

IDENTIFIKASI GEN AROMA PADA PROGENI-PROGENI *BACKCROSS* ANTARA VARIETAS CIHERANG DENGAN PANDAN WANGI

(IDENTIFICATION OF FRAGRANT GENE WITHIN *BACKCROSS* PROGENIES BETWEEN CIHERANG AND PANDAN WANGI VARIETIES)

Djarot Sasongko Hami seno^{1,*}, Akhmad Endang Zainal Hasan¹, Tri Joko Santoso²,
Bram Kusbiantoro³, Zainal Alim Mas'ud⁴

ABSTRACT

Marker-assisted PCR has been considered as the most potential method for fragrant selection. RM223 is the only suitable marker to identify mutated *badh2* gene of Pandan Wangi. This research applies RM223-assisted PCR in the introgression of fragrant gene (mutated *badh2*) of Pandan Wangi variety, to engineer non-transgenic fragrant variety with good agronomic traits as those of Ciherang. Gene introduction was carried out through site-directed crossing; Pandan Wangi was crossed and *backcrossed* to Ciherang until heterozygot BC5F1, followed by *selfing* to obtain homozygot BC5F2. RM223-assisted selection was conducted in each cross and *backcross* generation. RM223 was able to identify native, mutated and heterozygot *badh2* of Ciherang, Pandan Wangi, and their cross/ *backcross* progenies, respectively. Therefore, the introgression of mutated *badh2* within progenies were observed, as well as the statuses of *badh2* gene (native/mutated) and alleles (homozygot/heterozygot). Further *backcross* and *selfing* to obtain BC5F2 is in progress.

Keywords: *Backcross*, Bradbury, fragrant, Mentik Wangi, *badh2*, site-directed crossing.

ABSTRAK

PCR berbantuan marka spesifik merupakan metoda deteksi aroma padi yang pada saat ini dianggap paling potensial. RM223 merupakan satu-satunya marka yang dapat mengidentifikasi *badh2* termutasi varietas Pandan Wangi. Penelitian ini mengaplikasikan PCR berbantuan marka RM223 pada introgresi gen aroma (*badh2* termutasi) varietas Pandan Wangi, dalam rangka merekayasa varietas nontransgenik beraroma Pandan Wangi dengan karakter agronomi sebaik padi Ciherang. Introduksi dilakukan secara persilangan terarah (*site-directed crossing*), dimana Pandan Wangi disilang dan di*backcross* dengan Ciherang hingga diperoleh BC5F1 heterozygot yang kemudian di*selfing* untuk mendapatkan BC5F2 homozygot (Ciherang aromatik). Pada setiap generasi persilangan/ *backcross* dilakukan seleksi PCR berbantuan marka RM223. Didapatkan RM223 dapat mendeteksi *badh2* utuh pada Ciherang, termutasi pada Pandan Wangi serta heterozygot pada progeni persilangan hingga BC3F1. Oleh karena itu dapat teramati introgresi gen *badh2* termutasi pada progeni hasil persilangan/ *backcross*, dan status gen (native/termutasi) serta alel (homozygot/ heterozygot) *badh2*. *Backcross* dan *selfing* untuk mendapatkan BC5F2 sedang dalam proses.

Kata kunci: *Backcross*, Bradbury, Mentik Wangi, Ciherang, *badh2*, *site-directed crossing*.

PENDAHULUAN

Nilai komersial dan permintaan pasar (nasional maupun internasional) akan padi aromatik sangat tinggi dan cenderung meningkat terus, terutama

pada masyarakat dengan taraf ekonomi yang mapan (Qiu and Zhang, 2003, Shi *et al.*, 2008, Bradbury *et al.*, 2005a,b). Namun hanya sebagian kecil petani di Indonesia yang menanam padi aromatik karena kecuali aroma, karakter agronomi padi aromatik (ketahanan penyakit dan stres, selektivitas geografi kultivasi, kemudahan penanaman/pemeliharaan, waktu tanam, dan produktivitas) tidak sebaik padi nonaromatik. Introduksi aroma pada padi nonaromatik dengan tanpa merusak kelebihan-kelebihan karakter agronomi lain dari tetua pemulih (*host*), merupakan hal yang prospektif dalam rangka

¹Dep. Biokimia, Fakultas Matematika dan IPA, Institut Pertanian Bogor.

²Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian.

³Balai Besar Penelitian Tanaman Padi.

⁴LT. Institut Pertanian Bogor.

* Penulis korespondensi: hamisenodjarot@gmail.com

ketahanan pangan dan meningkatkan *economic benefit* kepada petani. Aroma varietas Pandan Wangi yang sangat populer di masyarakat merupakan donor aroma yang potensial. Pada introduksi aroma, baik secara rekayasa genetik, persilangan konvensional (*random crossing*), maupun persilangan terarah (*site-directed crossing*), diperlukan marka spesifik aromatik yang dapat mengidentifikasi varietas Pandan Wangi dan progeni persilangannya dari sampel varietas nonaromatik. Analisis awal mendapatkan bahwa marka-marka aromatik berbasis *badh2* (*badh2-based*) yang telah dipublikasikan oleh berbagai peneliti (Bradbury *et al.*, 2005b, Shi *et al.*, 2008, Sakthivel 2009), tidak dapat membedakan varietas aromatik kelompok 2, yang termasuk didalamnya varietas Pandan Wangi, dari varietas nonaromatik (Hami Seno *et al.*, 2009). Studi pendahuluan mendapatkan marka terkait *badh2* (*badh2-related*), RM223 dapat membedakan Pandan Wangi dari varietas nonaromatik. Oleh karena itu pada penelitian ini dianalisis kemampuan marka aromatik RM223 dalam mendeteksi keberadaan, intrograsi, dan status gen aroma (*badh2*) pada progeny-progeni *backcross* antara varietas donor aromatik Pandan Wangi dengan varietas *host* Ciherang.

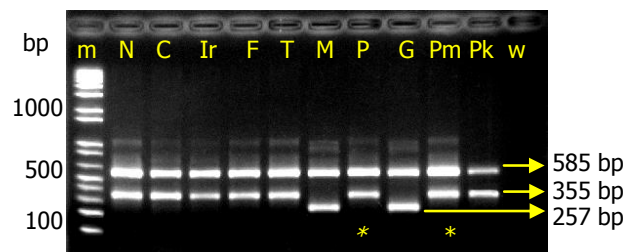
BAHAN DAN METODE

Benih tanaman padi yang digunakan diperoleh dari BB Biogen KemTan (Bogor), BB Padi KemTan (Sukamandi), dan LIPI (Cibinong). Persilangan dan *backcross* mengacu pada Soedyanto *et al.*, (1978). Isolasi DNA dari daun muda sampel tanaman sesuai metoda Doyle and Doyle (1990). Konsentrasi dan kemurnian DNA ditentukan secara spektrofotometri pada 260 nm dan 260/280 nm (Sambrook *et al.*, 1989). Campuran reaksi dan siklus suhu pada seleksi PCR sesuai Bradbury *et al.*, (2005b) untuk marka Bradbury dan Lang and Buu (2008) untuk marka RM223. Produk PCR diseparasi pada elektroforesis agarose (1-2%) dengan menyertakan standar DNA sizer, divisualisasi dengan ethidium bromida (10 mg/L) dan penyinaran UV, dilanjutkan dokumentasi dengan *Biorad Chemidoc gel* sistem (Sambrook *et al.*, 1989, Bradbury *et al.*, 2005b, Lang and Buu 2008).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi gen aroma menggunakan PCR dengan marka Bradbury

DNA sampel tanaman padi varietas nonaromatik dan aromatik populer Indonesia diamplifikasi PCR dengan marka Bradbury *et al.*, (2005b), yang dirancang untuk *badh2.7* serta menghasilkan amplicon 355 bp dan 585 bp untuk varietas nonaromatik, serta 257 bp dan 585 bp untuk varietas aromatik. Hasil elektroforesis produk PCR (Gambar 1) menunjukkan hanya Mentik Wangi dan Gunung Perak yang menghasilkan amplicon (257 bp dan 585 bp) berbeda dari varietas nonaromatik (355 bp dan 585 bp). Sedangkan varietas aromatik lain, termasuk diantaranya Pandan Wangi, menghasilkan amplicon yang sama dengan varietas nonaromatik (257 bp dan 585 bp). Hasil ini mendukung penelitian sebelumnya (Hami Seno *et al.*, 2009), serta memperkuat dugaan terdapatnya paling sedikit 2 kelompok tipe mutasi ekson7 gen *badh2* (*badh2.7*) pada varietas aromatik Indonesia. Kelompok 1 meliputi Mentik Wangi dan Gilirang, sedang kelompok 2 meliputi Pandan Wangi, Pulu Mandoti, dan Pare Kembang. Marka Bradbury dapat mengidentifikasi varietas aromatik kelompok 1, tetapi kelompok 2 tidak. Tidak terdeteksinya sampel aromatik dari kelompok 2 menunjukkan ketidakcocokan marka Bradbury dengan varietas-varietas tersebut, yang diduga karena pola mutasi yang berbeda atau tidak mengandung delesi 8 bp pada *badh2.7*. Tidak ditemukannya tipe mutasi tersebut (delesi 8 bp *badh2.7*) juga telah dilaporkan pada genotip aromatik yang lain (Kuo *et al.*, 2005; Navarro *et al.*, 2007). Demikian juga beberapa varietas aromatik dari Cina juga ditemukan tidak mengandung tipe mutasi ini, namun mengalami mutasi 7 bp pada *badh2.2* (Shi *et al.*, 2008). Sementara beberapa varietas aromatik dari India (Tarunbhog, Ganjeikalli, Bishnubhog, Bansphool A dan Adamchini) dilaporkan tidak mengandung bai delesi 8 bp *badh2.7* maupun delesi 7 bp *badh2.2* (Sakthivel *et al.*, 2009). Pandan Wangi, Kai Noi Leung (Laos) dan Paw Sam Hwe (Burma) juga telah telah dilaporkan tidak teridentifikasi dengan marka Bradbury (Fitzgerald *et al.*, 2008, Kovach *et al.*, 2009). Oleh karena itu, diduga pada varietas aromatik kelompok 1 mengalami delesi 8 bp pada *badh2.7*, sedang kelompok 2 tidak.



Gambar 1. Hasil analisis PCR varietas nonaromatik dan aromatik dengan marka Bradbury.

Keterangan:

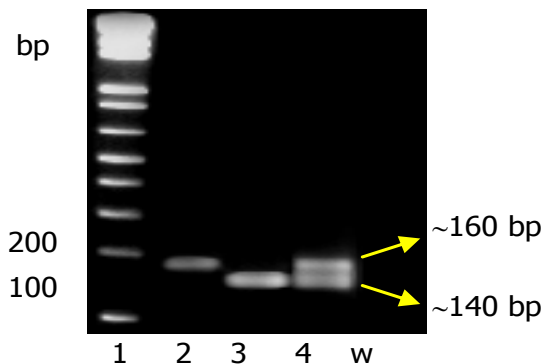
m= *size marker*. Sampel padi nonaromatik: N=Nipponbare, C=Ciherang, Ir= IR64, F=Fatmawati, T=Taipei 309. Sampel padi aromatik : M=Mentik Wangi, P=Pandan Wangi, G=Gunung Perak, Pm=Pulu Mandoti, Pk= Pare Kembang. w=air (kontrol negatif). *=Varietas aromatik (Mentik Wangi dan Gunung Perak) yang dapat teridentifikasi dengan marka Bradbury (memberikan pola amplikon yang berbeda dengan varietas nonaromatik).

Identifikasi gen aroma varietas Ciherang, Pandan Wangi, dan F1 persilangannya menggunakan PCR dengan marka RM233

DNA varietas Ciherang dan Pandan Wangi diamplifikasi dengan marka RM223. Hasil elektroforesis produk PCR (Gambar 2) menunjukkan RM 223 marker dapat mengidentifikasi perbedaan amplikon Ciherang (~160 bp) dan Pandan Wangi (~140 bp), serta sesuai dengan publikasi sebelumnya (Lang and Buu 2008). Selain itu, heterozygot F1 juga dapat terlihat dengan jelas. Percobaan dan contoh hasil pembentukan serta seleksi F1 telah dipublikasikan sebelumnya (Hami Seno *et al.*, 2010).

Identifikasi introgresi gen aroma pada BC1F1 Ciherang-Pandan Wangi

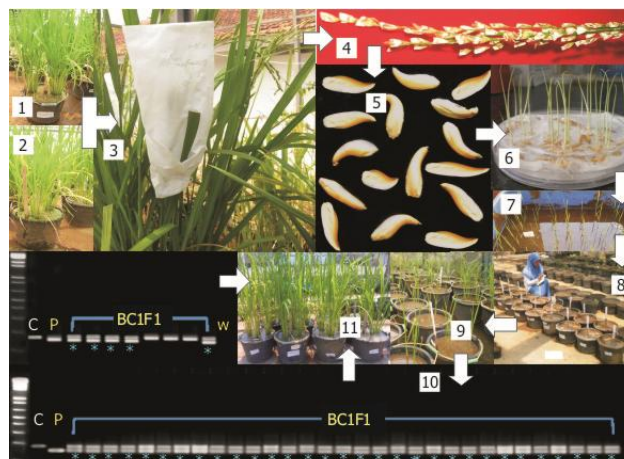
F1 Ciherang-Pandan Wangi (hasil percobaan sebelumnya) di *backcross* dengan Ciherang dan DNA BC1F1 dianalisis PCR dengan marka RM223. *Outline* percobaan dan contoh hasil disajikan pada Gambar 2. Hasil elektroforesis produk PCR (Gambar 4) menunjukkan sampel padi nonaromatik Ciherang, padi aromatik Pandan Wangi, maupun hasil *backcross* (BC1F1) keduanya dapat teridentifikasi dengan marka RM223, sesuai hasil publikasi sebelumnya (Hami Seno *et al.*, 2010) serta publikasi peneliti terdahulu menggunakan varietas lain (Lang and Buu 2008). Selain itu, keberhasilan introgresi *badh2* termutasi dari Pandan Wangi juga dapat teridentifikasi dengan marka RM223, terlihat dari pita heterozygot sampel BC1F1.



Gambar 2. Profil RM233-PCR varietas Ciherang dan Pandan Wangi..

Keterangan:

1= *size marker*, 2 = Ciherang, 3 = Pandan Wangi, 4=F1 Ciherang-Pandan Wangi, dan w = air (kontrol negatif)



Gambar 3. Outline dan contoh hasil percobaan pada pembentukan dan seleksi BC1F1 Ciherang-Pandan wangi.

Keterangan:

1-4 = contoh tanaman Ciherang, Pandan wangi, persilangan, dan malai. 5-9 = contoh biji/buah BC1F1, tanaman BC1F1 pada petri dis, bak, dan pot/ember pada awal penanaman, dan pada saat pengambilan sampel daun untuk isolasi DNA.10 = contoh gel agarosa hasil elektroforesis produk PCR; m = *size marker*, P = Pandan wangi, C = Ciherang, BC1F1 = BC1F1 Ciherang-Pandan wangi, dan w = air. Panah menunjukkan urutan langkah percobaan. * = menunjukkan F1 heterozygot, digunakan untuk menyeleksi tanaman F1 (11) yang akan di *backcross* selanjutnya dengan Ciherang untuk mendapatkan BC2F1Ciherang-Pandan Wangi. Ukuran amplikon seperti pada Gambar 2.

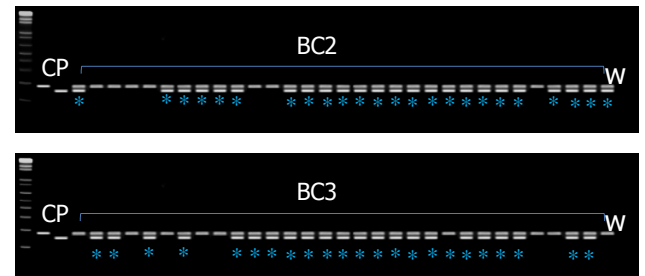
Identifikasi introgresi gen aroma pada BC2F1 dan BC3F1 Ciherang-Pandan Wangi

Tahapan percobaan dilakukan seperti pada Gambar 5, tetapi F1 diganti dengan BC1F1 atau BC2F1 pada pembentukan dan seleksi BC2F1 atau BC3F1. Hasil elektroforesis produk PCR (Gambar 6) menunjukkan sampel padi nonaromatik Ciherang, padi aromatik Pandan Wangi, maupun hasil *backcross* (BC2F1 dan BC3F1) dapat teridentifikasi dengan marka RM223. Heterozygot BC2F1 dan BC3F1 juga dapat teridentifikasi, seperti pada F1 (Hami Seno *et al.*, 2011), percobaan sebelumnya (BC1F1), dan publikasi Lang and Buu (2008).

Berdasarkan hasil-hasil percobaan yang telah diperoleh, perbedaan ampikon gen aroma pada sampel padi nonaromatik Ciherang, padi aromatik Pandan Wangi, maupun hasil persilangan (F1) atau *backcross* (BC1F1, BC2F1, dan BC3F1) dapat teridentifikasi dengan konsisten menggunakan PCR dengan marka RM223. Introgresi *badh2* termutasi dari donor ke *host*, status gen (termutasi/utuh) serta alel (homozygot/heterozygot) *badh2* varietas padi nonaromatik Ciherang, aromatik Pandan Wangi, dan hasil persilangan serta *backcross* kedua varietas tersebut juga dapat teridentifikasi. Oleh karena itu, marka RM223 cocok untuk digunakan sebagai marka seleksi pada pengembangan varietas padi aromatik baru berbasis Pandan Wangi. Selain itu, RM223 merupakan satu-satunya marka aromatik yang tersedia pada saat ini yang dapat mengidentifikasi Pandan Wangi dari varietas nonaromatik. Namun RM223 merupakan marka terkait *badh2* (*badh2-related*), sehingga tidak seakurat marka berbasis *badh2* (*badh2-based*).

Marka RM223 merupakan salah satu marka aromatik yang menggunakan sistem duplek (2 primer). Selain marka dengan sistem duplek, marka aromatik dengan sistem multiplek (4 primer) juga telah dipublikasikan (Bradbury *et al.*, 2005b), namun selain tidak sesuai/kompatibel dengan Pandan Wangi, sistem multiplek mempunyai kelemahan karena lebih kompleks, memerlukan lebih banyak primer, amplifikasi lebih lemah, inkonsistensi akibat kompetetisi pengikatan primer dengan DNA templat, dan amplifikasi nonspesifik akibat sedikit perbedaan konsentrasi primer (Sakithvel *et al.*, 2009). Sebaliknya, pada marka duplek, perbedaan ukuran ampikon nonaromatik dan aromatik pada (Lang and Buu 2008, Shi *et al.*, 2008, Shakitel *et al.*, 2009) relatif kecil karena hanya bergantung pada perbedaan basa akibat delesi (InDel) gen *badh2* (8 bp pada ekson 7 dan 7 bp pada ekson 2). Hal ini menyulitkan pengamatan sampel heterozygot dan

untuk menanggulangi masalah ini harus menggunakan gel poliakrilamida (Shi *et al.*, 2008), sehingga kurang praktis pada seleksi tanaman dalam jumlah banyak. Perbedaan ukuran ampikon dari RM223 merupakan yang paling besar dibandingkan marka aromatik duplek yang lain (Shi *et al.*, 2008, Shakitel *et al.*, 2009). Oleh karena itu relatif paling mudah/praktis digunakan, serta tidak perlu menggunakan gel poliakrilamida untuk mendapatkan visualisasi perbedaan ampikon yang jelas, terutama pada sampel heterozygot.



Gambar 4. Contoh hasil elektroforesis seleksi PCR BC2F1 dan BC3F1 Ciherang-Pandan Wangi. dengan marka RM223.

Keterangan :

C = Ciherang, P = Pandan Wangi, w = air, * = progeni BC2F1 atau BC3F1 heterozygot Ciherang-Pandan Wangi. Ukuran ampikon seperti pada Gambar 2.

KESIMPULAN

Keberadaan dan status gen *badh2* (utuh/termutasi) serta alel (homozygot/heterozygot) *badh2* pada sampel varietas padi nonaromatik Ciherang, aromatik Pandan Wangi, dan hasil persilangan/*backcross* kedua varietas tersebut (F1, BC1F1, BC2F1, BC3F1) dapat teridentifikasi menggunakan PCR dengan marka RM223. Introgresi gen aroma (*badh2* termutasi) dari donor (Pandan Wangi) ke *host* (Ciherang) dapat teridentifikasi menggunakan PCR dengan marka RM223. Keberhasilan introgresi atau pembentukan progeni persilangan (F1) dan *backcross* (BC1F1, BC2F1, dan BC3F1) terlihat dari munculnya pita heterozygot pada sampel progeni persilangan atau *backcross*. Marka RM223 cocok untuk digunakan sebagai marka seleksi pada pengembangan varietas aromatik baru berbasis Pandan Wangi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis beserta tim peneliti mengucapkan terima kasih kepada Sekretariat Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Kementerian Pertanian, atas dana yang telah diberikan sehingga penelitian ini dapat berlangsung. Selain itu juga kepada LPPM IPB, FMIPA IPB, Departemen Biokimia IPB, LT IPB, BB Biogen, dan LIPI atas kerjasama, pengelolaan administrasi, dukungan serta fasilitas SDM dan laboratorium. Juga kepada para pembantu peneliti/teknisi (Bambang Padmadi SSi, Dewi Praptiwi Ssi, Sugihartati SSi, Taufiq, Muhammad Taufan Fatahajudin, Helmy Ramadhan Al Anshary) atas kerja sama dan kerja keras yang dilakukan selama penelitian berlangsung.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahn SN, Bollisch CN, 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, 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 marka 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 markas for fragrance in nrice by analysis of the rice genome sequence. *Mol. Breed.* 9: 245–250.
- Doyle J J and Doyle J L (1990) A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus* 12:13-15.
- Fitzgerald M A, Hamilton N R S, Calingacion M N, Verhoeven H A, and Butardo, V M (2008) Is there a second fragrance gene in rice. *Plant Biotech. J.* 6:416-423.
- Hami Seno DS, Santoso TJ, Tri Jatmiko KR, Padmadi B, Praptiwi D (2009) Konstruksi padi nonaromatik yang beraroma wangi menggunakan PCR berbantuan marka gen *badh2*. *Prosiding Seminar Hasil-Hasil Penelitian IPB 2009*, 678-688. ISBN : 978-602-8853-03-3, 978-602-8853-08-8.
- Hami Seno DS, Santoso TJ, Mas'ud ZA (2010) Introgresi aroma padi mentik wangi berbatuan marka bradbury. *Prosiding Seminar Hasil-Hasil Penelitian IPB 2010, in press.*
- Kovach M J, Calingacion M N, Fitzgerald M A, and McCouch S R (2009) The orign and evolution of fragrance in rice (*Oryza sativa* L.). *PNAS* 106:14444-14449.
- IRRI (2004) Varietas unggul padi sawah yang dilepas sejak 1943-2004. <http://www.knowledgebank.irri.org/regionalSites/indonesia/docs/padiSawah.pdf>
- Kuo SM, Chou SY, Wang AZ, Tseng TH, Chueh FS, Yen HE, Wang CS (2005) The betaine aldehyde dehydrogenase (BAD2) gene is not responsible for aroma trait of AS0420 rice mutant derived by sodium azide mutagenesis. In: *Proceedings of the 5th international rice genetics symposium, IRRI, Philippines*, p 166
- Lang NT dan Bu BC (2008) Development of pcr-based markas 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, Iftekhhar A, Masudussaman AS, Collard B, Neeraja C, Vergara G, Maghirang-Rodriquez, R, Heuer S, Ismail AM (2007) Marker assisted selection for submergence tolerance in rice. *Mol. Plant Breeding* 5: 207-208.
- Navarro M, Butardo V, Bounphanousay C, Reano R, Hamilton RS, Verhoeven H, Fitzgerald M (2007) The good, the BAD and the fragrant-

- understanding fragrance in rice. In: Proceedings of international network on quality rices-clearing old hurdles with new science: improving rice grain quality", IRRI, Philippines, Apr 17–19, pp 16–17
- Paule CM, 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 marka 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
- Sambrook J, Fritsch E F, and Maniatis T (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* 2nd ed., Books:1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Shi W, Yang Y, Chen S, Xu M (2008) Discovery of a new fragrance allele and the development of functional markas for the breeding of fragrant rice varieties. *Mol. Breeding* 22: 185-192.
- Shure, M, S. Wessler, and N. Fedoroff (1983) Molecular identification and isolation of the *Waxy* locus in maize. *Cell* 35: 225-233.
- Soedyanto R, Sianipar R, Susani A, dan Harjanto (1978) *Bercocok Tanam* Jilid II. Jakarta: CV Yasaguna.
- 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.
- Sun SH, Gao FY, Lu XJ, Wu XJ, Wang XD, Ren GJ, Luo H (2008) Genetic analysis and gene fine mapping of aroma in rice (*Oryza sativa* L. Cyperales, Poaceae). *Genet Mol Biol* 31:532–538. doi:10.1590/S1415-47572008000300021
- 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 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. (355 bp dan 585 bp
- 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.