

**KONSTRUKSI PADI NONAROMATIK YANG BERAROMA WANGI  
MENGUNAKAN PCR BERBANTUAN MARKA GEN *BADH2***  
(Construction of Fragrant-Nonaromatic Rice Using *BADH2* Marker-Assisted  
PCR)

**Djarot Sasongko Hami Seno<sup>1)</sup>, Santoso TJ<sup>2)</sup>, TriJatmiko KR<sup>2)</sup>,  
Padmadi B<sup>3)</sup>, Praptiwi D<sup>3)</sup>**

<sup>1)</sup> Dep. Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam IPB

<sup>2)</sup> Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Sumberdaya Lahan Pertanian

<sup>3)</sup> Dep. Biokimia, Fakultas Matematika dan IPA IPB

**ABSTRAK**

Tingginya permintaan pasar dan nilai komersial padi aromatik telah mendorong penelitian terkait aroma padi. Berbagai marka aromatik telah dilaporkan (Bradbury *et al.* 2005b, Lang and Buu 2008, Shi *et al.* 2008, Sakthivel *et al.* 2009). Namun selain aroma, sifat agronomi lain (produktivitas; waktu tanam; ketahanan hama dan penyakit; selektivitas area kultivasi, kemudahan tanam dan pemeliharaan; dsb.) padi aromatik tidak sebaik padi nonaromatik. Hal ini menjadi kendala bagi petani untuk menanam padi aromatik. Oleh karena itu pada penelitian ini dilakukan pengembangan varietas Ciherang aromatik/wangi dengan sifat agronomi sebaik host Ciherang ditambah sifat aroma dari donor Mentik Wangi. Konstruksi dilakukan melalui *site-directed crossing* berbantuan PCR dengan marker gen *badh2*, untuk menghindari produk transgenik. Seleksi dilakukan menggunakan PCR dengan primer spesifik gen *badh2* (Bradbury *et al.* 2005). Pada tahun pertama (2009), DNA padi varietas nonaromatik (Ciherang) dan aromatik (Mentik Wangi, Gilirang, Pandan Wangi) diisolasi dari daun menggunakan metoda Shure *et al.* (1983), selanjutnya diamplifikasi dengan PCR menggunakan marka dan kondisi sesuai dengan yang dilaporkan oleh Bradbury *et al.* (2005). Padi aromatik yang dapat dibedakan dari padi nonaromatik kemudian disilangkan dengan padi nonaromatik Ciherang. Biji F1 kemudian ditanam, disolasi DNA nya, kemudian dianalisis dengan PCR menggunakan primer dan kondisi yang serupa. F1 yang heterozygot kemudian *dibackcross* dengan Ciherang, dan BC1F1 ditanam dan dianalisis PCR sebagaimana F1. Hasil analisis PCR mendapatkan bahwa hanya varietas aromatik Mentik Wangi yang dapat dibedakan dari varietas nonaromatik Ciherang, sedangkan Gilirang dan Pandan Wangi tidak. Selanjutnya Mentik Wangi digunakan sebagai donor aromatik. Analisis progeneri F1 persilangan Ciherang-Mentik Wangi, mendapatkan heterozygot F1 yang memberikan pita amplifikasi dari Ciherang dan Mentik Wangi, sebagaimana dilaporkan oleh Bradbury *et al.* (2005b). Hasil serupa juga didapatkan pada analisis progeneri BC1F1 Ciherang-Mentik Wangi. Pada tahun kedua (2010) dan ketiga (2011) akan diteruskan *backcross* hingga 4 x untuk mendapatkan BC5F1 dan *diselfing* untuk mendapatkan BC5F2 homozygot (Ciherang beraroma Mentik Wangi).

Kata kunci : Ciherang, mentik wangi, aroma, tidak beraroma, *badh2*, *backcross*.

**ABSTRACT**

The high commercial value and market demand of fragrant rice have triggered a number of researches related to fragrant in rice. Various fragrant specific markers have been reported (Bradbury *et al.* 2005b, Lang and Buu 2008, Shi *et al.* 2008, Sakthivel *et al.* 2009). However, except for fragrant property, other agronomic traits (productivity; geographical location and period of cultivation; stress, insects, and diseases tolerance;

simplicity of cultivation and maintenance, etc.) of non-fragrant rice are disadvantages compare to those of fragrant rice. These have become barriers for farmer to grow fragrant rice. Therefore, Ciherang rice possessing native agronomic traits and additional fragrant property, was developed in this research. To avoid transgenic plany product, construction was carried out through site-directed crossing and using *badh2* specific marker-assisted PCR for progeny selection (Bradbury *et al.* 2005b). In the first year (2009), DNA of non-fragrant Ciherang and fragrant (Mentik Wangi, Gilirang, Pandan Wangi) rice were isolated from leaves and PCR amplified following the method as described by Shure *et al.* (1983) and Bradbury *et al.* (2005b), respectively. Fragrant rice with distinct PCR profile than that of non-fragrant Ciherang rice was then crossed to Ciherang. F1 seeds were planted, their DNA were isolated, and PCR analyzed as previous. The selected heterozygous F1 were then *backcrossed* to Ciherang, and the obtained BC1F1 were planted and analyzed as described for F1. PCR results showed that only Mentik Wangi pofile was disticnt compare to that of Ciherang, and therefore was selected as fragrant donor. In F1 progeny (Ciherang-Mentik Wangi) selection, heterozygot F1 with band amplification of Ciherang and Mentik Wangi, as described by Bradbury *et al.* (2005b), were obtained. The same results were obtained in BC1F1 (Ciherang-Mentik Wangi) progeny selection. In the 2nd (2010) and the 3rd (2011) year of research, BC1F1 will be further backcrossed 4 x and selfed, to obtain homozygous BC5F2 (Ciherang possessing Mentik Wangi fragrant).

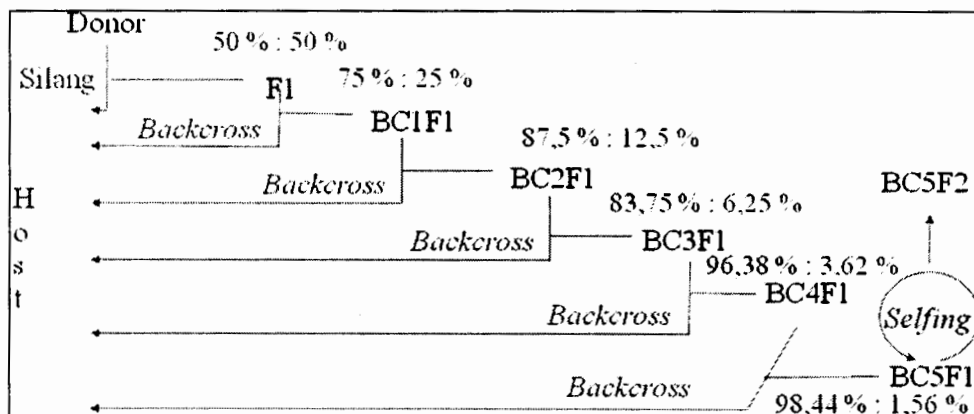
Keywords : Ciherang, mentik wangi, fragrant, non-fragrant, *badh2*, backcross.

## PENDAHULUAN

Hasil penelitian mendapatkan bahwa sifat aromatik disebabkan karena mutasi pada gen *badh2* (Bradbury *et al.* 2005a,b; Bourguis *et al.* 2008). Oleh karena itu aroma dapat diintroduksi pada padi nonaromatik melalui inaktivasi gen *badh2*nya. Inaktivasi dapat dilakukan dengan berbagai metoda rekayasa genetik seperti : ekspresi gen atau fragmen pada orientasi antisense; kloning bagian dari gen dalam konstruksi RNAi dan mengekspresikannya pada tanaman transgenik; mutagenesis melalui berbagai cara seperti TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes), insersi tDNA, atau metoda lain yang diikuti dengan skrining PCR atau metoda lain untuk mendapatkan varian aromatik; atau kloning gen aromatik yang termutasi pada varietas nonaromatik (Wachana *et al.* 2004, Vanavichit *et al.* 2008). Namun metoda-metoda tersebut menghasilkan produk varietas tanaman transgenik yang pemasarannya terhambat dengan regulasi GMO (Genetically Modified Organism). Oleh karena itu pada penelitian ini, aromatisasi padi nonaromatik dilakukan melalui penggantian alel gen *badh2* padi nonaromatik dengan alel gen terkait dari varietas aromatik, menggunakan teknik *backcross*

(*site-directed crossing*) untuk mendapatkan turunan homozygot resesif nontransgenik.

Metoda *site-directed crossing* (Gambar 1) merupakan alternatif yang dapat digunakan untuk mengintroduksi gen atau sifat tertentu secara spesifik tanpa harus melalui rekayasa genetik yang menghasilkan tanaman transgenik (Xu *et al.* 2004, Mackill *et al.* 2007). Pada metoda ini, introgresi donor dapat diminimalisasi (~1,6 %), sehingga dapat dipertahankan sifat-sifat yang baik pada padi *host*. Pembentukan populasi hingga BC5F1 akan menghasilkan turunan dengan sifat yang mendekati 98,4 % *host* (retensi *host* maksimal) (Mackill *et al.* 2007), sehingga hanya sifat yang diinginkan (misalnya aromatik, toleransi genangan, dsb.) yang terintroduksi ke *host*. *Selfing* (pembentukan BC5F2) hanya diperlukan untuk introduksi sifat yang progeni gennya bersifat resesif (misalnya sifat aromatik), sedangkan untuk yang dominan (misalnya toleransi genangan) cukup hingga BC5F1.



Gambar 1. Diagram dan prosentase progeni gen pada *site-direct crossing*

Analisis molekuler (misalnya PCR) sangat diperlukan untuk memastikan bahwa tanaman yang akan *backcross* telah mengandung gen yang ditargetkan (Mackill *et al.* 2007) serta membantu mempersingkat tahapan penelitian. Selain itu, pada introduksi aroma, yang sifatnya resesif (Bradbury *et al.* 2005), aroma timbul jika alel gen *badh2* dalam keadaan resesif homozygot, sementara progeni *backcross* heterozygot, sehingga tidak bisa diseleksi dengan uji aroma. Varietas

resesif homozygot aromatik diperoleh setelah dilakukan *selfing* untuk mendapatkan BC5F2. Tanpa bantuan analisis molekuler, harus dilakukan *selfing* pada tiap generasi *backcross*, sehingga jangka waktu penelitian menjadi dua kali lebih lama.

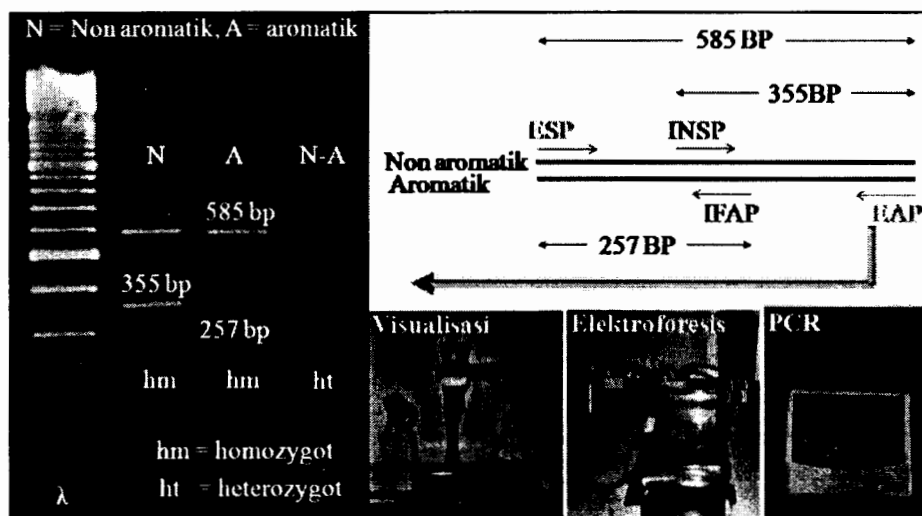
Metoda *site-directed crossing* (persilangan terarah) telah digunakan dengan nama *marker-assisted backcrossing* atau *PCR-assisted backcrossing* (Mackill *et al.* 2007, Lang and Buu 2008), namun umumnya tidak secara menyeluruh hingga turunan BC5F1 atau BC5F2, biasanya acak hingga BC3F1, BC2F2, dsb.

Berbagai metoda analisis aroma padi telah dikembangkan, diantaranya: metoda konvensional organoleptik rasa (Reinke *et al.* 1991, Petrove *et al.* 1996)/bau (Sood and Sidiq 1978, Paule and Powers 1989), bioesei enzim BADH2 (Srivong *et al.* 2008), atau deteksi 2-AP menggunakan GC (Lorieux *et al.* 1996, Widjaja *et al.* 1996)/isotop stabil (Yoshihashi 2002). Namun metoda-metoda tersebut laboratorius, sulit, kurang reliable, memakan waktu, memerlukan jumlah sampel yang banyak, dan sulit dilakukan jika jenis sampel banyak (Bradbury *et al.* 2005b). Selain itu metoda-metoda ini tidak dapat digunakan untuk penentuan aroma dalam progeni yang masih heterozygot (Bradbury *et al.* 2005a, Borquis *et al.* 2008). Marka molekular SNPs (single nucleotide polymorphisms) atau SSRs (simple sequence repeats) yang dapat digunakan dengan mudah, cepat, dan hanya memerlukan sampel yang sedikit juga telah dikembangkan (Cordeiro *et al.* 2002), namun hanya mendekteksi keberadaan gen aromatik (*badh2*), tapi tidak dapat membedakan status gen (utuh/terdelesi) yang bersangkutan. Penemuan adanya delesi 8 bp dan 3 SNPs gen *badh2* padi aromatik varietas Jasmin dan Basmati (Bradbury *et al.* 2005a, Borquis *et al.* 2008) dibandingkan padi nonaromatik menghasilkan pengembangan marka untuk PCR, metoda identifikasi aroma yang paling praktis dan paling sensitif karena adanya aspek amplifikasi (Bradbury *et al.* 2005b). Perbedaan sekuen *badh2* padi aromatik dan nonaromatik akan menghasilkan produk amplifikasi PCR yang berbeda sehingga dapat dibedakan sampel DNA padi aromatik, nonaromatik, atau heterozygot hasil persilangan maupun *backcross* (Bradbury *et al.* 2005b). Oleh karena itu akan dapat dilacak keberadaan alel dari donor pada individu progeni di setiap generasi *backcross* dan

memastikan bahwa progeni yang akan di *backcross* selanjutnya dengan host adalah heterozygot, sehingga tidak perlu dilakukan *selfing* tiap generasi *backcross* untuk memastikan individu progeni heterozygot.

Marka aromatik Bradbury (Gambar 2) terdiri atas 2 eksternal primer (External Sense Primer/ESP dan External Antisense Primer/EAP) dan 2 internal primer (Internal Non-Fragrant Sense Primer/INSP dan Internal Fragrant Antisense Primer/IFAP). ESP dan EAP akan menghasilkan fragment 585 bp; INSP dan EAP menghasilkan fragmen 355 bp; sedangkan ESP dan IFAP menghasilkan 257 bp (Bradbury *et al.* 2005b). Walaupun telah terbukti dapat berfungsi dengan baik pada berbagai varietas asing, tetapi belum pernah dicobakan pada varietas padi Indonesia. Dalam rangka inisiasi penelitian aroma padi di Indonesia dan sekaligus mendukung program ketahanan pangan nasional, pada penelitian ini dilakukan aplikasi marka aromatik tersebut pada aromatisasi padi nonaromatik Ciherang (tetua betina/*host*) dengan varietas donor (tetua jantan) aroma varietas Mentik Wangi/Gilirang/ Pandan Wangi).

Nama Primer	Sekuen Primer
External Sense Primer (ESP)	TTGTTTGGAGCTTGCTGAGT
Internal Fragrant Antisense Primer (IFAP)	CATAGGAGCAGCTGAAATATATACC
Internal Non-Fragrant Sense Primer (INSP)	CTGGTAAAAAGATTAGGCTTA
External Antisense Primer (EAP)	AGTGCTTTACAAAGTCCCGC



Gambar 2. Sekuen primer dan profil PCR marka aromatik Bradbury *et al.* (2005b)

## METODE PENELITIAN

Benih padi diperoleh dari BB Biogen DEPTAN (Bogor) dan BB Padi DEPTAN (Sukamandi). Primer *badh2* dari The Midland Certified Reagents Co. RNAase, bufer PCR, Fastart Taq DNA polimerase, dNTP dari Roche Diagnostics Indianapolis. Standar DNA sizer diperoleh dari Invitrogen. Agarose low EE0 dari Applichem Biochemical chemica synthesis service.

### Isolasi DNA

Isolasi DNA dilakukan dari daun muda tanaman sesuai dengan metoda Shure *et al.* (1983).

### PCR (*Bradbury et al. 2005b*)

Reaksi PCR dilakukan menggunakan mesin PTC-100 (MJ Research, inc.) pada 20  $\mu$ L volume yang mengandung 1x buffer PCR (10 mM Tris-HCl pH 8,3; 50 mM KCl; 1,5 mM KCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,01% Gelatin), 200  $\mu$ M masing-masing dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 50 ng masing-masing primer (ESP, EAP, INSP, IFAP), 50 ng DNA, dan 1 unit Taq DNA polimerase. Siklus suhu yang digunakan adalah 5 menit pada suhu 94°C untuk denaturasi permulaan, yang dilanjutkan dengan 35 siklus yang terdiri dari: 30 detik pada suhu 94°C untuk denaturasi, 30 detik pada suhu 55°C untuk penempelan primer, dan 1 menit pada suhu 72°C untuk perpanjangan primer. Perpanjangan primer terakhir selama 7 menit pada suhu 72°C.

### Elektroforesis (*Bradbury et al. 2005b*)

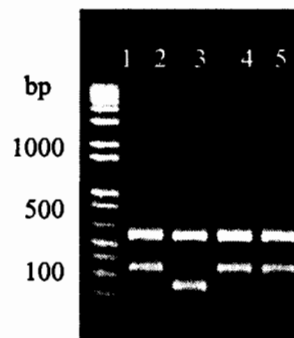
Produk PCR diseparasi pada elektroforesis gel agarose (1,0 %) dengan standar DNA sizer (Roche), kemudian divisualisasi dengan pengecatan etidium bromida (0.5  $\mu$ g/ml), kemudian dilanjutkan didokumentasi (ChemiDoc EQ Gel System, BIORAD).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Seleksi donor aromatik

Profil PCR (Gambar 3) menunjukkan adanya pita *badh2* (585 bp) pada semua sampel padi, mengindikasikan bahwa gen *badh2* varietas padi Indonesia

yang dianalisis sama dengan varietas asing (Bradbury *et al.* 2005a,b; Borquis *et al.* 2008). Hanya Mentik Wangi yang dapat dibedakan dari Ciherang dan profil PCR varietas ini juga sesuai dengan didapatkan oleh Bradbury *et al.* (2005b). Adanya amplifikasi positif pita aromatik (257 bp) pada profil PCR Mentik Wangi menunjukkan pola delesi pada ekson 7 gen *badh2* varietas ini sama dengan varietas aromatik asing yang telah dilaporkan (Wanchana *et al.* 2004; Vanavichit *et al.* 2004; Bradbury *et al.* 2005a,b; Borquis *et al.* 2008; Amarawathi *et al.* 2008; Shi *et al.* 2008). Sementara profil PCR Gilirang dan Pandan Wangi tidak memberikan hasil seperti yang diharapkan, tidak ada pita aromatik (257 bp), tetapi justru memberikan pita nonaromatik (355 bp), sehingga tidak dapat dibedakan dari varietas nonaromatik Ciherang. Hal ini menunjukkan marka Bradbury tidak cocok untuk kedua varietas tersebut, serta mengindikasikan pola delesi *badh2* Gilirang dengan Pandan Wangi berbeda dengan Mentik Wangi. Selain dua kelompok mutasi gen *badh2* yang berbeda, kelompok Mentik Wangi dan kelompok Pandan Wangi/Gilirang, ada kemungkinan ditemukan pola baru delesi gen *badh2* pada Pandan Wangi/Gilirang. Adanya pola delesi baru pada exon 2 gen *badh2* padi aromatik juga telah ditemukan oleh Sakthivel *et al.* (2009). Penelitian lebih lanjut sedang dilakukan, terutama terkait rekayasa marka aromatik yang spesifik untuk varietas padi Indonesia.

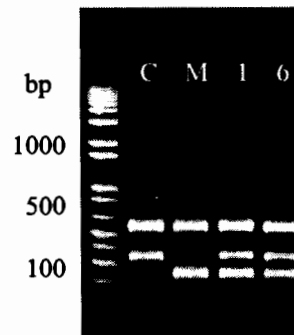


Gambar 3. Profil PCR padi nonaromatik dan aromatik 1=Marka, 2=Ciherang, 3=Mentik Wangi, 4=Gilirang, 5 = Pandan Wangi

### Profil PCR F1 Ciherang-Mentik Wangi

Varietas padi Ciherang disilangkan dengan Mentik Wangi, dan DNA benih F1 yang diperoleh diisolasi kemudian diamplifikasi PCR menggunakan primer

Bradbury *et al.* (2005b). Hasilnya (Gambar 4) didapatkan heterozygot F1 yang memberikan amplifikasi pita nonaromatik (355 bp) dari Ciherang dan pita aromatik (257 bp) dari Mentik Wangi, sebagaimana dilaporkan untuk Nipponbare dan Kyeema (Bradbury *et al.* 2005b) dan Basmati (Amarawathi *et al.* 2008). Sedangkan untuk padi aromatik Basmati dan nonaromatik Sambha Mashuri serta turunan persilangannya hingga F3 telah dilaporkan oleh Sakthivel *et al.* (2009) namun menggunakan primer aromatik yang berbeda (Badex7-5).



Gambar 4. Contoh profil PCR F1 Ciherang-Mentik Wangi, C=Ciherang, M = Mentik Wangi, 1 dan 6 = nomer F1

#### Profil PCR BC1F1 Ciherang-Mentik Wangi

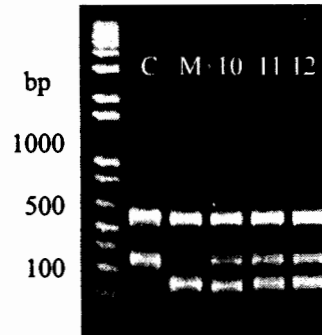
Benih F1 Ciherang-Mentik Wangi selanjutnya *dibackcross* dengan Ciherang, kemudian dilakukan analisis serupa dengan F1. Hasilnya (Gambar 5) juga mendapatkan progeni BC1F1 Ciherang-Mentik Wangi heterozygot. Seleksi aroma dengan RM 233 marker-assisted PCR juga telah dilaporkan untuk BC2F2 dari C53 atau C51 dengan Jasmin 85 (Lang and Bu 2008). Sementara Mackill *et al.* (2007) melaporkan keberhasilan *sub1 marker-assisted selection* pada introduksi toleransi genangan hingga BC3.

Pada umumnya penggunaan marker assisted selection/backcrossing yang telah dilaporkan ((Bradbury *et al.* 2005b, Mackill *et al.* 2007, Amarawathi *et al.* 2008, Lang and Bu 200, Sakthivel *et al.* 2009), masih acak dan belum komprehensif hingga BC5F1 atau BC5F2, seperti yang akan dilakukan pada penelitian ini.

Berdasarkan apa yang diperoleh dari penelitian ini menunjukkan bahwa primer Bradbury dapat digunakan untuk pengembangan varietas aromatik berbasis



Mentik Wangi, tapi tidak dapat untuk varietas aromatik Gilirang dan Pandan Wangi. Untuk varietas aromatik Indonesia yang lain perlu dilakukan penelitian lebih lanjut.



Gambar 5. Contoh profil PCR BC1F1 Ciherang-Mentik Wangi C = Ciherang, M = Mentik Wangi, 10-12 = BC1F1

### KESIMPULAN

- Gen *badh2* varietas padi Indonesia sama dengan varietas padi asing.
- Terdapat dua kelompok pola delesi varietas padi aromatik Indonesia, kelompok I (Mentik Wangi) dan kelompok 2 (Pandan Wangi dan Gilirang)
- Primer Bradbury dapat membedakan padi kelompok 1 dari Ciherang.
- Primer Bradbury tidak dapat membedakan padi kelompok II dari Ciherang.
- Primer Bradbury dapat membedakan heterozygot persilangan (F1) dan *backcross* (BC1F1) Ciherang-Mentik Wangi.
- Primer Bradbury dapat digunakan untuk pengembangan varietas aromatik berbasis Mentik Wangi.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis beserta tim peneliti mengucapkan terima kasih kepada, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Kompetitif Penelitian Sesuai Prioritas Nasional Batch II Tahun Anggaran 2009 Nomor: 343/SP2H/PP/DP2M/V!/2009 tanggal 16 Juni 2009, atas dana yang telah diberikan sehingga penelitian ini dapat berlangsung. Selain itu juga kepada LPPM IPB, FMIPA IPB, Departemen

Biokimia IPB, dan BB Biogen DEPTAN atas kerjasama, pengelolaan administrasi, dukungan serta fasilitas SDM dan laboratorium.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Amarawathi Y, Singh R, Singh AK, Singh VP, Mohapatra T, Sharma TR, Singh NK (2008) Mapping of quantitative trait loci for basmati quality traits in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Breed* 21:49–65. doi:10.1007/s11032-007-9108-8
- Bourgis, F, R. Guyot, H. Gherbi, E. Tailliez, I. Amabile, J. Salse, M. Lorieux, M. Delseny, and A. Ghesquière (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(3): 353–368.
- Bradbury LM, Fitzgerald TL, Henry RJ, Jin Q, Waters DLE (2005a) The gene for fragrance in rice. *Plant Biotech J* 3:363–370.
- Bradbury LMT, Henry RJ, Jin Q, Reinke RF, Waters DLE (2005b) A perfect marker for fragrance genotyping in rice. *Mol Breed* 16:279–283.
- Buttery RG, Ling LC, Juliano BO, Turnbaugh JG (1983) Cooked rice aroma and 2-acetyl-1-pyrroline in rice. *J Agric Food Chem* 31:823–826.
- Cordeiro GM, Christopher MJ, Henry RJ and Reinke RF (2002) Identification of microsatellite markers for fragrance in rice by analysis of the rice genome sequence. *Mol. Breed.* 9: 245–250.
- Lang NT dan Bu BC (2008) Development of pcr-based markers for aroma (*fgr*) gene in rice (*Oryza sativa* L.). *Omonrice* 16: 16-23
- Lorieux M, Petrov M, Huang N, Guiderdoni E, Ghesquière A (1996) Aroma in rice: genetic analysis of a quantitative trait. *Theor App Genet* 93:1145–1151.
- Mackill DJ, Septiningsih E, Pamploma AM, Sanches D, Iftekhar A, Masudussaman AS, Collard B, Neeraja C, Vergara G, Maghirang-Rodriguez, R, Heuer S, Ismail AM (2007) Marker assisted selection for submergence tolerance in rice. *Mol. Plant Breeding* 5: 207-208.
- Paule CM and Powers JJ (1989) Sensory and chemical examination of aromatic and non aromatic rices. *J Food Sci* 54:343–346.
- Petrov M, Danzart M, Giampaoli P, Faure J, Richard H (1996) Rice aroma analysis Discrimination between a scented and a non scented rice. *Sci Aliments* 16:347–360.
- Reinke RF, Welsh LA, Reece JE, Lewin LG and Blakeney AB (1991) Procedures for quality selection of aromatic rice varieties. *Int. Rice Res. Newslett.* 16: 10–11.

- Sakthivel K, Rani NS, Pandey MK, Sivaranjani AKP, Neeraja CN, Balachandran SM, Madhav MS, Viraktamath BC, Prasad SV, and Sundaram RM (2009) Development of a simple functional marker for fragrance in rice and its validation in Indian Basmati and non-Basmati fragrant rice varieties. *Mol. Breeding* DOI 10.1007/s11032-009-9283-x
- Shi W, Yang Y, Chen S, Xu M (2008) Discovery of a new fragrance allele and the development of functional markers for the breeding of fragrant rice varieties. *Mol. Breeding* 22: 185-192.
- Shure, M, S. Wessler, and N. Fedorof (1983) Molecular identification and isolation of the *Waxy* locus in maize. *Cell* 35: 225-233.
- Sood BC and Sidiq EA (1978) A rapid technique for scent determination in rice. *Indian J. Genetic Plant Breed.* 38: 268-271.
- Srivong P, Wangsomnuk P and Pongdontri P (2008) Characterization of a fragrant gene and enzymatic activity of betaine aldehyde dehydrogenase in aromatic and nonaromatic thai rice cultivars. *KKU Sci. J.* 36(4): 290-301.
- Tanchotikul U and Hsieh TCY (1991) An improved method for quantification of 2-acetyl-1-pyrroline, a "popcorn"-like aroma, in aromatic rice by high-resolution gas chromatography/mass spectrophotometry/selective ion monitoring. *J. Agric. Food Chem.* 39: 944-947.
- Vanavichit A, Tragoonrung S, Toojinda T, Wanchana S, and Kamolsukyonyong W (2008) Transgenic rice plants with reduced expression of Os2AP and elevated levels of 2-acetyl-1-pyrroline. USA patent 7,319,181
- Wanchana S, Kamolsukyonyong W, Ruengphayak S, Toojinda T, Tragoonrung S, Vanavichit A (2004) Enhancing 2-acetyl-1-pyrroline synthesis in rice leaves by RNAi-mediated suppression of Os2AP converts non-aromatic to aromatic rice (*Oryza sativa* L.) Proceedings of the 1<sup>st</sup> International Conference on Rice for the Future, p. 105.
- 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.
- Yoshihashi T, Huong NTT, and Inatomi H (2002) Precursors of 2-acetyl-1-pyrroline, a potent flavour compound of an aromatic rice variety. *J Agric Food Chem* 50:2001-2004.