

TRANSFER GEN *BADH2* TERMUTASI VARIETAS AROMATIK MENTIK WANGI KE VARIETAS NONAROMATIK CIHERANG

(MENTIK WANGI-MUTATED *BADH2* GENE TRANSFER INTO NON-FRAGRANT RICE C.V. CIHERANG)

Djarot Sasongko Hami Seno^{1,*}, Bambang Padmadi¹, Dewi Praptiwi¹, Sugihartati¹, Taufiq¹, Muhammad Taufan Fatahjudin¹, Helmy Ramadhan Al Anshary¹, Tri Joko Santoso², Zainal Alim Mas'ud³

ABSTRACT

Replacement of non-fragrant-native *badh2* gene with mutated *badh2* of fragrant rice is an alternative to engineer new fragrant rice varieties with good agronomic traits as those of non-fragrant. Fragrant gene (mutated *badh2*) of Mentik wangi donor was introgressed into non-fragrant Ciherang host through site-directed crossing. Mentik Wangi was crossed with Ciherang, and the progeny was further backcross until BC3F1. Bradbury marka-assisted PCR was used to select progeny in every cross and backcross generation. Ciherang, Mentik Wangi, and their cross/backcross showed different PCR profiles. The statuses of *badh2* gene (native/mutated), as well as alleles (homozygote/heterozygote) between samples were identified. Mutated *badh2*-introgression was also observed within the selected heterozygote cross or backcross progenies (F1, BC1, BC2, and BC3), indicated successful transfer of mutated *badh2* gene from donor to host.

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

ABSTRAK

Penggantian *badh2* utuh (*native*) padi nonaromatik dengan gen serupa yang termutasi dari varietas aromatik merupakan alternatif dalam pengembangan varietas aromatik baru nontransgenik dengan karakter agronomi sebaik padi nonaromatik. Pada penelitian ini dilakukan introgresi gen aroma (*badh2* termutasi) dari Mentik Wangi (donor) ke varietas nonaromatik Ciherang (*host*) secara persilangan terarah (*site-directed crossing*). Mentik Wangi disilangkan dengan Ciherang, selanjutnya di *backcross* dengan Ciherang sampai BC3F1. Pada setiap generasi persilangan/*backcross* dilakukan seleksi PCR berbantuan marka gen *badh2*. Hasil yang diperoleh menunjukkan perbedaan amplikon sampel Ciherang, Mentik Wangi dan persilangan/*backcross* kedua varietas. Selain dapat dibedakan status gen (utuh/termutasi) dan alel (homozygot/heterozygot) *badh2*, juga teramati introgresi gen *badh2* termutasi pada progeni hasil persilangan/*backcross* (F1, BC1, BC2, dan BC3) yang terseleksi, menunjukkan keberhasilan transfer gen *badh2* termutasi dari varietas donor ke *host*.

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

PENDAHULUAN

2-acetyl-1-pyrroline (2-AP) merupakan senyawa utama aroma berbagai varietas padi aromatik (Buttery *et al.*, 1983; Paule and Powers 1989; Petrov *et al.*, 1996). Prolin merupakan prekursor dan sumber nitrogen 2-AP (Lorieux *et al.*,

1996, Yoshihashi *et al.*, 2002) dan asam glutamat melalui kerja enzim betain aldehid dehidrogenase (BADH2). Padi aromatik mengalami mutasi pada gen *badh2*, yang menyebabkan timbulnya stop kodon prematur dan hilangnya aktivitas enzim BADH2 (Bourgis *et al.*, 2008). Akibatnya ketersediaan prolin untuk sintesis 2AP meningkat dan akumulasi 2-AP menimbulkan aroma padi (Ahn *et al.*, 1992, Bradbury *et al.*, 2005a, b). Mutasi (delesi 8 bp) pada varietas aromatik KDM105 (Indica), Basmati (Grup V), dan Azucena (Tropical Japonica) ditemukan pada ekson 7 gen *badh2* (*badh2.7*). (Bradbury *et al.*, 2005a, Bourgis *et al.*, 2008). Sementara pada beberapa varietas di Cina ditemukan delesi 7 bp pada ekson 2

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

²Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB. Biogen).

³Dep. Kimia, Fakultas Matematika dan IPA, Institut Pertanian Bogor.

* Penulis korespondensi: hamisenodjarot@gmail.com

(*badh2.2*) (Shi *et al.*, 2008). Mutasi pada ekson lain (*badh2.9*) juga telah diusulkan (Fitzgerald *et al.*, 2008, Kovach *et al.*, 2009), namun belum ada bukti yang komprehensif.

Aroma dapat diintroduksi pada padi nonaromatik melalui inaktivasi gen *badh2*, yang dapat dilakukan melalui berbagai metoda rekayasa genetic (Wachana *et al.*, 2004, Vanavichit *et al.*, 2008). Namun metoda tersebut menghasilkan produk varietas tanaman transgenik yang pemasarannya terhambat oleh regulasi GMO (Genetically Modified Organisms) yang ketat. Sementara persilangan konvensional/acak (*random crossing*) akan menghasilkan varietas yang karakter agronominya sulit diarahkan. Alternatif lain adalah seperti pendekatan penelitian ini, menggunakan teknik *backcross* (*Site-directed crossing*) (Hami Seno *et al.*, 2009). *Host* varietas nonaromatik disilang dengan varietas donor aroma, F1 yang terseleksi kemudian di *backcross* 4 x dengan Ciherang hingga BC5F1, yang kemudian diseling untuk mendapatkan turunan homozygot resesif BC5F2. Pada pendekatan ini dapat diperoleh varietas nontransgenik dan introgresi donor pada progeni persilangan dapat diminimalisasi dengan bantuan analisis molekuler, misalnya PCR berbantuan marka spesifik aromatik. Pembentukan populasi hingga BC5 akan menghasilkan turunan dengan sifat yang mendekati hampir (~98%) *host*. Hanya karakter donor (misalnya aroma) yang diinginkan yang terintroduksi pada *host*, sehingga dapat dipertahankan karakter yang baik pada padi *host*/retensi *host* maksimal (Mackill *et al.*, 2007). *Selfing* (pembentukan BC5F2) diperlukan untuk introduksi karakter yang bersifat resesif (misalnya aroma), sedangkan untuk karakter dominan, misalnya toleransi genangan, cukup hingga BC5F1. Metoda *site-directed crossing* telah digunakan dengan nama *marka-assisted backcrossing* atau *PCR-assisted backcrossing* (Mackill *et al.*, 2007, Lang and Buu 2008), namun umumnya tidak sampai BC5.

Perbedaan sekuen *badh2* padi aromatik dan nonaromatik akan menghasilkan ampikon PCR yang berbeda sehingga dapat dibedakan padi aromatik, non aromatik, maupun heterozygot hasil persilangannya (Bradbury *et al.*, 2005b, Lang and Buu 2008, Shi *et al.*, 2008, Sakhivel *et al.*, 2009). Keberadaan alel dari donor dapat dilacak pada individu progeni di setiap generasi *backcross*, sehingga memastikan progeni yang akan di *backcross* selanjutnya dengan *host* adalah heterozygot (mengandung *badh2* utuh dari *host* dan *badh2* termutasi dari donor), tanpa perlu dilakukan *selfing* tiap generasi *backcross*. Introgresi gen *badh2* termutasi pada penelitian ini dipandu dengan PCR

berbantuan marka Bradbury *et al.*, (2005b), dalam rangka rekayasa nontransgenik Ciherang aromatik (BC5F2) yang merupakan benih nontransgenik aromatik dengan karakter agronomi sebaik varietas 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). DNA diisolasi 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 mengacu pada Bradbury *et al.*, (2005b). Hasil PCR disepariasi dengan elektroforesis agarose (1-2%) dengan menyertakan *size marker*, divisualisasi dengan ethidium bromida (10 mg/L) dan penyinaran UV, dilanjutkan dengan dokumentasi menggunakan *Biorad Chemidoc gel system* (Sambrook *et al.*, 1989, Bradbury *et al.*, 2005b).

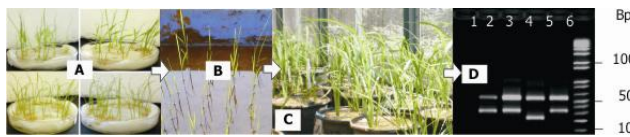
HASIL DAN PEMBAHASAN

Validasi marka aromatik dan seleksi donor aroma

DNA sampel padi (Ciherang, Mentik Wangi, Gilirang, Pandan Wangi) diamplifikasi PCR dengan marka aromatik Bradbury, hasilnya (Gambar 1) menunjukkan pola ampikon Mentik Wangi (257 bp) berbeda dengan Ciherang (355 bp), sedangkan Pandan Wangi dan Gilirang sama dengan Ciherang. Oleh karena itu Mentik Wangi cocok dengan marka Bradbury dan digunakan sebagai donor aroma pada penelitian ini. Tidak berbedanya pola Pandan Wangi atau Gilirang dengan Ciherang menunjukkan ketidakcocokan marka untuk kedua varietas tersebut, kemungkinan pola delesi kedua varietas tersebut tidak mengikuti pola umum padi aromatik (Bradbury *et al.*, 2005a, Bourgis *et al.*, 2008). Hasil ini juga menunjukkan kemungkinan adanya paling sedikit 2 kelompok pola mutasi pada varietas aromatik Indonesia

Marka Bradbury didesain untuk delesi 8 bp pada ekson 7 (Bradbury *et al.*, 2005b). Umumnya varietas aromatik mengalami delesi 8 bp pada *badh2.7* dan dapat dibedakan dari varietas nonaromatik dengan marka Bradbury, seperti Mentik Wangi pada penelitian ini dan publikasi terdahulu (Bradbury *et al.*, 2005b). Inkompatibilitas marka Bradbury terhadap

Pandan Wangi dan varietas aromatik unggulan dari Laos dan Burma telah dilaporkan sebelumnya (Fitzgerald *et al.*, 2008, Kovach *et al.*, 2009). Demikian juga pada beberapa varietas dari India (Amarawathi *et al.*, 2008, Sakthivel *et al.*, 2009). Sementara Shi *et al.*, (2008) mendapatkan beberapa varietas di Cina tidak mengandung delesi 8 bp pada ekson 7, tetapi mengalami delesi 7 bp pada ekson 2. Tidak adanya delesi 8 bp *badh2.7* juga telah dilaporkan pada genotip aromatik yang lain (Kuo *et al.*, 2005; Navarro *et al.*, 2007). Hasil-hasil ini menimbulkan dugaan bahwa walaupun delesi 8 bp pada *badh2.7* mengontrol aroma pada kebanyakan varietas aromatik, namun tidak universal dan kemungkinan adanya gen lain yang mengontrol aroma pada beberapa varietas padi aromatik (Kuo *et al.*, 2005; Navarro *et al.*, 2007, Fitzgerald *et al.*, 2008, Kovach *et al.*, 2009, Sakthivel *et al.*, 2009), namun hal ini masih memerlukan penelitian lebih lanjut.



Gambar 1. Validasi marka dan seleksi donor aroma.

Keterangan:

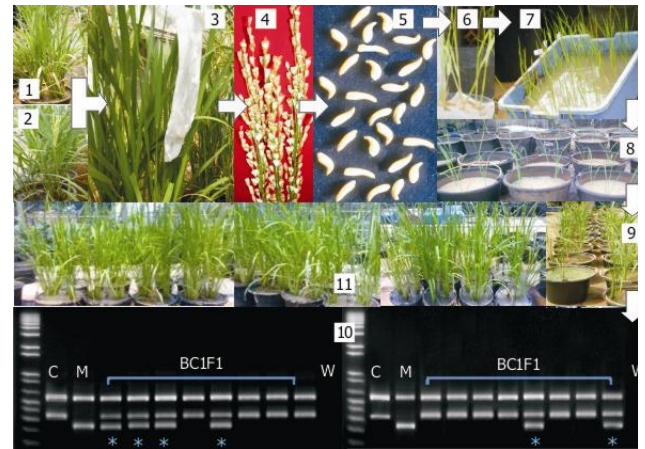
A-C sampel tanaman pada petri, bak, dan awal penanaman di ember. D = contoh hasil elektroforesis produk amplifikasi PCR: 1 = air (kontrol negatif), 2 = Pandan Wangi, 3 = Gilirang, 4 = Mentik Wangi, 5 = Ciherang, 6 = *size marker*. Panah menunjukkan urutan tahap percobaan.

Introduksi *badh2* termutasi pada pembentukan dan seleksi BC1F1

Outline tahapan percobaan dan contoh hasil pembentukan serta seleksi F1 telah dipublikasikan sebelumnya (Hami Seno *et al.*, 2010). Selanjutnya pada pembentukan BC1F1, *host* (Ciherang) dan F1 Ciherang-Mentik Wangi (diperoleh dari percobaan sebelumnya) di *backcross* dan diseleksi PCR untuk mendapatkan heterozygot BC1F1, sesuai *outline* pada Gambar 2.

Seleksi PCR mendapatkan sampel padi nonaromatik *host* yang mengandung gen *badh2* utuh, padi donor aromatik yang mengandung gen *badh2* termutasi, maupun hasil persilangan/*backcross* keduanya (BC1F1), seperti yang dipublikasikan (Bradbury *et al.*, 2005b). Keberhasilan pembentukan BC1F1 terlihat dari adanya pita heterozygot sampel BC1F1, yang merupakan pita *badh2* utuh dari Ciherang

dan *badh2* termutasi hasil introgresi dari Mentik wangi ke Ciherang.



Gambar 2. *Outline* dan contoh hasil percobaan pada pembentukan dan seleksi BC1F1 Ciherang-Mentik Wangi.

Keterangan :

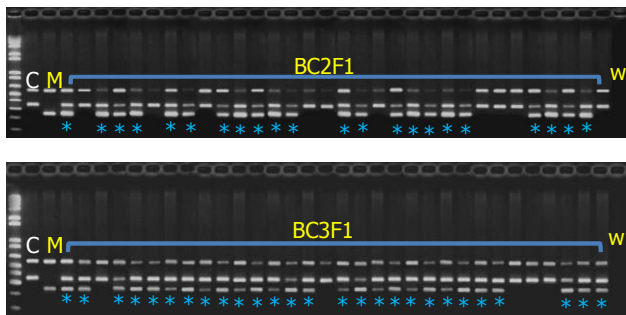
1-4 = contoh tanaman Ciherang, F1 Ciherang-Mentik Wangi, *backcross*, dan malai. 5-9 = contoh biji/buah BC1F1, tanaman BC1F1 pada petri dis, bak, dan pot/ember pada awal penanaman, dan pada saat pengambilan sampel daun untuk isolasi DNA. 10 = contoh gel agarosa hasil elektroforesis produk PCR; s = *size marker*, C = Ciherang M = Mentik Wangi, BC1F1= BC1F1 Ciherang-Mentik Wangi, dan w = air (kontrol negatif). Panah menunjukkan urutan langkah percobaan. * menunjukkan urutan langkah percobaan. * menunjukkan BC1F1 heterozygot, digunakan untuk menyeleksi tanaman BC1F1 (11) yang akan di *backcross* selanjutnya dengan Ciherang untuk mendapatkan BC2F1. Ukuran amplicon sebagaimana pada Gambar 1.

Hasil analisis PCR BC2F1 dan BC3F1 Ciherang-Mentik Wangi

Tahapan percobaan dilakukan seperti pada Gambar 2, hanya F1 diganti dengan BC1F1 (pada pembentukan BC2F1) atau BC2F1 (pada pembentukan BC3F1). Hasil elektroforesis produk PCR (Gambar 3) menunjukkan keberhasilan transfer gen *badh2* termutasi dengan adanya pita heterozygot sampel BC2F1, dan BC3F1, seperti hasil percobaan sebelumnya.

Berbeda dengan publikasi sebelumnya yang melaporkan marka Bradbury kurang konsisten pada diskriminasi alel aroma padi Basmati varietas Pusa (Amarawathi *et al.*, 2008, Sakthivel *et al.*, 2009), hasil yang diperoleh pada penelitian ini menunjukkan konsistensi marka tersebut mengidentifikasi introgresi gen aroma (*badh2* termutasi) dari tanaman padi donor Mentik wangi ke tanaman *host* Ciherang hingga tahap

penelitian yang telah dicapai (BC3). Selain itu juga dapat diidentifikasi status gen (termutasi/utuh) atau alel (homozygot/heterozygot) *badh2* pada nonaromatik Ciherang, aromatik Mentik Wangi, dan hasil persilangan (F1) (Hami senot *et al.*, 2010) serta *backcross* kedua varietas tersebut (BC1F1, BC2F1, dan BC3F1). Kemungkinan pola mutasi gen *badh2* pada varietas yang digunakan tersebut (Amarawathi *et al.*, 2008, Sakthivel *et al.*, 2009) tidak sesuai/kompatibel dengan Marka Bradbury, seperti kelompok 2 varietas aromatik Indonesia (Pandan Wangi, Gilirang) (Hami Seno *et al.*, 2009), serta sebagaimana dilaporkan oleh beberapa peneliti lain (Kuo *et al.*, 2005, Navarro *et al.*, 2007, Shi *et al.*, 2008, Fitzgerald *et al.*, 2008, Kovach *et al.*, 2009).



Gambar 3. Contoh hasil seleksi PCR BC2F1 dan BC3F1.

Keterangan:

C=Ciherang, M=Mentik Wangi, w=air (kontrol negatif), *=progeni heterozygot BC2F1 atau BC3F1. Ukuran ampikon seperti pada Gambar 1.

Sistem multiplek (4 primer) yang digunakan pada marka Bradbury dianggap mempunyai kelemahan karena lebih kompleks, amplifikasi lebih lemah, inkonsistensi akibat kompetetisi pengikatan primer dengan DNA templat, dan amplifikasi nonspesifik akibat perbedaan konsentrasi kecil primer (Sakithvel *et al.*, 2009). Hasil yang diperoleh pada penelitian ini juga menunjukkan tidak meratanya hasil amplifikasi masing-masing pita (257 bp, 355 bp, dan 585 bp), namun hal ini relatif tidak mengganggu.

Perbedaan ukuran pita aromatik (257 bp) dan nonaromatik (355 bp) yang dihasilkan oleh marka Bradbury relatif paling besar dan mudah terlihat atau dipisahkan dengan gel agarosa. Sementara marka-marka lain yang menggunakan sistem duplex perbedaan tersebut relatif kecil (Lang and Buu 2008, Shi *et al.*, 2008, Sakthivel *et al.*, 2009) dan kadang harus menggunakan gel poliakrilamida (Shi *et al.*, 2008), karena hanya bergantung pada InDel

(Insertion-Deletion) gen *badh2*. Selain marka berbasis *badh2.7*, Shi *et al.*, (2008) juga mengkonstruksi marka aromatik berbasis *badh2.2*. Namun marka Shi *et al.*, (2008), baik untuk ekson 7 maupun 2, memberikan perbedaan pita amplifikasi yang relatif kecil (8 bp pada ekson 7 dan 7 bp pada ekson 2) dan harus menggunakan gel poliakrilamida.

KESIMPULAN

Transfer gen aroma (*badh2* termutasi) berhasil dilakukan hingga BC3F1. Keberhasilan transfer gen aroma dapat teridentifikasi dengan PCR berbantuan marka Bradbury. Keberadaan serta status gen (utuh/termutasi) maupun alel (homozygot/heterozygot) *badh2* pada sampel nonaromatik Ciherang, aromatik Mentik Wangi, dan hasil *backcross* kedua varietas tersebut (BC1F1, BC2F1, BC3F1) dapat teridentifikasi menggunakan PCR dengan marka Bradbury.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis beserta tim peneliti mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan Nasional, atas dana yang telah diberikan sehingga penelitian ini dapat berlangsung. Selain itu juga kepada LPPM IPB, FMIPA IPB, Departemen Biokimia IPB, LT IPB, dan BB Biogen atas kerjasama, pengelolaan administrasi, dukungan serta fasilitas SDM dan laboratorium.

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 berbantuan 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 origin and evolution of fragrance in rice (*Oriza 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, Iftekhar 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. Fedorof (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.
- 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.
- 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.