

THE DEVELOPMENT OF PCR-BASED DNA
MARKERS FOR THE DETECTION OF
GLYPHOSATE-SUSCEPTIBLE AND -
RESISTANT BIOTYPES OF
GOOSEGRASS
(*Eleusine indica* (L.) Gaertn.)

ANNE MARIE KABEN

MASTER OF SCIENCE
UNIVERSITI MALAYSIA TERENGGANU
MALAYSIA

2010

**THE DEVELOPMENT OF PCR-BASED DNA
MARKERS FOR THE DETECTION OF
GLYPHOSATE-SUSCEPTIBLE AND –
RESISTANT BIOTYPES OF
GOOSEGRASS
(*Eleusine indica* (L.) Gaertn.)**

ANNE MARIE KABEN

**Thesis Submitted in Fulfillment of the Requirement for
the Degree of Master of Science in the
Faculty of Science and Technology
Universiti Malaysia Terengganu**

July 2010

Abstract of thesis presented to the Senate of Universiti Malaysia Terengganu in fulfillment of the requirement for the degree of Master of Science.

**THE DEVELOPMENT OF PCR-BASED DNA MARKERS FOR THE
DETECTION OF GLYPHOSATE-SUSCEPTIBLE AND –RESISTANT
BIOTYPES OF GOOSEGRASS (*Eleusine indica* (L.) Gaertn.)**

ANNE MARIE KABEN

JULY 2010

Chairperson: Dr Cha Thye San

Member: Dr. Chuah Tse Seng

Faculty: Science and Technology

Herbicide resistance in weeds has been a serious problem worldwide especially to the agricultural industries, where herbicide is no longer effective for weed control. Resistance to herbicide-glyphosate is widespread and conferred by the involvement of more than one resistance mechanism. The markers linked to glyphosate resistance in goosegrass are very useful in quick detection of the susceptible (S) and resistant (R) biotypes. Hence, this study was conducted with the aim to develop PCR-based DNA markers that can be used to detect glyphosate-susceptible and –resistant biotypes of goosegrass. Five resistant populations (R2, R4, R6, R8 and R11) and one susceptible population (SB) of goosegrass collected from Perak were used in the study. Whole-plant bioassay revealed that the R biotypes have resistance level ranged from ten to 42-fold, while leaf-disc bioassay showed that the R biotypes were three to eight-fold resistant as compared to the S biotypes. The polymorphisms patterns generated by RAPD in the initial screening using three plants from each population enable the identification of 14 specific bands, which were grouped into seven marker categories. The seven groups were: (a) susceptible (S); (b) ten- to 41-fold resistance level (10-41xR); (c) susceptible and ten-fold resistance (S-10xR); (d) 16- to 41-time resistance level (16-41xR); (e) specific ten-time resistance (10xR); (f) specific 28-times resistance (28xR) and (g) specific 41-times resistance (41xR). Verification of these markers by using genomic DNA extracted from ten new and randomly selected individual plants from each population showed consistent results. All the putative bands were cloned, sequenced and

analyzed. However, homology search in the GeneBank database revealed that all clones did not show any significant homology to known gene except S19S1235, which shows high homology (61-70%) to retrotransposon from *Oryza sativa*. Three different SCAR primers combinations were developed based on RAPD markers of S4R727 and S26R₆976. The first SCAR primer combination of S4SNF/S4R1 (susceptible-specific marker) successfully amplified the 243bp fragment from all 10 individuals of susceptible biotypes, while no band was detected in all 50 individuals from all resistant populations. In the other hand, the second SCAR primer combination of S48NF2/S4R1 (resistant-specific marker) successfully detected the 232bp fragment from all 50 individuals of resistant populations and no amplification was detected in all ten susceptible individuals. These two SCAR combinations also showed consistency when they were used to screen 57 new field individual plants collected from Sarawak, Kedah, Perak and Johor. The screening results revealed that 42 of the field plants were resistant while 15 were susceptible to glyphosate as confirmed by whole-plant bioassay in greenhouse where the plants were treated with two times the recommended rate (2.44 kg a.i./ha).

Abstrak tesis yang dikemukakan kepada Senat Universiti Malaysia Terengganu sebagai memenuhi keperluan untuk ijazah Master Sains

**PENGHASILAN PENANDA-PENANDA DNA BERASASKAN PCR BAGI
MENGESAN BIOTIP RUMPUT SAMBARI (*Eleusine indica* (L.) Gaertn.)
YANG RENTAN DAN RINTANG TERHADAP GLIFOSAT**

ANNE MARIE KABEN

JULAI 2010

Pengerusi : Dr. Cha Thye San
Ahli : Dr. Chuah Tse Seng
Fakulti : Sains dan Teknologi

Kerintangan terhadap racun herba telah menjadi satu masalah yang serius di seluruh dunia, terutama sekali dalam industri pertanian yang mana penggunaan racun herba tidak lagi berkesan untuk mengawal rumpai. Kerintangan terhadap racun herba glifosat telah menular dan disebabkan oleh lebih daripada satu mekanisme kerintangan. Penanda molekul yang berhubungan dengan kerintangan rumput sambari terhadap glifosat adalah amat berguna untuk pengenalpastian biotip-biotip rumput sambari yang rentan dan rintang dengan pantas. Oleh yang demikian, kajian ini telah dilakukan untuk menghasilkan penanda-penanda DNA yang berasaskan tindakan polimerase berantai (PCR) yang berupaya untuk mengenalpasti biotip-biotip rumput sambari yang rentan dan rintang terhadap glifosat. Lima populasi rintang (R2, R4, R6, R8 dan R11), manakala satu populasi rentan (SB) dari Perak telah digunakan dalam kajian ini. Bioasai keseluruhan tumbuhan menunjukkan bahawa biotip rintang adalah sepuluh sehingga 41 kali lebih rintang berbanding biotip rentan, manakala bioasai cakera daun telah menunjukkan bahawa biotip rintang adalah tiga sehingga lapan kali lebih rintang berbanding biotip rentan. Corak-corak polimorfisme yang dihasilkan dalam saringan awal terhadap tiga tumbuhan dari setiap populasi dengan menggunakan pengamplifikasian polimorfisma DNA secara rawak (RAPD) telah membolehkan pengesanan sebanyak 16 jalur spesifik yang mana telah dikategorikan kepada tujuh kumpulan penanda, iaitu: (a) rentan (S); (b) sepuluh sehingga 41 kali rintang (10-41xR); (c) rentan dan sepuluh-kali rintang (S-10xR); (d) 16 sehingga 41 kali rintang (16-41xR);

(e) spesifik sepuluh-kali rintang (10xR); (f) spesifik 28-kali rintang (28xR); (g) spesifik 41-kali rintang (41xR). Pengujian penanda-penanda ini ke atas sepuluh lagi individu baru dari setiap populasi yang dipilih secara rawak telah menunjukkan hasil yang konsisten. Kesemua jalur spesifik tersebut telah diklon, diujuk dan dianalisis. Walau bagaimanapun, pencarian kesamaan jujukan klon-klon tersebut di Bank gen tidak menunjukkan sebarang homologi yang signifikan dengan gen-gen yang didaftarkan kecuali S19S1235 yang menunjukkan tahap homologi yang tinggi (61-70%) kepada retrotransposon dari *Oryza sativa*. Tiga kombinasi pencetus SCAR telah dihasilkan berasaskan penanda-penanda RAPD iaitu S4R272 dan S26R₆976. Kombinasi pencetus SCAR yang pertama, S4SNF/S4R1 (penanda rentan-spesifik) telah berjaya mengamplifikasikan 243bp jalur dari kesemua sepuluh individu daripada biotip rentan, manakala tiada jalur telah dikesan dalam semua 50 individu daripada semua populasi rintang. Di samping itu juga, kombinasi pencetus SCAR yang kedua, iaitu S4R8NF2/S4R1 (penanda spesifik-rintang) telah berjaya mengesan 232bp jalur untuk semua 50 individu yang rintang dan tiada amplifikasi telah dikesan untuk semua sepuluh individu yang rentan. Kedua-dua kombinasi pencetus SCAR ini telah menunjukkan hasil yang konsisten apabila digunakan untuk menyaring 57 individu tumbuhan yang diprolehi dari lapangan di Sarawak, Kedah, Perak dan Johor. Hasil ujian penyaringan menunjukkan sebanyak 42 individu adalah rintang dan 15 individu lagi adalah rentan terhadap glifosat seperti mana yang telah disahkan melalui bioasai keseluruhan pokok dengan semburan racun pada dua kali kadar yang disyorkan (2.44kg a.i/ha).