

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



E42114



**METABOLOMICS OF FRAGRANCE AND YIELD
COMPONENTS OF TRADITIONAL
AND IMPROVED LAO RICES**

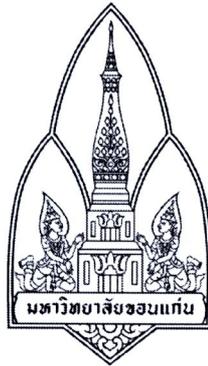
MRS. CHANTHAKHONE BOUALAPHANE

**A THESIS FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
KHON KAEN UNIVERSITY**

2011

600256212

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



**METABOLOMICS OF FRAGRANCE AND YIELD
COMPONENTS OF TRADITIONAL
AND IMPROVED LAO RICES**



MRS. CHANTHAKHONE BOUALAPHANH

**A THESIS FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
KHON KAEN UNIVERSITY**

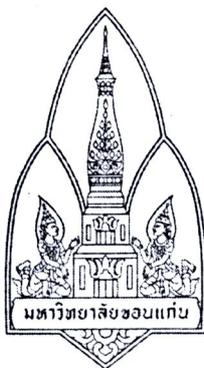
2011

**METABOLOMICS OF FRAGRANCE AND YIELD
COMPONENTS OF TRADITIONAL
AND IMPROVED LAO RICES**

MRS. CHANTHAKHONE BOUALAPHANH

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT OF THE
REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN AGRONOMY
GRADUATE SCHOOL KHON KAEN UNIVERSITY**

2011



**THESIS APPROVAL
KHON KAEN UNIVERSITY
FOR
DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN AGRONOMY**

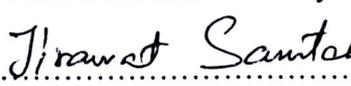
Thesis Title: Metabolomics of fragrance and yield components of traditional and improved Lao rices

Author: Mrs. Chanthakhone Boualaphanh

Thesis Examination Committee

Assoc. Prof. Dr. Prasit Jaisil	Chairperson
Assist. Prof. Dr. Darunee Jothityangkoon	Member
Dr. Jirawat Sanitchon	Member
Dr. Melissa Fitzgerald	Member
Dr. Boonrat Jongdee	Member

Thesis Advisors:

 (Assist. Prof. Dr. Darunee Jothityangkoon)	Advisor
 (Dr. Jirawat Sanitchon)	Co-advisor
 (Dr. Melissa Fitzgerald)	Co-advisor


.....
(Assoc. Prof. Dr. Lampang Manmart)
Dean, Graduate School


.....
(Assoc. Prof. Dr. Anan Polthanee)
Dean, Faculty of Agriculture

จันทร์คอนบัวละพัน. 2554. เมแทบอลอเมติกส์ (metabolomics) ของความหอม และองค์ประกอบ
ผลผลิตข้าวพันธุ์พื้นเมือง และพันธุ์ปรับปรุงของลาว. วิทยานิพนธ์ปริญญาคุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาพืชไร่ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ผศ.ดร.ดรุณี โชติษฐยางกูร, ดร.จิรวัดน์ สนิทชน,
ดร.เมธิสสา พิษเจรารัตต์

บทคัดย่อ

E 42114

ข้าวเหนียวเป็นอาหารหลักของประชาชนของสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว ข้าว
เหนียวพันธุ์พื้นเมืองบางพันธุ์ที่กลิ่นหอมพิเศษ เช่นพันธุ์หอมนางนวลและพันธุ์ไก่อ้น้อยเหลือง อย่าง
ไรก็ตาม ข้าวเหนียวพื้นเมืองทั้งสองพันธุ์นี้ให้ผลผลิตต่ำ ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ข้าวของสาธารณ
รัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว จึงจำเป็นต้องเพิ่มความหอมให้กับกับข้าวพันธุ์ปรับปรุงซึ่งมีผล
ผลิตที่สูงแล้วเช่น พันธุ์ท่าดอกคำ 1 และพันธุ์ท่าสะโน 1 ความสำเร็จในการพัฒนาพันธุ์จะส่ง ผลต่อ
เศรษฐกิจ และการส่งออกข้าวของประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว การศึกษาครั้งนี้
มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) คัดเลือกพันธุ์ข้าวที่จะใช้สำหรับเป็นพ่อแม่พันธุ์ ในการพัฒนาประชากรสำ
หรับการค้าตำแหน่งยีนซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างสารความหอม 2) เพื่อศึกษาความแตก
ต่างของสารในเมล็ดข้าวแต่ละพันธุ์ ที่มีความเป็นเอกลักษณ์ของเมแทบอลอเมติกส์ (metabolomic)
รสชาติ และกลิ่นที่โดดเด่นเฉพาะในข้าวเหนียวหอมแต่ละพันธุ์ที่ใช้ศึกษา 3) เพื่อจำแนกกระบวนการ
ทางชีวเคมีที่สังเคราะห์สาร 2AP และระบุพันธุกรรมที่ควบคุมการสร้างสารหอมในข้าวเหนียว
พันธุ์ไก่อ้น้อยเหลือง การศึกษาครั้งนี้ เริ่มจากการศึกษาผลของไนโตรเจนที่มีต่อผลผลิต คุณภาพเมล็ด
โดยเฉพาะสาร 2AP โปรตีนในเมล็ด อุณหภูมิแป้งสุก คุณภาพเนื้อเมล็ด และความเหนียว เพื่อคัด
เลือกพันธุ์ข้าวที่จะใช้เป็นสายพันธุ์รับสำหรับการศึกษาต่อไป (Chapter III) พันธุ์ข้าวที่ใช้สำหรับ
สร้างประชากรเพื่อการศึกษาครั้งนี้ ใช้พันธุ์ท่าสะโน 1 เป็นพันธุ์รับ (recurrent) ส่วนพันธุ์ให้
(donor) ใช้พันธุ์หอมนางนวลและพันธุ์ไก่อ้น้อยเหลือง ซึ่งทั้งสองพันธุ์เป็นพันธุ์ที่มีคุณภาพเมล็ดสูง
มาก ข้าวทั้งสามพันธุ์ที่ใช้ศึกษา สามารถจำแนกความแตกต่างโดยใช้ primary metabolite สารหอม
ระเหย สารอาหาร ซึ่งพบว่าคุณสมบัติเหล่านี้ ใช้จำแนกพันธุ์ได้ดี (Chapter IV) และประชากร สำ
หรับการศึกษาได้สร้างขึ้นจากการผสมโดยใช้พันธุ์ท่าสะโน 1 เป็นพันธุ์รับ แล้วได้ปรับปรุงประชา
กรโดยใช้วิธีการผสมกลับ จนกระทั่งได้ประชากรชั่วรุ่น BC₄F₂ ประชากรหอมนางนวลสร้างขึ้นเพื่อ
ค้นหาสารประกอบที่สังเคราะห์ขึ้นใน pathway ของการสร้างสารหอม ส่วนประชากรไก่อ้น้อย
เหลือง สร้างเพื่อการศึกษาพันธุกรรมที่ควบคุมการสร้างสารหอมในข้าวพันธุ์ดัง กล่าว นอกจากนี้ยัง

E 42114

มีการพัฒนาประชากรอีก 2 ประชากร คือ 1) ประชากรที่ได้จากการพันธุ์ทำสะโนและไถ่น้อยเหลือง ประชากรดังกล่าวในชั่วรุ่น F_2 ถูกนำมาทดสอบสมมติฐานทางพันธุศาสตร์ (Chapter VII) 2) ประชากรที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์หอมนางนวลและไถ่น้อยเหลือง แล้วพัฒนาจนกระทั่งได้ ลูกชั่วรุ่น F_5 ใช้ทดสอบสมมติฐานที่ว่ายีนควบคุมสารหอมที่ได้จากพันธุ์ไถ่น้อยเหลืองเกิดจากการ กลายพันธุ์มากกว่าที่เกิดในพันธุ์หอมนางนวล

การศึกษา pathway ของความหอม ได้ใช้ประชากรหอมนางนวล BC_4F_2 โดยใช้ Single Nucleotide Polymorphism (SNP) ศึกษาทางด้าน genotype และได้คัดเลือก 5 สายพันธุ์ที่มียีนความ หอม และมีพื้นฐานทางพันธุกรรมอื่นๆคล้ายหอมนางนวลน้อยที่สุดมาศึกษา metabolic profile และ พบสารประกอบหลายตัว ซึ่งเป็นไปได้ว่าสารหอมเป็น side effect ของกระบวนการการเกิด putrescine degradation ซึ่งทำให้เกิด polyamine แล้วผ่านการ oxidise จนได้สารประกอบ 2AP ขึ้น

ข้าวพันธุ์ไถ่น้อยเหลืองมีสาร 2AP สูงกว่าข้าวหอมพันธุ์อื่นๆของลาว เมื่อนำสายพันธุ์คล้าย (near isogenic line, NIL) จากประชากรไถ่น้อยเหลืองมาศึกษาตำแหน่งยีนควบคุมความหอม โดย วิธี Illumina BeadXpress ด้วย SNP จำนวน 384 SNP พบว่า QTL หลักที่ควบคุมสารหอมมีตำแหน่ง อยู่ที่โครโมโซม 8 และอยู่เหนือตำแหน่งยีน *BADH2* ซึ่งเป็นยีนที่เคยถูกรายงานไว้แล้วว่าควบคุม ความหอม และเมื่อศึกษาลำดับเบสของยีน *BADH2* ในพันธุ์ไถ่น้อยเหลืองพบว่าเกิดการขาดหายไป ของเบสจำนวน 806 คู่เบสในบริเวณ exon 4 ถึง exon 5 การเกิดการขาดหายไปของเบสเหล่านี้ มีผล ให้ stop codon ที่ควบคุมการแปรผลการสร้างโปรตีน *BADH2* ทำงานไม่เต็มที่ จากนั้นได้มีการ ออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะต่ออัลลีลนี้ และนำมาทดลองใช้กับประชากรชั่วรุ่น F_2 เพื่อ ตรวจสอบความสัมพันธ์กับการสร้างสาร 2AP ในใบข้าว ที่มีการเกิด deletion ของเบสบนยีนนี้ นอกจากนี้เครื่องหมายดังกล่าวยังถูกนำมาใช้คัดเลือกประชากรไถ่น้อยเหลืองชั่วรุ่น F_5 เพื่อจำแนก สายพันธุ์ที่เป็นอัลลีลชนิด ไถ่น้อยเหลือง 100 สายพันธุ์และที่มี อัลลีลชนิดหอมนางนวลอีก 100 สายพันธุ์ เมื่อตรวจวัดสาร 2AP ในทั้ง 200 สายพันธุ์ พบว่ากลุ่มสายพันธุ์ที่มีอัลลีลชนิดไถ่น้อย เหลือง มีระดับของสาร 2AP สูงกว่ากลุ่มสายพันธุ์ที่มีอัลลีลชนิดหอมนางนวล ถึง 50 เปอร์เซ็นต์

ผลการศึกษานี้ทำให้มีการค้นพบอัลลีลใหม่ของยีน *BADH2* ที่ควบคุมความหอม ได้ ประชากรข้าวที่พัฒนาให้มีความหอม สามารถนำไปคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวเหนียวหอมพันธุ์ใหม่ ผล การศึกษายังได้พิสูจน์ว่าอัลลีลควบคุมความหอมที่ได้จากข้าวชนิดจาปอนิกา สามารถถ่ายทอดไปสู่ ข้าวชนิดอินดิกาได้ จึงสามารถนำมาใช้ปรับปรุงความหอมได้ในข้าวทั้งสองชนิด นอกจากนี้ยังได้ พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถใช้ติดตามและคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวหอมในประชากรได้

Chanthakhone Boualaphanh. 2011. **Metabolomics of fragrance and yield components of traditional and improved Lao rices**. Doctor of Philosophy Thesis in Agronomy, Graduate School, Khon Kaen University.

Thesis Advisors: Assist. Prof. Dr. Darunee Jothityangkoon,
Dr. Jirawat Sanitchon, Dr. Melissa Fitzgerald

ABSTRACT

E42114

Glutinous rice is the staple food crop for Lao people, and the favoured of these are aromatic types, in particular, Hom Nang Nouane (HNN) and Kai Noy Leuang (KNL). KNL and HNN are traditional varieties, and both are low yielding. The rice improvement programs of Lao need to combine quality traits of these traditional varieties with higher yielding improved glutinous varieties such as Thasano 1 (TSN 1) and Thadokham 1 (TDK 1). Development of such varieties could lead to export opportunities and have significant economic and social impact, especially for Lao rice farmers. The study aims to determine the best improved variety to be the agronomically adapted background for mapping populations, develop mapping populations to find the compounds in the pathway of aroma, determine the compounds in the grains of each that distinguish the varieties and that contribute to unique metabolomic profiles and taste/flavour profiles, attempt to identify the biochemical pathway leading to 2 acetyl-1-pyrroline (2AP) and identify the genetic basis of aroma in KNL. First, a nitrogen (N) experiment was conducted using four varieties: HNN, KNL, TSN 1 and TDK 1 to compare the effect of management and environmental conditions on yield and grain quality: aroma (2AP), protein, gelatinisation temperature, texture and viscosity and to select the better variety as the recurrent parent for the populations required to meet the next objectives (Chapter III). The parents of the populations to be developed – TSN 1 as the recurrent and HNN and KNL as donors – were fully characterised for grain quality. Commonly used quality evaluation tools could not discriminate between the three varieties. However, metabolomic profiling of polar primary metabolites, volatiles and minerals were all able to discriminate between the three varieties, and provided unique metabolomic signatures for each, which consisted of compounds with taste, flavour or nutritional

E42114

properties (Chapter IV). Two populations were created, using TSN 1 as the recurrent parent for both. At each generation, only those detected to be aromatic were backcrossed again. The populations were progressed through four generations until BC₄F₂. The HNN population was created to find compounds in the pathway of aroma, and the KNL population was created to find the genetic basis of aroma in KNL. Two other populations were created: one derived from TSN 1 and KNL that was grown to F₂ for testing the genetic hypothesis (Chapter VII), and one between HNN and KNL, progressed to F₅ to test the phenotypic hypothesis that aroma from the KNL gene was higher than the common mutation that leads to aroma, and is found in HNN.

The HNN BC₄F₂ population was used to find the fragrance pathway. After Single Nucleotide Polymorphism (SNP) genotyping, five lines that carried the fragrance gene and the least background introgression were selected. Metabolite profiling was carried out, and various compounds were found and suggested that aroma is a side-effect of putrescine degradation, allowing the polyamine to continue to be oxidised by removing the negative feedback inhibition and acetylating the product of putrescine oxidation, forming 2AP, the fragrance compound.

KNL contains high amount of 2AP compared to other Lao varieties, and has high retention of 2-acetyl-1-pyrroline (2AP). Mapping experiments on KNL isogenic lines using Illumina BeadXpress 384-SNP assay lead to the discovery of a major QTL in chromosome 8 right on top of Betaine aldehyde dehydrogenase 2 (*BADH2*) gene – the same gene previously reported to be responsible for fragrance. Sequencing of the *BADH2* gene in KNL revealed an 806 bp deletion that spans exon 4 to exon 5. The deletion causes a premature stop codon rendering the *BADH2* protein nonfunctional. Allele specific markers were designed for the new allele and these were used on the F₂ population to associate presence of 2AP in leaves with the large deletion. The markers were then used on the F₅ population to select 100 lines with the KNL allele and 100 with the HNN allele. These were grown and 2AP content of the grain measured. Those with the KNL allele reproducibly contained 50% more 2AP than those with the HNN allele.

As a result of this work, a new and valuable allele of aroma has been found, and new populations have been made for Lao, which will lead to the release of new varieties. The new fragrance allele originates from japonica, but through this thesis,

E42114

it has been transferred to indica germplasm also. Therefore, the new allele is available in both major germplasm classes and markers to track it in a population have also been developed.

ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to express my deepest and sincere gratitude to all the persons who have made worthy contributions and who unselfishly helped me, without whose assistance, the completion of this work would not have been achieved.

The advisory committee: Assist. Prof. Dr. Darunee Jothityangkoon for her meaningful suggestions, supervision and whole hearted encouragement throughout the duration of the study. The co-chairman of the advisory committee, Dr. Jirawat Sanitchon for his suggestion and advice and specially, Dr. Melissa Fitzgerald, Head of Grain Quality and Nutrition Centre, IRRI for her kindness, valuable supervision and guidance, throughout the study, research and until thesis writing. I wish to acknowledge my special thanks to the Chairman and member of the thesis examining committee Assoc. Prof. Dr. Prasit Jaisil and Dr. Boonrat Jongdee. I also wish to thank to the following: Mariafe Calingacion, Venea Dara Daygon, Rosa Paula Cuevas, Lucena Samadio, Adoracion Resurreccion, Roslan Anacleto, Teodero Atienza and all people in the Grain Quality and Nutrition Centre for advice and helping during staying in IRRI. I also wish to thank to all people in Department of Plant Science and Agricultural Resources, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University and in the Agriculture International Office for helping and giving facility of DNA laboratory during my research, and I also wish to thank to Mr. Teerawat Suwannual and other friends in this faculty DNA laboratory for kindly helping. I fully appreciate, and would like to thank: Mr. Phoumi Inthapanya, Dr. Chay Bounphanousay, Mrs. Kongpan Kanyavong and all people in RCCRC for helping and giving field facility. I also wish to thank the following: Dr. Bounthong Bouahom, Dr. Monthathip Chanphengxai, Mr. Kouang Douangsila, Assoc. Prof. Dr. Yupa Hanboonsong and Mr. Sone Mosky for helping during this study. I also gratefully acknowledge the META-PHOR, EU Project and IRRI for financial support during my study. I also wish to thank Dr. Robert Hall, Head of META-PHOR, EU Project and all META-PHOR collaborators for helping. Very special thanks are also worth extending to my beloved husband, Mr. Khamla Somsanith, my daughter: Ms. Vanita Somsanith and all my brothers and sisters who patiently waited and prayed for my success.

Chanthakhone Bualaphanh

TABLE OF CONTENTS

	Page
ABSTRACT (IN THAI)	I
ABSTRACT (IN ENGLISH)	Iii
ACKNOWLEDGEMENTS	Vi
TABLE OF CONTENTS	Vii
LIST OF TABLES	Xii
LIST OF FIGURES	Xiv
LIST OF ABBREVIATION	Xviii
CHAPTER I GENERAL INTRODUCTION	1
1.1 Rationale	1
1.2 The specific objectives of this study	2
1.3 Scope of the study	3
1.4 Expected outputs	3
CHAPTER II GENERAL MATERIALS AND METHODS	4
2.1 Comparing the effect of nutritional conditions on yield and grain quality (aroma (2AP), protein, gelatinisation temperature, texture and viscosity), and determining the compound of in the grain of these parents by using metabolomic profiling	4
2.1.1 Plant growth	4
2.1.2 Data collection	5
2.1.3 Data analysis	5
2.2 Determining compound in the pathways of aroma using ILs derived from crosses with TSN1 until BC ₄ F ₄	5

TABLE OF CONTENTS (Cont.)

	Page
CHAPTER III	7
SELECTING THE PARENTS	7
3.1 Introduction	7
3.2 Materials and methods	9
3.2.1 Plant growth and grain processing	9
3.2.2 Protein	9
3.2.3 Gelatinisation temperature	10
3.2.4 Aroma	10
3.2.5 Texture	11
3.2.6 Viscosity	11
3.2.7 Statistical analysis	11
3.3 Results	12
3.3.1 Yield	12
3.3.2 Quality	16
3.4 Discussion	22
3.4.1 Yield	22
3.4.2 Quality	22
3.5 Conclusion	26
CHAPTER IV	27
CHARACTERISING PARENTS WITH NEW	27
SCIENTIFIC TOOLS	27
4.1 Introduction	27
4.2 Materials and methods	29
4.2.1 Plant materials	29
4.2.2 SNP genotyping	29
4.2.3 Metabolite profiling	30
4.2.4 Statistical correlations	33

TABLE OF CONTENTS (Cont.)

	Page
4.3 Results	34
4.3.1 Genetic differences between varieties	34
4.3.2 Discriminating between the quality of each variety	35
4.3.3 Discriminating between the grain metabolome of each variety	35
4.3.4 Relating the metabolome of the grain with the genome	43
4.4 Discussion	44
4.4.1 Nutritionally valuable compounds	46
4.4.2 Compounds of taste and flavor	47
CHAPTER V POPULATION DEVELOPMENT USING NEW GENERATION TOOLS	50
5.1 Introduction	50
5.2 Materials and methods	51
5.2.1 Plant materials	51
5.2.2 Measurement of 2-acetyl-1-pyrroline (2AP)	52
5.2.3 SNP genotyping to select pure NILs	52
5.2.4 Detecting volatile compounds in the selected introgression lines	53
5.3 Results	54
5.3.1 Population development	54
5.3.2 SNP profiling	55
5.3.3 Metabolite profiling	57
5.4 Discussion	59
5.5 Conclusion	62

TABLE OF CONTENTS (Cont.)

		Page
CHAPTER VI	FRAGRANCE PATHWAY HOM NANG NOUANE LINES	63
	6.1 Introduction	63
	6.2 Materials and methods	64
	6.2.1 Plant materials	64
	6.2.2 Genotyping	65
	6.2.3 Measurement of 2AP	66
	6.2.4 Metabolite profiling	66
	6.3 Results	66
	6.3.1 SNP profiling	66
	6.3.2 Metabolite profiling	67
	6.4 Discussion	72
	6.4.1 Developing high quality genetic stocks	72
	6.4.2 Possible pathways to 2AP	74
	6.5 Conclusion	77
CHAPTER VII	IDENTIFICATION OF A NOVEL ALLELE OF <i>Badh 2</i> IN LAO TRADITIONAL VARIETY KAI NOY LEUANG	78
	7.1 Introduction	78
	7.2 Materials and methods	79
	7.2.1 Development of introgression lines for mapping	79
	7.2.2 Quantification of 2-AP by GC-MS	79
	7.2.3 DNA extraction and genotyping	80
	7.2.4 Sequencing of <i>BADH2</i>	80

TABLE OF CONTENTS (Cont.)

	Page
7.3 Results	81
7.3.1 Characterisation of KNL	81
7.3.2 Gene mapping	81
7.3.3 Sequencing of <i>BADH2</i>	81
7.3.4 Development of functional markers	85
7.3.5 <i>Badh2.11</i> assay in segregating F ₂ Population	86
7.4 Discussion	87
CHAPTER VIII CONCLUSION AND RECOMMENDATIONS	90
8.1 Selecting the parents	90
8.2 Characterising parents	90
8.3 Population development using new generation tools	91
8.4 Fragrance pathway HNN lines	91
8.5 Identification of a novel allele of <i>Badh 2</i> in Lao traditional variety Kai Noy Leuang	91
REFERENCES	93
VITEA	107

LIST OF TABLES

Page

Table 3.1	Fertilizer and timing regime for the four N treatment	10
Table 3.2	Yield and yield components of the four varieties across four N treatments	14
Table 3.3	Effect of variety and nitrogen on gelatinisation temperature (GT), protein content, hardness and stickiness of freshly cooked rice grains	16
Table 4.1	Polar compounds discriminating HNN, KNL or TSN1 detected by rapid $^1\text{H-NMR}^{\text{a}}$, $^1\text{H-NMR}$ after elimination of starch residue ^b or derivatised GC-TOF-MS ^c of extracts of polished grains +/- indicate the tendencies between varieties based on Kruskal-Wallis test	40
Table 4.2	Volatile compounds that discriminated each variety, their odour thresholds and flavour. The odour/flavour of each compound and its threshold in water is also shown. Stars indicate compounds that are used commercially at 5 ppm or less to add flavour or fragrance to manufactured foods or perfumes. +/- indicate the tendencies between varieties based on variable importance of prediction (VIP calculated from PLS-DA data)	42
Table 4.3	Procrustes analysis of correspondence between Euclidean distances between varieties from each metabolite platform, based on principal components 1 and 2, and Euclidean genetic distance between each variety. Procrustes rotation is calculated as the residual sum of squares scaled so that the total sum of squares is 1	44

LIST OF TABLES (Cont.)

		Page
Table 5.1	Number of plants for each population obtained in each generation and number selected for backcrossing	54
Table 5.2	Sensory evaluation of aroma in each BC ₄ F ₂ line derived from KNL and TSN 1	55
Table 5.3	Percent similarity of each BC ₄ F ₂ line to the donor parent. Those derived from HNN and carry the HNN fragrance allele are in italics	57
Table 6.1	Percent similarity of lines to HNN with and without the FNP at the fragrance locus	71
Table 6.2	Volatile, primary polar and secondary metabolites that differ between the recurrent parent and the introgression lines. + indicates that a compound has increased in the ILs, - means the amount of a compound has decreased in the ILs, and ++ means that a compound is unique to the ILs	72
Table 7.1	Primers used in sequencing <i>BADH2</i> gene	86
Table 7.2	Number of individuals showing aromatic (+2AP) and nonaromatic (-2AP) phenotypes in the F ₂ population and the average amount of 2AP	86
Table 7.3	Allele specific primers designed to amplify the novel <i>BADH2</i> allele	86

LIST OF FIGURES

	Page
Figure 3.1	13
Yield of improved varieties responded much more to N fertilizer than traditional varieties, and improved varieties were significantly higher yielding at N treatments greater than 30 kg N ha ⁻¹ (LSD _{0.05} = 366 kg ha ⁻¹)	
Figure 3.2	19
Concentration of 2AP in the grains of the two aromatic traditional varieties at each N treatment. Differences between varieties and between N treatments are not significant (LSD _{0.05} = 0.144)	
Figure 3.3	20
RVA traces of each variety, TDK 1 (A), TSN 1 (B), HNN (C), KNL (D) at each of the four N treatments. Each curve is the average of 3 biological replicates. For KNL, the two lower curves are the lowest N treatments and the two higher curves are the higher N treatments	
Figure 3.4	21
Correlation matrix of RVA parameters, hardness, and stickiness for the four waxy varieties	
Figure 4.1	34
Genetic variability between TSN 1, KNL and HNN rice varieties at 1536 SNP loci across all 12 chromosomes. At these loci, the genetic similarity between TSN 1 and KNL is 53.2% and between TSN 1 and HNN is 80.7% and between KNL and HNN is 53.6%.	

LIST OF FIGURES (Cont.)

	Page
Figure 4.2	39
<p>PCA score plots showing discrimination between three rice varieties cultivated under four different N regimes on the basis of (A) routine grain quality traits, (B) mineral micronutrients determined by ICP-MS, (C) polar metabolite profiling with ¹H-NMR rapid fingerprints or (D) ¹H-NMR fingerprints after elimination of starch residue, (E) polar metabolites determined by GC-TOF-MS, (F) volatiles determined by SPME GC-MS. Genotypes: HNN, squares; KNL, circles; TSN 1, triangles. N regime: 0 kg N ha⁻¹, unfilled; 30 kg N ha⁻¹, light grey; 60 kg N ha⁻¹, dark grey; 90 kg N ha⁻¹, black</p>	
Figure 5.1	56
<p>SNP maps of the BC₄F₂ lines from the HNN population (A) and the KNL population (B). Of the 384 loci assayed, HNN differed from TSN at 137 where as KNL differed from TSN 1 at 220 loci. Yellow represents TSN 1, blue represents introgression from the donor parent, and red shows heterozygotic loci</p>	
Figure 5.2	58
<p>Heat map showing groupings by polar primary compounds detected in BC₄F₂ leaves of the 34 selected lines derived from KNL and TSN 1</p>	
Figure 5.3	59
<p>PCA of volatile compounds in parents and selected BC₄F₂ lines showing that all lines cluster near TSN 1. KNL blue, HNN red, TSN 1 yellow. HNN progenies are orange and KNL progenies are green</p>	

LIST OF FIGURES (Cont.)

		Page
Figure 6.1	Comparison between the genotype of TSN 1 and HNN at each chromosome at 1536 loci. HNN is shown at the top of each chromosome, and polymorphic regions between TSN and HNN are light grey. Chromosomes 1 – 6 are in the first block and 7 – 12 in the second. The parents differ at 35% of loci	68
Figure 6.2	SNP map at 384 loci of the 91 BC ₄ F ₂ lines derived from HNN and TSN 1. TSN 1 is yellow and the first line, HNN is dark blue and the last line. Each line in the figure shows the genotype of one BC ₄ F ₂ line. Introgression from HNN can be seen as blue regions and heterozygotic regions are red	69
Figure 6.3	A: SNP map of the parents and selected BC ₄ F ₂ lines carrying the Fragrance gene but with most of the TSN 1 genome. Regions of HNN Introgression are mostly heterozygotic (red). B: SNP map of the same lines at BC ₄ F ₄ showing HNN introgression only at a region on chromosome 8 (blue). C: the presence of the <i>badh2</i> allele in the five introgression lines and <i>BADH2</i> in the recurrent parent, TSN 1	70
Figure 6.4	PCA of volatile compounds (A) and polar metabolites (B)	71
Figure 7.1	A: 2AP content of KNL vs other Laos traditional fragrant variety, HNN. 7.1 B: 2AP content of KNL and HNN upon storage. Decrease over time is not significant KNL, but is for HNN LSD 5%.	82
Figure 7.2	KNL introgression in chromosome 8 of fragrant lines. Yellow segments are from TSN 1, blue is from KNL, red are heterozygotes and gray means no data	83

LIST OF FIGURES (Cont.)

	Page	
Figure 7.3	PCR product of <i>BADH2</i> exons 3 to 5 in KNL, TSN 1 and KTL showing huge difference in the size of the bands	83
Figure 7.4A	Sequence alignments of (A) exons 4 to 5 of KNL and KTL showing the new <i>BADH2</i> allele with TSN 1 as the reference sequence	84
Figure 7.4B	Translated peptide sequence showing the premature stop codon that renders <i>BADH2</i> in KNL nonfunctional	84
Figure 7.5	Diagram of the relative positions of the designed primers for the novel fragrance allele	85
Figure 7.6	PCR banding patterns of the allele-specific markers in segregating F ₂ population. F - fragrant; NF - non-fragrant; and H - heterozygous for the mutation	85
Figure 7.7	Box and whiskers plot of 2AP values in grains of progeny carrying the <i>badh2.1</i> and <i>2.11</i> allele	87

LIST OF ABBREVIATIONS

AACC	American Association of Cereal Chemists
AADH	Amino aldehyde dehydrogenase
ANOVA	Analysis of variance
ASPF	Allele specific primer function
2AP	2-acetyl-1-pyrroline
BADH2	Betain aldehyd dehydrogenase
bp	Base pair
CPA	Principle component analysis
DNA	Deoxyribonucleic acid
DSC	Differential Scanning Calorimetry
FNP	Functional nucleotide polymorphism
QTL	Quantitative traits locus
GABA	Gamma aminobutiric acid
GC	Gas chromatography
GC-MS	Gas chromatography-mass spectrometry
GC-TOF-MS	Gas chromatography time of flight analysis mass spectrometer
GGT	Graphical geno typing
GRC	Genetic Resources Centre
H	Heterozygous
¹ H-NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance
ICP-OES	The inductively coupled plasma-optical emission spectrometer
IPC-MS	Inductivity coupled plasma mass spectrometry
IL	Introgression line
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
IRRI	International Rice Research Institute
K	Potassium
KNL	Kai Noy Leuang

LIST OF ABBREVIATIONS (Cont.)

KTP	Khau Tan Luang
Lao PDR	Lao People's Democratic Republic
LSD	Least significant difference
META-PHOR	Metabolomics for Plants, Health and OutReach
MP	Max Planck
MPIMP	Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology
N	Nitrogen
NAFRI	National Agricultural and Forestry Research Institute
NF	Non fragrant
NIL	Near isogenic line
NIST	National Institute of standards and technology
NIT	Near Infrared Transmission
P	Phosphorus
PLS-DA	Partial least squares-discriminant analysis
PRI	Plant Research International
RCCRC	Rice and Cash Crop Research Centre
RVA	Rapid visco-analyzer
SNP	Single nucleotide polymorphism
SPME	Solid phase micro extraction
TDK 1	Thadokkham 1
TSN 1	Thasano 1