของยีนปกติ ในขณะที่ยีน *MCCase* และ hypothetical protein ไม่พบความแตกต่างของการแสดงออกของยีนในสายพันธุ์ข้าวที่นำมาทดสอบ จึงสรุปได้ว่า ยีน *Os2AP* น่าจะเกี่ยวข้องกับการให้ความหอมในข้าว จากนั้นนำดีเอ็นเอของข้าวหอมพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กับข้าวไม่หอมพันธุ์ Nipponbare มาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *Os2AP* พบว่า พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เกิดการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์จำนวน 8 นิวคลีโอไทด์ (8 bp deletion) บริเวณเอกซอน 7 มีผลทำให้เกิดการหยุดการแปลรหัสก่อนกำหนด (premature stop codon) (Wanchana *et. al.*, 2005) สอดคล้องกับรายงานของ Bradbury *et al.* (2005a) ที่พบการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์จำนวน 8 นิวคลีโอไทด์ บริเวณเอกซอน 7 ของยีน *badh2* ในข้าวพันธุ์ Kyeema และพบการขาดหายไปนี้ในข้าวหอมตรวจสอบทุกสายพันธุ์ โดยที่ข้าวไม่หอมไม่พบการกลายพันธุ์ของยีนดังกล่าว

การค้นพบยีนความหอม *Os2AP* หรือยีน *badh2* บนโครโมโซมคู่ที่ 8 นี้นำไปสู่การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ Aro2AP เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือกข้าวหอมได้อย่างแม่นยำ และเมื่อมีการพิสูจน์หน้าที่ของยีนนี้ในพันธุ์ข้าวที่ไม่หอม โดยใช้เทคนิค RNA interference (RNAi) ยับยั้งการแสดงออกของยีน *Os2AP* พบว่าสามารถทำให้ข้าวมีการเปลี่ยนแปลงเป็นข้าวหอมได้ จากการค้นพบดังกล่าว รศ. ดร. อภิชาติ วรรณวิจิตร และคณะ จากหน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ จึงจดสิทธิบัตรยีนความหอมจำนวน 2 ฉบับ ที่ประเทศสหรัฐอเมริกาได้สำเร็จเป็นครั้งแรกในโลก ได้แก่ 1) Transgenic rice plants with reduced expression of *Os2AP* and elevated levels of 2-acetyl-1-pyrroline สิทธิบัตรเลขที่ 7,319,181 เมื่อวันที่ 15 มกราคม 2551 (Vanavichit *et al.*, 2008) และ 2) *BADH2*

nucleic acids associated with grain aroma ได้สิทธิบัตรเลขที่ 7,847,083 B2 เมื่อวันที่ 7 ธันวาคม 2553 (Vanavichit *et al.*, 2010)

โครงสร้างและหน้าที่ของยีนความหอม

ยีนความหอม *badh* พบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น ข้าว (*Oryza sativa*) ข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare*) ซูการ์บีท (*Beta vulgaris*) ถั่วพี (*Pisum sativum*) ข้าวโอ๊ต (*Avena sativa*) และหญ้ากำมะหยี่ (*Zoysia tenuifolia*) ซึ่งทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ betaine aldehyde dehydrogenase homologue (BADH) โดยยีนดังกล่าวมีผลต่อความสามารถในการทนต่อสภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อมในพืช (abiotic stress tolerance) อันเป็นผลเนื่องมาจากอุณหภูมิ ความเค็ม และความแห้งแล้ง (Fitzgerald *et al.*, 2009) ในข้าวนั้นพบว่ามียีน *badh* จำนวนสองตำแหน่ง ได้แก่ ยีน *badh1* บนโครโมโซมคู่ที่ 4 และยีน *badh2* บนโครโมโซมคู่ที่ 8 มีโครงสร้างและหน้าที่ยีนคล้ายกัน แต่ความหอมในข้าวจะเกิดจากการแสดงออกของยีน *badh2* มากกว่ายีน *badh1* (Amarawathi *et al.*, 2008)

ยีนเด่น *Badh*2 บนโครโมโซมคู่ที่ 8 มีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ประมาณ 5,800 คู่เบส ประกอบด้วยเอกซอนจำนวน 15 เอกซอน และอินทรอนจำนวน 14 อินทรอน ยีนทำงานอย่างสมบูรณ์จะสร้างกรดอะมิโนจำนวน 503 ชนิด (Bradbury *et al.*, 2005a; Chen *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2008) ซึ่งยีน *Badh2* นี้ ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์เอนไซม์ BADH เพื่อเปลี่ยนสาร γ-aminobutyraldehyde (GABald) เป็นสาร γ-aminobutyric acid (GABA) มีผลทำให้ข้าวไม่มีกลิ่นหอม แต่เมื่อยีนเกิดการกลายพันธุ์เป็นยีนด้อย (*badh*2) ส่งผลทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์เอ็นไซม์ BADH เพื่อเปลี่ยนสาร GABald เป็นสาร GABA ได้ แต่ข้าวจะสร้างสาร 2 AP ขึ้นแทน ทำให้ข้าวมีกลิ่นหอม

ยีนเด่น *Badh1* (Betaine aldehyde dehydrogenase homologue 1) บนโครโมโซมคู่ที่ 4 เป็นยีน homologue กับยีน *Badh2* บนโครโมโซมคู่ที่ 8 (Lorieux *et al.*, 1996; Amarawathi *et al.*, 2008) ยีน *Badh1* อาจมีสารตั้งต้นเป็นสาร γ-aminobutyraldehyde (GABald) เช่นเดียวกับ *Badh2* เมื่อยีน *Badh1* ทำงานปกติจะส่งผลให้การสะสมของสาร 2AP ลดลง (Bradbury *et al.*, 2008) หาก ยีน *Badh1* สูญเสียหน้าที่หรือมีการแสดงออกของยีนลดลง ก็จะช่วยเพิ่มการสะสมสาร 2AP ในข้าวหอมให้สูงขึ้น (Amarawathi *et al.*, 2008)

การสังเคราะห์สารหอม 2-acetyl-1-pyrroline

จากการค้นพบยีนความหอม *Os2AP* หรือยีน *badh2* ที่ควบคุมการสร้างสารหอมระเหย 2AP ในข้าวนั้น ปัจจุบันยังไม่ทราบกระบวนการสังเคราะห์แน่ชัด ทราบแต่เพียงว่ามีกรดอะมิโน proline เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์สาร 2AP (Yoshihashi *et al.*, 2002) Vanavichit *et al.* (2005) ได้ศึกษากระบวนการสร้างสาร 2AP ในข้าวหอมพบว่า ยีน *Os2AP* เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนควบคุมความหอมในข้าว และการสังเคราะห์สาร 2AP เกิดขึ้นในวัฏจักร polyamine (polyamine pathway) (Figure 2) โดยกระบวนการดังกล่าวเปลี่ยนสารตั้งต้น proline เป็น ornitine และ putrescine ตามลำดับ จากนั้นจะเปลี่ยนเป็นสาร γ-aminobutyraldehyde (GABald) (หรือ สาร 4-aminobutanal) ไปเป็นสาร GABA โดยเอนไซม์ betaine aldehyde dehydrogenase (BADH2) หรือ amino aldehyde dehydrogenase (AMADH) ซึ่งถูกสังเคราะห์โดย ยีน *Badh2* หรือยีน *Os2AP*

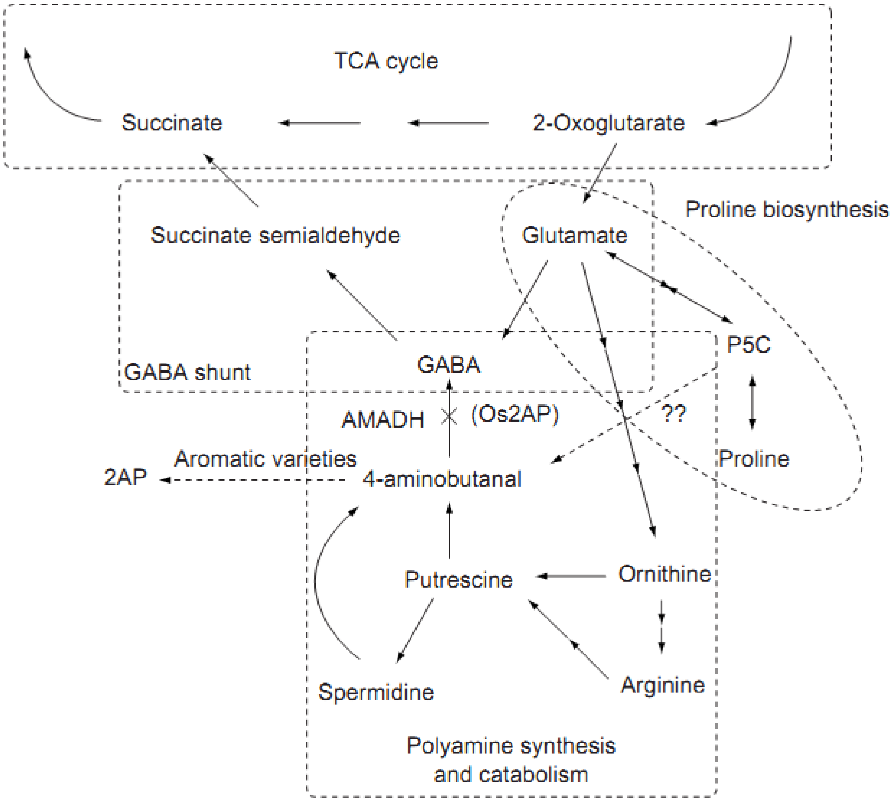

Figure 2 The pathway drawing of the 2AP synthesis. The detailed pathway from P5C to 4-aminobutanal was not reported yet. Aromatic varieties lack AMADH enzyme activity, which convert 4-aminobutanal to GABA, therefore yield 2AP (Source: Vanavichit and Yoshihashi, 2010).

ดังนั้นจึงไม่มีการสร้างสาร 2AP ขึ้น ซึ่งกระบวนการดังกล่าวจะพบในข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอม แต่ในข้าวหอมพบการขาดหายของยีน *Badh2* จำนวน 8 นิวคลีโอไทด์ (8 bp deletion) ส่งผลให้ยีน *Badh2* เกิดการกลายพันธุ์กลายเป็นยีนด้อย *badh2* ทำให้ไม่สามารถทำหน้าที่เปลี่ยน GABald เป็น GABA ได้ ทำให้พืชมีการสะสม GABald มากเกินไป ซึ่งอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อเนื้อเยื่อพืช ดังนั้น พืชจึงเปลี่ยนสาร GABald เป็น สาร Δ^1– pyrroline แทน ซึ่งสารดังกล่าวเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สาร 2AP ในข้าวหอม (Bradbury *et al*., 2005a, 2008; Wanchana *et al*., 2005; Chen *et al*., 2008; Vanavichit and Yoshihashi, 2010)

ปัจจัยที่ส่งผลต่อปริมาณสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline

ในข้าวหอมแต่ละพันธุ์จะมีความหอมแตกต่างกัน และพบว่าข้าวหอมพันธุ์เดียวกันที่ปลูกในพื้นที่ต่างกันจะมีความหอมแตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น ข้าวหอมมะลิของประเทศไทยที่ปลูกในบริเวณทุ่งกุลาร้องไห้ของภาคตะวันออกเฉียงเหนือจะผลิตข้าวที่มีความหอมสูงมาก (strong aroma) เนื่องจากเป็นพื้นที่ที่มีความอุดมสมบูรณ์ของดินต่ำ เป็นดินทราย และมักประสบปัญหาความแห้งแล้ง โดยเฉพาะในช่วงเมล็ดสุกแก่ ซึ่งปัจจัยดังกล่าวคาดว่าน่าจะเป็นตัวส่งเสริมการเพิ่มปริมาณสารหอม 2AP ตามส่วนต่าง ๆ ของต้นข้าว (Yoshihashi *et*

al., 2004) ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการเพิ่มปริมาณของ proline โดย proline ถือเป็นแหล่งไนโตรเจนของสาร 2 AP และทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นของการสร้างสารหอมในข้าว เช่นเดียวกับข้าวหอมบาสมาติ ซึ่งมีรายงานว่าหากปลูกในพื้นที่ Punjab ของประเทศปากีสถานและอินเดีย จะมีประสิทธิภาพในการให้ความหอมสูงมากกว่าปลูกในพื้นที่อื่นๆ (Singh, 2000; Itani *et al*., 2004) ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากปัจจัยสภาพแวดล้อม (นอกเหนือจากปัจจัยทางพันธุกรรม) ได้แก่ สภาพภูมิอากาศ หรือสภาพของดินในบริเวณดังกล่าว (Efferson, 1985) นอกจากนี้ พบว่าหากมีอุณหภูมิต่ำในขณะข้าวสร้างรวงอ่อน ออกดอก และสร้างเมล็ด จะทำให้ข้าวสร้างสารหอมมากกว่าสภาพที่มีอุณหภูมิสูง และการเก็บเกี่ยวข้าวในขณะที่มีอุณหภูมิต่ำโดยเฉพาะในช่วงต้นของระยะเก็บเกี่ยว จะช่วยลดการสูญเสียปริมาณสารหอม 2AP ได้ (Itani *et al*., 2004)

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนความหอม

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนความหอมในข้าว

ปัจจุบันมีรายงานการค้นพบการกลายพันธุ์ของยีน *Badh2* เป็นยีนด้อย *badh2* หลายตำแหน่ง ทำให้เกิดความหลากหลายของยีนความหอมในข้าว (Table 2) ตัวอย่างเช่น Shi *et al.* (2008) ศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence alignment) ของยีนความหอมในข้าวหอม 24 พันธุ์ และข้าวไม่หอม 10 พันธุ์ พบว่าข้าวหอมจำนวน 12 พันธุ์ มีการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์ จำนวน 8 นิวคลีโอไทด์ และเกิด single nucleotide polymorphism (SNP) จำนวน 3 ตำแหน่งบริเวณเอกซอน 7 ในขณะที่ข้าวหอมอีก 12 พันธุ์ พบการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์จำนวน 7 นิวคลีโอไทด์ บริเวณเอกซอน 2 โดยที่ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีนดังกล่าวในพันธุ์ข้าวไม่หอม Shao *et al*. (2011) พบการกลายพันธุ์ของยีน *badh2* ที่เกิดการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์จำนวน 803 เบสระหว่างบริเวณเอกซอน 4 และเอกซอน 5 ในข้าวหอมพันธุ์ Zaimiaoxiangnuo

Amarawathi *et al.* (2008) พบการเพิ่ม (insertion) ของนิวคลีโอไทด์ จำนวน 7 นิวคลีโอไทด์ ในเอกซอน 8 การขาดหายของนิวคลีโอไทด์จำนวน 8 นิวคลีโอไทด์ และเกิด SNP 1 ตำแหน่งบริเวณเอกซอน 7 ในข้าวหอมพันธุ์ Pusa1121 ส่วน Bourgis *et al*. (2008) พบการเพิ่มของ MITE (miniature interspersed transposable element) บริเวณ promoter ในข้าวพันธุ์ Azucena Sun *et al.* (2008) พบการเกิด SNP จำนวน 2 ตำแหน่งบริเวณอินทรอน 8 ในข้าวพันธุ์ Chuanxiang-29B Chen *et al.* (2008) พบการขาดหายของนิวคลีโอไทด์ TT บริเวณอินทรอน 2 ในข้าวพันธุ์ Wuxiangjing9 และมีลำดับเบสซ้ำ (AT)n บริเวณอินทรอน 4 ในข้าวพันธุ์ Suyunuo Myint *et al*. (2012) พบการเพิ่มของนิวคลีโอไทด์จำนวน 3 นิวคลีโอไทด์ในข้าวพื้นเมืองพม่าพันธุ์ Pathein Nyunt เป็นต้น จากรายงานดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนความหอมในข้าวหอมพันธุ์ต่างๆ โดยในข้าวหอมแต่ละพันธุ์จะมีตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่แตกต่างกัน ซึ่งเป็นการสนับสนุนสมมุติฐานที่ว่า ลักษณะความหอมของข้าวเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *Badh2* ส่งผลให้มีการสร้างโปรตีนที่ผิดปกติจนไม่สามารถทำงานได้ หรือบางกรณีก็ไม่สามารถสร้างโปรตีนได้

ยีนความหอมในพืชชนิดอื่น

สารหอม 2AP นอกจาก เป็นสารหอมระเหยที่พบในข้าวหอมทุกสายพันธุ์แล้ว ยังสามารถ

Table 2 Allelic diversity of the mutation *Badh2* gene in rice.

Allele	Mutation	Location	Variety/Group	Reference
badh2.1	8 bp deletion	exon 7	Kyeema, KDML105 Suyunuo	Bradbury *et al*., 2005a; Wanchana *et al*., 2005; Shi *et al*., 2008
badh2.2	3 bp SNPs	exon 7	Kyeema, KDML105 Suyunuo	Bradbury *et al*., 2005a; Wanchana *et al*., 2005; Shi *et al*., 2008
badh2.3	TT deletion	intron 2	Wuxiangjing9	Chen *et al*., 2008
badh2.4	(AT)n repeat	intron 4	Suyunuo	
badh2.5	2 bp SNPs	intron 8	Chuanxiang-29B	Sun *et al*., 2008
badh2.6	MITE deletion	promoter	Azucena	Bourgis *et al*., 2008
badh2.9	7 bp deletion	exon 2	Wuxiangjing9	Shi *et al*., 2008
badh2.8	7 bp insertion	exon 8	Pusa 1121	Amarawathi *et al*., 2008
badh2.10	5+3 bp deletion	exon 7	Pusa 1121	
badh2.11	7 bp deletion	exon 2	Tropical japonica	Kovach *et al*., 2009
badh2.12	2 bp deletion	exon 1	Tropical japonica	
badh2.13	1 bp insertion	exon 10	Tropical japonica	
badh2.14	1 bp deletion	exon 10	Indica	
badh2.15	G to T substitution	exon 10	Aus	
badh2.16	1 bp insertion	exon 14	Aus	
badh2.17	3 bp insertion	exon 13	Group V	
badh2.18	G to T substitution	exon 14	Tropical japonica	
badh2.19	C to T substitution	exon 13	Tropical japonica	
badh2.20	803 bp deletion	exons 4 - 5	Zaimiaoxiangnuo	Shao *et al*., 2011
Badh2.21	3 bp insertion	Exon 13	Pathein Nyunt	Myint *et al*., 2012

พบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ในพืช เช่น ใบเตย (*Pandanus amaryllifolius* Roxb) ดอกชมนาด (*Vallaris glabra* Ktze) ข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L.) ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor* Moench) และถั่วเหลือง (*Glycine max*) ในจุลินทรีย์ เช่น *Bacillus cereus* และยีสต์ทำขนมปัง (baker's yeast) และในสัตว์ เช่น เสือโคร่ง (*Panthera tigris* tigris) เป็นต้น (Seitz *et al*., 1993; Arikit *et al*., 2011) ดังนั้น จึงคาดว่าสารหอม 2AP ในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นนี้อาจมียีนที่เกี่ยวข้องซึ่งส่งผลให้เกิดกลิ่นหอม ดังการศึกษาของ Arikit *et al*. (2011) ที่กล่าวถึงยีนความหอม *GmAMADH1* และ *GmAMADH2* ในถั่วเหลืองซึ่งมีลักษณะเหมือนกับยีน *Os2AP (Badh2)* ในข้าว โดยยีนดังกล่าวประกอบด้วย เอกซอน จำนวน 15 เอกซอน และอินทรอน จำนวน 14 อินทรอน สามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนได้จำนวน 503 ชนิด เช่นเดียวกับข้าว และเมื่อมีการขาดหายของนิวคลี

โอไทด์ TT บริเวณเอกซอน 10 ของยีน *GmAMADH2* จึงส่งผลให้เกิดรหัสหยุดก่อนกำหนด (premature stop codon) ส่งผลทำให้ถั่วเหลืองสามารถสร้างสารให้ความหอมขึ้น (Figure 3)

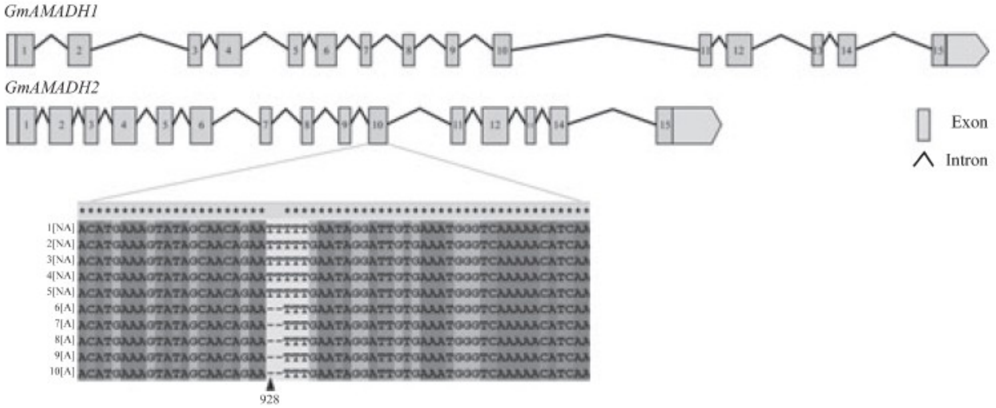

Figure 3 The gene structures of *GmAMADH1* and *GmAMADH2* and the sequence variation, a TT deletion in exon 10 of *GmAMADH2* is a case of fragrance in soybean (Source: Arikit *et al*., 2011).

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวหอม

ข้าวที่ปลูกกันโดยทั่วไปมีความความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวโดยใช้เครื่องหมายไอโซไซม์ (isozyme) พบว่า ข้าวหอมถูกจัดแบ่งอยู่ใน 3 กลุ่มไอโซไซม์ (Khush, 2000) ได้แก่ กลุ่ม V (indica) ซึ่งพันธุ์ข้าวหอมส่วนใหญ่จัดอยู่ในข้าวกลุ่มนี้ พันธุ์ข้าวที่รู้จักกันดีและเป็นที่นิยมบริโภคทั่วโลก คือ บาสมาติ ข้าวหอมพื้นเมืองของอินเดียและปากีสถาน รวมไปถึงพันธุ์ข้าวหอมอื่นๆ ที่ปลูกในอินเดีย ปากีสถาน พม่า อิหร่าน อัฟกานิสถาน บังกลาเทศ และจีน กลุ่มข้าวหอม I (indica) ประกอบด้วย ข้าวหอมมะลิของไทย ข้าวหอมบางพันธุ์จาก จีน เวียดนาม และกัมพูชา และกลุ่ม VI (Tropical japonica) ได้แก่ ข้าวหอมพันธุ์ Azucena และอีกหลากหลายพันธุ์ในอินโดนีเซียและฟิลิปปินส์ (Table 3) นอกจากนี้ ข้าวหอมที่พบในยุโรป เช่น อิตาลี และฝรั่งเศส มีการสันนิษฐานว่าน่าจะเป็นพันธุ์ข้าวที่มาจากข้าวหอมในเอเชียเนื่องจากการเข้าปกครองของยุโรปเมื่อหลายร้อยปีก่อนในภูมิภาคเอเชีย และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และมีการนำพันธุ์ข้าวหอมไปปลูกในพื้นที่ดังกล่าว (Vanavichit *et al*., 2007)

อย่างไรก็ตาม พันธุ์ข้าวหอมส่วนใหญ่พบในข้าวกลุ่มไอโซไซม์ V (indica) มากกว่าข้าวหอมในกลุ่มไอโซไซม์ I (indica) และ VI (Tropical japonica) จึงมีการตั้งสมมุติฐานว่า ต้นกำเนิดของข้าวหอมน่าจะเกิดจากข้าวในกลุ่ม V และมีการถ่ายทอดแอลลีลยีนความหอมไปยังข้าวอินดิกาพันธุ์อื่นๆ (Vanavichit and Yoshihashi, 2010) อย่างไรก็ตาม ยีนความหอม *badh2* (8 bp deletion) อาจไม่ได้มีต้นกำเนิดจากพันธุ์ข้าวป่าเนื่องจากไม่พบยีนความหอมในข้าวป่า *O. rufipogon* และ *O. nivara* ที่นำมาตรวจสอบจากจำนวนทั้งหมด 279 accessions อย่างไรก็ตาม พบเพียง 1 accession เท่านั้นที่มีจีโนไทป์ของยีนความหอมเป็นเฮเทอโรไซกัส แต่ยีน *badh2* สามารถตรวจพบในพันธุ์ข้าวปลูก *O. sativa* ยีนความหอม

Table 3 Classification of aromatic rice cultivars based on isozyme (modified from Khush, 2000)

Group	Cultivar Name	Country of origin
I	Khao Dawk Mali 17	Thailand
	Hhao Mali	Thailand
	Som Hong	Thailand
	Nahng Nuan	Thailand
	Tam Xuan	Vietnam
	Somali	Combodia
	Zhao Xing	Chaina
V	Basmati 370	Myanmar
	Basmati 5853	Myanmar
	Kamod	India
	Pawsan Hmwe	Myanmar
	Kala Nimak	Bangladesh
	Dom Siah	Iran
	Barah	Afghanitan
	Anbarboo	Irag
	Xiang Keng 3	China
	Xiang Nuo 4	China
	Ram Tulsi	India
	Bindli	India
VI	Rojolele	Indonesia
	Xiang Keng3	China
	Milagrosa	Philippines
	Azucena	Philippines

น่าจะเกิดขึ้นตามธรรมชาติภายในข้าวปลูกจาปอนิกา (japonica-type) ในระหว่างกระบวนการวิวัฒนาการเป็นข้าวปลูก (domestication) จากนั้นมีการเคลื่อนย้ายยีนดังกล่าวไปยังข้าวปลูกอินดิกา (indica-type) ซึ่งยืนยันได้จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Badh2* ในข้าวปลูก *O. sativa* จำนวน 242 accessions พบว่า ข้าวไม่หอมในกลุ่มจาปอนิกา wild-type มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับข้าวหอมในกลุ่มข้าวจาปอนิกา ยกเว้นบริเวณที่มีการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์จำนวน 8 นิวคลีโอไทด์บริเวณเอกซอน 7 ซึ่งมีผลทำให้ข้าวมีความหอมเกิดขึ้น (Kovach *et. al.*, 2009) (Figure 4)

แนวทางการใช้ประโยชน์จากยีนความหอม

จากองค์ความรู้ทางด้านอณูพันธุศาสตร์ของยีนความหอมในปัจจุบัน ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอม โดยเฉพาะการปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่มีคุณภาพดีแต่ไม่มีกลิ่นหอม ให้เป็นข้าวที่มีคุณภาพดีและมีกลิ่นหอม เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับข้าวพันธุ์ดังกล่าว โดยใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรมและการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนาจากยีน *badh2* เป็นเครื่องมือช่วยในการคัดเลือก (marker-assisted selection: MAS) นอกจากนี้ เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความจำเพาะกับยีน *badh2* สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบเอกลักษณ์ของพันธุ์ข้าวหอม เพื่อการส่งออกได้อย่างมีประสิทธิภาพ ตัวอย่างเช่น การตรวจสอบการปลอมปนของข้าวหอมมะลิของไทย จากการศึกษาของ วราพงษ์ และคณะ (2554) ซึ่งใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอตรวจสอบความบริสุทธิ์ของตัวอย่างข้าวหอมมะลิไทยจากตลาดค้าปลีกและค้าส่งในสาธารณรัฐประชาชนจีน โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลตรวจสอบลักษณะคุณภาพการหุงต้มจำนวน 4 เครื่องหมาย และเครื่องหมายโมเลกุล BADEX7-5_8SF/R ในการตรวจสอบข้าวหอมและไม่หอม พบว่าข้าวหอมมะลิไทยที่ขายในประเทศจีนส่วนใหญ่มีการปลอมปน ผลจากการศึกษาดังกล่าวนำมาซึ่งแนวทางการป้องกันการปลอมปนของข้าวหอมมะลิไทยในตลาดทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ ทั้งนี้เพื่อรักษาเอกลักษณ์และคุณภาพข้าวไทยในตลาดโลก

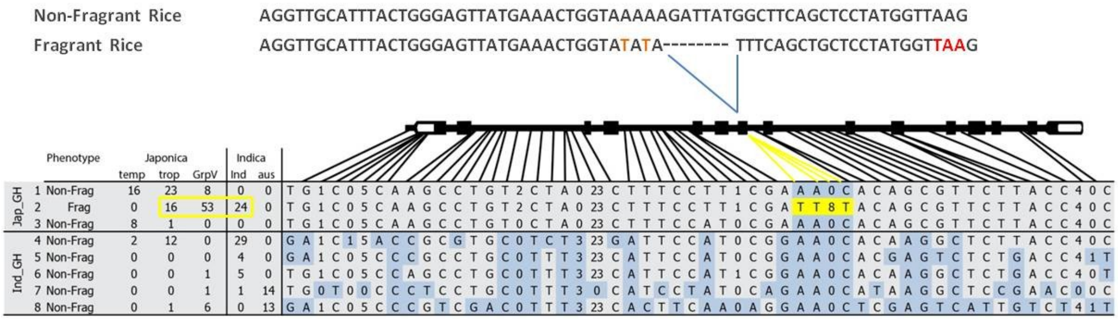

Figure 4 Haplotype analysis of the *Badh2* gene region. Sequence reads across the *Badh2* gene were aligned for 242 *O. sativa* accessions and all polymorphisms (frequency > 5%) were concatenated and used to create eight gene haplotypes. Haplotypes are numbered 1 through 8 followed by the corresponding fragrance phenotype, and the number of accessions from each subpopulation possessing that haplotype. Two gene haplotype clusters were identified: the Japonica Gene Haplotype Cluster (Jap_GH) and Indica Gene Haplotype Cluster (Ind_GH) (Source: modified from Kovach *et al*., 2009).

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอมโดยใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรม

หลังจากที่มีการโคลนยีนความหอมสำเร็จ ทำให้นักวิจัยทราบถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนความหอม และทราบถึงกระบวนการแสดงออกของยีน ซึ่งหากมีการยับยั้งการแสดงออกของยีน *Badh2* จะทำให้ข้าวมีกลิ่นหอม ดังนั้นหากต้องการเปลี่ยนข้าวไม่หอมให้เป็นข้าวหอมจะต้องยับยั้ง หรือกดการทำงานของยีน *Badh2* ไม่ให้สามารถทำงานได้ เทคโนโลยีที่ใช้ในการกดการทำงานของยีนอย่างได้ผล คือ RNA interference (RNAi) ซึ่งเป็นกระบวนการควบคุมการแสดงออกของลักษณะทางพันธุกรรมอย่างหนึ่ง ที่พบในสิ่งมีชีวิตทั้งพืช และสัตว์ เป็นต้น โดยอาศัยการทำงานของอาร์เอ็นเอเส้นคู่ (double strand RNA: dsRNA) ซึ่งจะมีผลไปยับยั้งการทำงานของ messenger RNA (mRNA) ของยีนนั้นโดยตรง

เทคโนโลยี RNAi เป็นกลไกในการทำลาย mRNA เป้าหมาย โดยการใส่ชิ้นส่วนของยีน *Badh2* ที่ถอดรหัสเป็นอาร์เอ็นเอเส้นคู่ (dsRNA) เข้าไปในเซลล์โดยการถ่ายยีน ทำให้เกิดชิ้นส่วนที่อยู่ในลักษณะกลับทิศทางกันกับ mRNA ของยีน *Badh2* ชิ้นส่วนที่ใส่เข้าไปนี้เมื่อเข้าไปในเซลล์จะถูกย่อยเป็นอาร์เอ็นเอชิ้นเล็กๆ แล้วอาร์เอ็นเอชิ้นเล็กๆ เหล่านี้จะมีส่วนที่สามารถเข้าคู่กับ mRNA ของยีน *Badh2* ได้ทำให้ mRNA ของยีน *Badh2* ถูกทำลาย ดังนั้น จึงไม่สามารถสร้างเอนไซม์ BADH เพื่อเปลี่ยนสาร GABald เป็นสาร GABA ได้ แต่จะเปลี่ยนเป็นสารหอม 2AP แทน ทำให้ข้าวมีกลิ่นหอมเหมือนกับข้าวหอม (Niu *et al*., 2008; Vanavichit *et al*., 2008)

ปัจจุบันการทำ RNAi เพื่อเปลี่ยนข้าวไม่หอมให้เป็นข้าวหอม ประสบความสำเร็จแล้วในระดับห้องปฏิบัติการ โดยทีมนักวิจัยจากหน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (Vanavichit *et al*., 2008) อย่างไรก็ตาม วิธีการดังกล่าวเป็นวิธีการทางด้านพันธุวิศวกรรม ซึ่งทำให้

ข้าวหอมที่สร้างขึ้นมาได้นี้เป็นข้าวดัดแปลงพันธุกรรม (genetically modified rice) ในประเทศไทยอนุญาตให้ทำการศึกษาวิจัยได้ แต่ไม่อนุญาตให้ผลิตเป็นเชิงพาณิชย์ อีกทั้งพืชดัดแปลงพันธุกรรมยังไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคในประเทศไทย จึงเป็นข้อจำกัดของการใช้ข้าวหอมที่เกิดจากการทำ RNAi ในเชิงพาณิชย์ ถึงแม้วิธีการดังกล่าวจะเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ มีความแม่นยำ และมีความจำเพาะกับยีนความหอมสูง แต่ก็มีข้อจำกัดเกี่ยวกับการยอมรับของประชาชน ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอมโดยการตัดต่อพันธุกรรมจึงยังไม่เหมาะสมที่จะผลิตเป็นเชิงพาณิชย์ในประเทศไทย

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอมโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก

หลังจากที่มีการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลตรงตำแหน่งยีน *badh2* ซึ่งควบคุมลักษณะความหอมของข้าว (Table 4) เครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวสามารถนำไปใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก (MAS) ยีนความหอมในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีความหอมในโครงการต่างๆ มากมาย (Table 5) เช่น การปรับปรุงพันธุ์ข้าว Manawthukha ของพม่า ที่ไม่มีกลิ่นหอมให้มีกลิ่นหอมและมีลักษณะการหุงต้มดี โดยใช้ข้าวหอมพันธุ์ Basmati 370 เป็นสายพันธุ์ให้ยีนความหอม และใช้เครื่องหมายโมเลกุล Aromarker ช่วยในการคัดเลือกลักษณะความหอมในการปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับ (marker-assisted backcrossing) ทำให้ได้ข้าวที่มีกลิ่นหอมคล้ายข้าว Basmati 370 (Yi *et al.*, 2009) และการปรับปรุงพันธุ์ข้าว II-32B ให้มีกลิ่นหอม โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล *badh2*-E7 ช่วยในการคัดเลือกร่วมในการปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับ โดยมีข้าวหอมพันธุ์ Yixiang B เป็นสายพันธุ์ให้ยีนความหอมจนได้ข้าวสายพันธุ์คล้าย II-32B ที่มีกลิ่นหอม (Jin *et al.*, 2010)

นอกจากความสำเร็จในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีความหอม โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือกในต่างประเทศแล้ว ในประเทศไทยก็ประสบความสำเร็จในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีกลิ่นหอม โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก เช่น การปรับปรุงสายพันธุ์ข้าว IR57514 PMI-5-B-1-2 ให้มีกลิ่นหอมและมีคุณภาพการหุงต้มคล้ายข้าวหอมมะลิ IR57514 PMI-5-B-1-2 เป็นสายพันธุ์ข้าวที่ให้ผลผลิตสูง ปรับตัวได้ดีในเขตพื้นที่ลุ่มอาศัยน้ำฝน บริเวณแม่น้ำโขง สามารถทนต่อสภาพแห้งแล้ง และน้ำท่วมฉับพลันได้ (Jearakongman *et al.*, 1995; Ouk *et al.*, 2006; Romyen *et al.*, 1998) การปรับปรุงพันธุ์สายพันธุ์ข้าว IR57514 นี้ ใช้ข้าวสายพันธุ์ KD571-77 ซึ่งเป็นข้าวสายพันธุ์คล้ายข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ผนวกยีนทนน้ำท่วมฉับพลัน เป็นสายพันธุ์ให้ลักษณะความหอม และคุณภาพการหุงต้มคล้ายข้าวหอมมะลิ ปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับและใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก ในแต่ละรุ่นของการผสมกลับจะใช้เครื่องหมายโมเลกุล Aromarker คัดเลือกลักษณะความหอมของยีน *badh2* จนได้ประชากร BC_3F_3 ที่มีกลิ่นหอมคล้ายข้าวหอมมะลิ จำนวน 12 สายพันธุ์ (Kate-ngam *et al.*, 2011) และการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีลักษณะทนน้ำท่วม และมีคุณภาพการหุงต้มดี โดยผสมระหว่างข้าวสายพันธุ์ IR57514 กับข้าวขาวดอกมะลิ 105 และใช้เครื่องหมายโมเลกุล Aromarker ช่วยในการคัดเลือกยีน *badh2* โดยใช้วิธีการปรับปรุงพันธุ์แบบ single seed descent ได้พันธุ์ข้าวในกลุ่ม (ideotype, ID) ID1 และ ID2 ที่มีลักษณะความหอมคล้ายข้าวหอมมะลิ (Jantaboon *et al.,* 2011) เป็นต้น

จากตัวอย่างความสำเร็จข้างต้น แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล

Table 4 List of DNA markers developed from *Badh2* gene

Name	Location	Primers (5′ to 3′)	Expected fragment size in fragrant/non-fragrant rice (bp)	Reference
badh2-E2	7 bp deletion in exon 2	F-CCTCTGCTTCTGCCTCTGAT R-GATTGCGCGGAGGTACTTG	200/207	Shi *et al*., 2008
FMbadh2-E4-5	803 bp deletion between exons 4 and 5	F-TGCTGGATGCTTTGAGTA R-GTTTAGCACACCTGAAGGAAGACCA	321/1123	Shao *et al*., 2011
badh2-E7	8 bp deletion in exon 7	F- GGTTGCATTTACTGGGAGTT R-CAGTGAAACAGGCTGTCAAG	260/268	Shi *et al*., 2008
BADEX7-1	8 bp deletion in exon 7	F-TTGTTTGGAGCTTGCTGATG R-TTTTTCCACCAAGTTCCAGTG	481/489	Sakthivel *et al*., 2009
BADEX7-2	8 bp deletion in exon 7	F-TGCTCCTTTGTCATCACACC R-TTCCACCAAGTTCCAGTGAA	391/399	Sakthivel *et al*., 2009
BADEX7-3	8 bp deletion in exon 7	F-AGGACTTGTTTGGAGCTTGC R-AACCATAGGAGCAGCTGAAG	265/273	Sakthivel *et al*., 2009
BADEX7-4	8 bp deletion in exon 7	F-TGCTCCTTTGTCATCACACC R-TGGAAACAAACCTTAACCATAGG	187/195	Sakthivel *et al*., 2009
BADEX7-5	8 bp deletion in exon 7	F-TGTTTTCTGTTAGGTTGCATT R-ATCCACAGAAATTTGGAAAC	95/103	Sakthivel *et al*., 2009

Table 4 Continued.

Name	Location	Primers (5′ to 3′)	Expected fragment size in fragrant/non-fragrant rice (bp)	Reference
BADEX7-6	8 bp deletion in exon 7	F-GGTTGCATTTACTGGGAGTTATG R-AACCATAGGAGCAGCTGAAG	56/64	Sakthivel *et al*., 2009
Aromarker	8 bp deletion in exon 7	F-TGCTCCTTTGTCATCACACC R-TTTCCACCAAGTTCCAGTGA	392/400	Riabroy, 2012
nksbad2	8 bp deletion in exon 7	F-GGTTGCATTTACTGGGAGTTATG R-TCCACAGAAATTTGGAAACAAAC	82/90	Amarawathi *et al*., 2008
Allele specific amplification (ASA)	8 bp deletion in exon 7	External sense primer (ESP) TTGTTTGGAGCTTGCTGATG Internal fragrant antisense primer (IFAP) CATAGGAGCAGCTGAAATATATACC Internal non-fragrant sense primer (INSP) CTGGTAAAAAGATTATGGCTTCA External antisense primer (EAP) AGTGCTTTACAAAGTCCCGC	580, 257/ 580, 355	Bradbury *et al*., 2005b

Table 5 Example of marker- assisted selection for aroma in rice breeding program.

Referance	Crossing	Donor of fragrance	Marker	Type of marker
Suriya-arunroj, 2005	KDML105 x FL530	KDML105	10L03_FW	SSR
	KDML105 x FL496			
Toojinda *et al.*, 2005	KDML105 X FR13A	KDML105	Aromarker	INDEL
	KDML105 X IR1188			
	KDML105 X Abhaya			
	KDML105 X IR68835			
Siangliw *et al.*, 2007	KDML105 X IR68586-F_2-CA-31	KDML105	BADH	INDEL
	KDML105 X IR68586-F_2-CA-54			
	KDML105 X IR68586-F_2-CA-143			
Theeraamphon, 2008	RD6 X P 0489	RD6	BADH	INDEL
Jairin *et al.*, 2009	KDML105 X Rathu Heenati	KDML105	BO3_127.8	SSR
Yi *et al.*, 2009	Manawthukha X Basmati370	Basmati370	Aromarker	INDEL
Jin *et al.*, 2010	II-32B X Yixiang B	Yixiang	*badh2-E7*, *badh2-E2*	Functional markers
Wongsaprom, 2010	RD6 X Jao Hom Nin	RD6	BADH	INDEL
Rajpurohit *et al.*, 2011	Type 3 Basmati X PR106-P2	Type 3 Basmati	RM42	SSR
Jantaboon *et al.*, 2011	KDML105 X IR57514	KDML105	Aromarker	INDEL
Kate-ngam *et al.*, 2011	IR57514 X KD571-77	KD571-77	Aromarker	INDEL
Kiani, 2011	Neda X Sang tarom	Sang tarom	ASA	Functional markers
Salgotra *et al.*, 2011	IRS544-1-2 X IRBB55	IRS 544-1-2	RM515	SSR

มาใช้เป็นเครื่องมือช่วยในการคัดเลือก ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีกลิ่นหอม ซึ่งวิธีการมีความแม่นยำสูง สามารถลดระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ให้สั้นลง อีกทั้งยังเป็นวิธีการปรับปรุงพันธุ์แบบมาตรฐานซึ่งผู้บริโภคให้การยอมรับมากกว่าการเพิ่มความหอมในข้าวโดยการดัดแปลงพันธุกรรม ดังนั้นการใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือกจึงเป็นวิธีการที่เหมาะสมในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวไม่หอมให้เป็นข้าวหอมในปัจจุบัน

สรุป

ความหอมของข้าวเกิดจากสาร 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) ซึ่งถูกสังเคราะห์ในวิถี polyamine โดยมีกรดอะมิโน proline เป็นสารตั้งต้น และถูกควบคุมด้วยยีนด้อย *badh*2 ซึ่งมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 8 ในสภาพปกติยีนเด่น *Badh*2 จะสร้างเอ็นไซม์ BADH ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยนสาร GABald เป็นสาร GABA แต่ถ้ายีนดังกล่าวเกิดการกลายพันธุ์เป็นยีนด้อย *badh*2 ทำให้เอนไซม์ BADH ที่สร้างขึ้นไม่สมบูรณ์ ดังนั้น ข้าวจึงเปลี่ยนสาร GABald ไปเป็นสาร 2AP ทำให้ข้าวมีกลิ่นหอม จากองค์ความรู้ดังกล่าวนำมาซึ่งแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีกลิ่นหอม โดยการใช้เทคโนโลยี RNAi เพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน *Badh*2 และการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความจำเพาะกับยีน *badh*2 ช่วยคัดเลือก นอกจากนี้เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความจำเพาะกับยีนความหอมสามารถนำมาใช้ตรวจสอบเอกลักษณ์ของพันธุ์ข้าวหอมมะลิ เพื่อประโยชน์ในการส่งออกข้าวเชิงพาณิชย์ และใช้ในการสืบค้นหายีนความหอมในข้าวพื้นเมืองเพื่อใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

กรมทรัพย์สินทางปัญญา. (2550) การขึ้นทะเบียนสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์ข้าวหอมมะลิทุ่งกุลาร้องไห้ ทะเบียนเลขที่ สช 50100022. ประกาศกรมทรัพย์สินทางปัญญา. วันที่ 24 ตุลาคม พ.ศ. 2550.

วาสนา วรมิศร์. (2538) การปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอมของไทย ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

วราพงษ์ ชมาฤกษ์ พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์ พยอม โคเบลลี่ พิกุล ลีลากุด และ รุ่งนภา กาวิชัย. (2554) การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของตัวอย่างข้าวหอมมะลิไทยจากตลาดค้าปลีกและค้าส่งในสาธารณรัฐประชาชนจีนด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ. ใน:ประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาว เนื่องในโอกาสวันข้าวและชาวนาแห่งชาติ ครั้งที่ 2, วันที่ 3-4 มิถุนายน 2554 โรงแรมอมารี ดอนเมือง จังหวัดกรุงเทพฯ. น. 63–78.

Ahn SN, Bollisch CN and Tanksley SD (1992) RFLP tagging of a gene for aroma in rice. Theor Appl Genet 84: 825–828.

Amarawathi Y, Singh R, Singh AK, Singh VP, Mohapatra T and Sharma TR (2008) Mapping of quantitative trait loci for basmati quality traits in rice (*Oryza sativa* L.). Mol Breeding 21: 49–65.

Arikit S, Yoshihashi T, Wanchana S, Uyen TT, Huong NTT, Wongpornchai S and Vanavichit A (2011) Deficiency in the amino aldehyde dehydrogenase encoded by *GmAMADH2*, the homologue of rice *Os2AP*,

enhances 2-acetyl-1-pyrroline biosynthesis in soybeans (*Glycine max* L.). Plant Biotechnol J 9: 75–87.

Bourgis F, Guyot R, Gherbi H, Tailliez E, Amabile I and Salse J (2008) Characterization of the major fragrance gene from an aromatic japonica rice and analysis of its diversity in Asian cultivated rice. Theor Appl Genet 117: 353–368.

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

Bradbury LMT, Henry RJ, Jin Q, Reinke RF and Waters DLE (2005b) A perfect marker for fragrance genotyping in rice. Mol Breeding 16: 279-283.

Bradbury LMT, Gillies SA, Brushett DJ, Waters DLE and Henry RJ (2008) Inactivation of an aminoaldehyde dehydrogenase is responsible for fragrance in rice. Plant Mol Biol 68: 439–449.

Bryant RJ and McClung AM (2011) Volatile profiles of aromatic and non-aromatic rice cultivars using SPME/GC–MS. Food Chem 124: 501–513.

Buttery RG, Ling LC and Juliano BO (1982) 2-acetyl-1-pyrroline an important aroma component of cooked rice. Chem Ind 12: 958–959.

Buttery RG, Ling LC, Juliano BO and Turnbauhg JG (1983) Cooked rice aroma and 2-acetyl-1-pyrroline. J Agr Food Chem 31: 823–826.

Chen S, Wu J, Yang Y, Shi W and Xu M (2006) The *fgr* gene responsible for rice fragrance was restricted within 69 kb. Plant Sci 171: 505–514.

Chen S, Yang Y, Shi W, Ji Q, He F and Zhang Z (2008) *Badh2*, encoding betaine aldehyde dehydrogenase, inhibits the biosynthesis of 2-acetyl-1-pyrroline, a major component in rice fragrance. Plant Cell 20: 1850–1861.

Efferson JNE (1985) Rice quality in world markets. In: IRRI (ed.) Rice Grain Quality and Marketing. IRRI. Manila. 1-13.

Fitzgerald TL, Waters DLE and Henry RJ (2009) Betaine aldehyde dehydrogenase in plants. Plant Biol 11: 119–130.

Itani T, Tamaki M, Hayata Y, Fushimi T and Hashizume K (2004) Variation of 2-acetyl-1-pyrroline concentration in aromatic rice grains collected in the same region in Japan and factors affecting its concentration. Plant Prod Sci 7: 178–183.

Jairin J, Teangdeerith S, Leelagud P, Kothcharerk J, Sansen K, Yi M, Vanavichit A and Toojinda T (2009) Development of rice introgression lines with brown planthopper resistance and KDML105 grain quality characteristics through marker-assisted selection. Field Crop Res 110: 263–271.

Jantaboon J, Siangliw M, Im-mark S, Jamboonsri W, Vanavichit A and Toojinda T (2011) Ideotype breeding for submergence tolerance and cooking quality by marker-assisted selection in rice. Field Crop Res

123: 206–213.

Jearakongman S, Rajatasereekul S, Naklang K, Romyen P, Fukai S, Skulkhu E, Jumpaket B and Nathabutr K (1995) Growth and grain yield of contrasting rice cultivars grown under different conditions of water availability. Field Crop Res 44: 139-150.

Jin L, Lu Y, Shao Y, Zhang G, Xiao P, Shen S, Corke H and Bao J (2010) Molecular marker assisted selection for improvement of the eating, cooking and sensory quality of rice (*Oryza sativa* L.). J Cereal Sci 51: 159–164.

Kate-ngam S, Riabroy K, Toojinda T and Kotchasatit U. (2011) Conversion of wide adapted rice cultivar IR57514 into Jasmine-like cooking quality through marker assisted backcrossing. In: BIT's 2nd World DNA and Genome Day-2011, Reopen Bio-Gateway in Green Economy Era. Dalian World EXPO Center, China. pp.286.

Khush GS (2000) Taxonomy and origin of rice. In: Singh RK, Singh US and Khush GH (eds.) Aromatic Rices. Oxford and IBH Publishing, New Delhi, Calcutta. pp. 5–13.

Kiani G (2011) Marker aided selection for aroma in F_2 populations of rice. Afr J Biotechnol 10: 15845-15848.

Kovach MJ, Calingacion MN, Fitzgerald MA and McCouch SR (2009) The origin and evolution of fragrance in rice (*Oryza sativa* L.). PNAS 106: 14444-14449.

Lorieux M, Petrov M, Huang N, Guiderdoni E and Ghesquière A (1996) Aroma in rice: genetic analysis of a quantitative trait. Theor Appl Genet 93: 1145-1151.

Mahatheeranont S, Keawsa-ard S and Dumri K (2001) Quantification of the rice aroma compound, 2-acetyl-1-pyrroline, in uncooked Khao Dawk Mali 105 brown rice. J Agr Food Chem 49: 773-779.

Myint KM, Arikit S, Wanchana S, Yoshihashi T, Choowongkomon K, and Vanavichit A. (2012) A PCR-based marker for a locus conferring the aroma in Myanmar rice (*Oryza sativa* L.). Theor Appl Genet 125: 887–896.

Niu X, Tang W, Huang W, Ren G, Wang Q, Luo D, Xiao Y, Yang S, Wang F and Lu BR (2008) RNAi- directed downregulation of *OsBADH2* results in aroma (2-acetyl-1-pyrroline) production in rice (*Oryza sativa* L.). BMC Plant Biology http://www.biomedcentral.com/1471-2229/8/100.

Ouk M, Basnayake J, Tsubo M, Fukai S, Fischer KS, Cooper M and Nesbitt H (2006) Use of drought response index for identification of drought tolerant genotypes in rainfed lowland rice. Field Crop Res 99: 48-58.

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.

Prathepha P (2009) The fragrance (*fgr*) gene in natural populations of wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.). Genet Resour Crop Ev 56: 13–18.

Rajpurohit D, Kumar R, Kumar M, Paul P, Awasthi A, Basha PO, Puri A, Jhang T, Singh K and Dhaliwa HS (2011) Pyramiding of two bacterial blight resistance and a semidwarfing gene in Type 3 Basmati using marker-assisted selection. Euphytica 178: 111–126.

Riabroy K, Toojinda T and Kate-ngam S (2012) Application of functional markers in IR57514 backcross breeding to jasmine-like cooking quality for rainfed lowland in Mekong region. In: 10th International Symposium on Rice Functional Genomics. November 26-29, Chiang Mai, Thailand. PG14.

Romyen P, Hanviriyapant P, Rajatasereekul S, Khunthasuvon S, Fukai S, Basnayake J and Skulkhu E (1998) Lowland rice improvement in northern and northeast Thailand: 2. Cultivar differences. Field Crop Res 59: 109-119.

Sakthivel K, Sundaram RM, Rani NS, Balachandran SM and Neeraja CN (2009) Genetic and molecular basis of fragrance in rice. Biotechnol Adv 27: 468–473.

Salgotra RK, Millwood RJ, Agarwal S and Stewart CN (2011) High-throughput functional marker assay for detection of *Xa/xa* and *fgr* genes in rice (*Oryza sativa* L.). Electrophoresis 32: 2216–2222.

Seitz LM, Wright RL, Waniska RD and Rooney LW (1993) Contribution of 2-acetyl-1-pyrroline to odors from wetted ground pearl millet. J Agr Food Chem 41: 955–958.

Shao GN, Tang A, Tang SQ, Luo J, Jiao GA, Wu JL and Hu PS (2011) A new deletion mutation of fragrant gene and the development of three molecular markers for fragrance in rice. Plant breed 130: 172–176.

Shi W, Yang Y, Chen S and Xu M (2008) Discovery of a new fragrance allele and the development of functional markers for the breeding of fragrant rice varieties. Mol Breed 22: 185–192.

Siangliw JL, Jongdee B, Pantuwan G and Toojinda T (2007) Developing KDML105 backcross introgression lines using marker-assisted selection for QTLs associated with drought tolerance in rice. Sci Asia 33: 207–214.

Singh VP (2000) Basmati Rice of India. In: Singh RK, Singh US and Khush GH (eds.) Aromatic Rices. Oxford and IBH Publishing, New Delhi, Calcutta. pp. 135–151.

Sun SH, Gao FY, Lu XJ, Wu XJ, Wang XD, Ren GJ and Luo H (2008) Genetic analysis and gene fine mapping of aroma in rice (*Oryza sativa* L. Cyperales, Poaceae). Genet Mol Biol 31: 532–538.

Suriya-arunroj D (2005) Molecular breeding for salt tolerance: introgression salt tolerant QTL conferring Na^+/K^+ ratio in Thai Hom Mali rice. Ph.D. Thesis. Kasetsart University. Bangkok.

Theeraamphon C (2008) Introgression of rice resistance into the rice cultivar RD6 using marker assisted selection. M.S. Thesis. Khon Kaen University. Khon Kaen.

Toojinda T, Tragoonrung S, Vanavichit A, Siangliw JL, Pa-tn N, Jantaboon J, Siangliw M and Fukai S (2005) Molecular breeding

for rainfed lowland rice in the Mekong region. Plant Prod Sci 8: 330-333.

Vanavichit A (2007) Molecular diversity and evolution of aromatic rice in Thailand. In: International Training Workshop, The Conservation and Utilization of Tropical/ Subtropical Plant Genetic Resources. Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture (TARIC), Taiwan. pp. 131–134.

Vanavichit A and Yoshihashi T (2010) Molecular aspects of fragrance and aroma in rice. Adv Botan Res 56: 49-73.

Vanavichit A, Tragoonrung S, Toojinda T, Wanchana S and Kamolsukyunyong W (2008) Transgenic rice plants with reduced expression of *Os2AP* and elevated levels of 2-acetyl-1-pyrroline. United States Patent. Patent No. 7,319,181.

Vanavichit A, Tragoonrung S, Toojinda T, Wanchana S and Kamolsukyunyong W (2010) *BADH2* nucleic acids associated with grain aroma. United States Patent. Patent No. US 7,847,083 B2.

Vanavichit A, Yoshihashi T, Wanchana S, Areekit S, Saengsraku D, Kamolsukyunyong W, Lanceras J, Toojinda T and Tragoonrung S (2005) Positional Cloning of *Os2AP*, the aromatic gene controlling the biosynthetic switch of 2-acetyl-1-pyrroline and gamma aminobutyric acid (GABA) in rice. In: The 5th International Rice Genetic Symposium. Manila, Phillipines.

Wanchana S, Kamolsukyunyong W, Ruengphayak S, Toojinda T, Tragoonrung S and Vanavichit A (2005) A rapid construction of a physical contig across a 4.5 cM region for rice grain aroma facilitates marker enrichment for positional cloning. Sci Asia 31: 299–306.

Widjaja R, Craske JD and Wootton M (1996) Comparative studies on volatile components of non-fragrant and fragrant rices. J Sci Food Agric 70: 151–161.

Wongsaprom C (2010) Quantitative Trait Loci (QTL) mapping and marker-assisted selection to develop a broad spectrum resistance rice (*Oryza sativa* L. cv. RD6). M.S. Thesis. Kasetsart University. Bangkok.

Yajima I, Yanai T, Nakamura M, Sakakibara H and Habu T (1979) Volatile flavor components of cooked rice kaorimai (scented rice, *O. sativa japonica*). Agr Biol Chem 43: 2425–2429.

Yi M, Nwe KT, Vanavichit A, Chai-arree W and Toojinda T (2009) Marker assisted backcross breeding to improve cooking quality traits in Myanmar rice cultivar Manawthukha. Field Crop Res 113: 178–186.

Yoshihashi T (2002) Quantitative analysis on 2-acetyl-1-pyrroline of an aromatic rice by stable isotope dilution method and model studies on its formation during cooking. J Food Sci 67: 619-622.

Yoshihashi T, Nguyen TTH and Kabaki N (2004) Area dependency of 2-acetyl-1-pyrroline content in an aromatic rice variety, Khao Dawk Mali 105. JARQ 38: 105–109.