

## الگوی تفرق ژن عطر در برنج و انتخاب مولکولی برای آن

غفار کیانی<sup>\*۱</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۷/۲۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۲/۲۵)

### چکیده

برنج غذای اصلی مردم ایران بوده و عطر و طعم یکی از صفات مهمی است که نقش اساسی در بازاریابی و قیمت برنج دارد. در این تحقیق، وراثت عطر و طعم برنج در نسل  $F_2$  حاصل از تلاقی رقم معطر سنگ طارم با هر یک از ارقام غیرمعطر ندا و نعمت مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه، علاوه بر ارزیابی فنوتیپی بر اساس آزمون قلیایی از نمونه‌های برگ، ارزیابی فنوتیپی نیز بر اساس نشانگر عطر انجام گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده، ارزیابی فنوتیپی در جمعیت‌های در حال تفکیک  $F_2$  نسبت تفرق ۳:۱ (غیرمعطر: معطر) را نشان داد. در ارزیابی مولکولی نیز نسبت تفرق ۱:۲:۱ (معطر: هتروزیگوت: غیرمعطر) با استفاده از نشانگر عطر مشاهده گردید. این نتایج نشان‌دهنده تک‌ژنی و مغلوب بودن ژن عطر در رقم سنگ طارم می‌باشد. هم‌چنین، از انتخاب به کمک نشانگر برای شناسایی بوته‌های معطر خالص در جمعیت‌های  $F_2$  استفاده گردید. بدین ترتیب که پس از انتخاب تک‌بوته‌های برتر از نظر فنوتیپی، در سطح مولکولی به غربالگری و انتخاب تک‌بوته‌های معطر خالص در جمعیت‌های مذکور اقدام شد و گیاهان هموزیگوت برای ژن عطر با ویژگی‌های خوب زراعی شناسایی شدند.

واژه‌های کلیدی: ژنتیک عطر و طعم، انتخاب به کمک نشانگر

۱. گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

\*: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ghkiani@gmail.com

## مقدمه

همکاران (۳) تأیید کردند که پروتئین BADH2 حاصل از ژن Badh2 از طریق ممانعت از بیوسنتز ۲. استیل-۱. پیرولین (2AP)، مهم‌ترین ترکیب معطر در ارقام معطر) باعث فقدان عطر در برنج می‌شود. از این رو، عطر در برنج با افزایش سطوح ۲. استیل-۱. پیرولین (2AP) همراه است (۱۹ و ۲۱).

روش‌های اصلاحی کلاسیک برای انتخاب بهترین تیپ گیاه، بستگی کامل به شرایط محیطی و سن گیاه دارد تا امکان تظاهر صفات مختلف میسر گردد. به‌نژادگرها بسیار علاقمند هستند که مجهز به فناوری جدیدی شوند که نه تنها دقت کار آنها را افزایش داده، بلکه مدت زمان در اصلاح نباتات را نیز کاهش دهد. امروزه نشانگرهای مولکولی چنین امکانی را فراهم آورده تا به‌نژادگرها بتوانند در مدت زمان بسیار کوتاه‌تری به اهداف اصلاحی خود دست یابند. در زمینه استفاده از نشانگرهای مولکولی برای اصلاح کیفیت برنج می‌توان به گزارش‌های جین و همکاران (۹) و یی و همکاران (۲۰) اشاره کرد که با استفاده از انتخاب به کمک نشانگر (MAS)، خصوصیات کیفی ارقام غیرمعطر برنج را اصلاح کردند. تحقیق حاضر با هدف بررسی توارث ژن عطر در رقم سنگ طارم و غربالگری تک‌بوته‌های معطر در جمعیت‌های درحال تفرق F<sub>2</sub> از طریق MAS اجرا شده است.

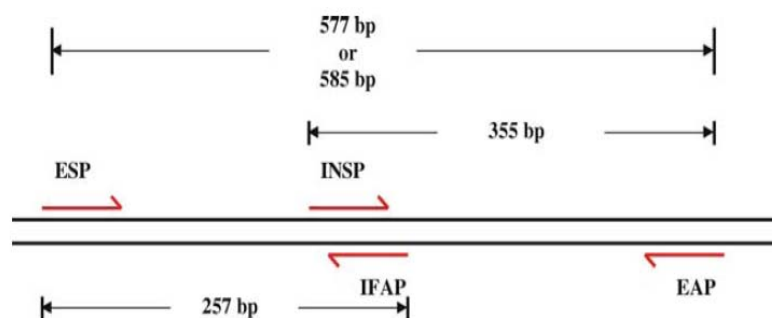
## مواد و روش‌ها

## مواد گیاهی

در این مطالعه، از رقم معطر سنگ طارم و ارقام برنج پرمحصول و غیر معطر ندا و نعمت استفاده گردید. در سال اول، ابتدا تلاقی بین سنگ طارم با هر یک از دو رقم غیر معطر مذکور صورت گرفت. سپس بذره‌های F<sub>1</sub> حاصل از این تلاقی‌ها برای به دست آوردن بذره‌های F<sub>2</sub> در سال بعد کشت شدند. در سال سوم، دو جمعیت F<sub>2</sub> (جمعیت اول مشتمل بر ۱۹۱ بوته و جمعیت دوم دارای ۱۸۹ بوته) در مزرعه پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری کشت گردیدند. عملیات زراعی متداول در منطقه از قبیل کوددهی، سمپاشی و وجین در طول رشد گیاهان انجام داده شد.

برنج مهم‌ترین محصول غذایی و تأمین‌کننده غذای تقریباً نیمی از جمعیت جهان به ویژه در آسیا، آفریقا و آمریکای لاتین است (۶). برنج معطر ارزش خاصی در صادرات داشته و از قیمتی بیشتر در تجارت جهانی نسبت به برنج غیرمعطر برخوردار می‌باشد (۱۶). اصلاح‌گران از روش‌های مختلفی برای ارزیابی و انتخاب ارقام معطر استفاده می‌کنند. این روش‌ها عبارت‌اند از جویدن بذر، روش شیمیایی و روش گاز کروماتوگرافی. عطر در بافت برگ برنج معطر نیز وجود دارد و برای تشخیص آن از محلول قلیائی هیدروکسید پتاسیم استفاده می‌شود (۱۷). اما ارزیابی عطر با روش‌های سنتی وقت‌گیر و دشوار بوده و به نتایج اطمینان کمتری نیز هست. روش دیگر برای ارزیابی عطر در برنج، استفاده از نشانگرهای مولکولی می‌باشد که مزایایی از قبیل ارزانی، سرعت و قابلیت اعتماد بسیار بالایی دارد (۲).

مطالعات ژنتیکی درباره توارث عطر در برنج نشان می‌دهد که یک ژن مغلوب روی کروموزوم ۸ (fgr) کنترل عطر و طعم در برنج را به عهده دارد (۵، ۸، ۱۰ و ۱۳). پینسون (۱۴) معتقد است که عطر و طعم برنج در رقم جاسمین ۸۵ و لاین PI467917 به‌وسیله یک ژن مغلوب کنترل می‌شود. در حالی‌که در سایر ارقام معطر نظیر دراگون آی. بال ۱۰۰ به‌وسیله دو ژن کنترل می‌شود. با این وجود، مطالعات دیگری نیز وجود دارد که سیستم دو ژنی را برای عطر در برنج گزارش نموده‌اند (۷، ۱۴ و ۱۸). برادبری و همکاران (۱ و ۲) گزارش کردند که ژن badh2 همان ژن عطر در برنج می‌باشد، زیرا این ژن در مقایسه با ژن Badh2 طبیعی که بتائین آلدئید دهیدروژناز ۲ (BADH2) را تولید می‌کند دارای حذف شدگی ۸ جفت بازی و سه SNP در اگزون ۷ دارد. آنان نشانگرهای مولکولی را برای تعیین ژنوتیپ عطر در برنج طراحی نمودند. شی و همکاران (۱۶) یک آلل جدید عطر (badh2-E2) در برنج را شناسایی کردند که توالی مشابه آلل Badh2 در اگزون ۷ داشت، اما یک حذف شدگی ۷ جفت بازی در اگزون ۲ داشت. آنان نیز نشانگرهای مولکولی را برای تعیین ژنوتیپ عطر در برنج طراحی نمودند. چن و



شکل ۱. موقعیت آغازگرهای مورد استفاده در ژنوتیپینگ عطر همراه با وزن باندهای مربوط به آنها (۲)

### ارزیابی فنوتیپی

برای ارزیابی فنوتیپی نحوه تفرق عطر، نمونه‌های برگ‌های از تک‌بوته‌های جمعیت‌های  $F_2$  مورد مطالعه جمع‌آوری و با روش هیدروکسید پتاسیم (KOH) به بررسی وجود عطر در نمونه‌های برگ‌های تک‌بوته‌ها اقدام گردید (۱۷). بدین منظور، ۲ گرم بافت برگ‌های از تک‌بوته‌ها در مرحله پنجه‌زنی برداشت و به قطعات کوچک‌تر تقسیم شده و به تیوب‌های آزمایشی انتقال داده شدند. مقدار ۱۰ میلی‌لیتر هیدروکسید پتاسیم ۱٪ به هر یک از تیوب‌ها اضافه گردید. تیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس با باز کردن درب تیوب‌ها از طریق بویایی، وجود و یا عدم وجود عطر مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۷). بر این اساس، بوته‌ها در دو گروه معطر یا غیرمعطر دسته‌بندی شدند. برای آزمون انطباق نسبت‌های ژنتیکی از آزمون مربع کای استفاده گردید.

### ارزیابی مولکولی

از نمونه‌های برگ‌های تک‌بوته‌های برنج، DNA به روش دلاپورتا و همکاران (۴) استخراج شد. ارزیابی مولکولی عطر با استفاده از آغازگرهای INSP، IFAP و EAP (شکل ۱) انجام شد (۲). مخلوط واکنش PCR شامل ۰/۲ میکرولیتر آنزیم *Taq* پلی‌مراز (۵ واحد)، یک میکرولیتر DNA الگو (۱۰ نانوگرم در میکرولیتر)، ۲/۵ میکرولیتر بافر  $10\times$ ، یک میکرولیتر  $MgCl_2$  (۵۰ میلی‌مولار)، یک میکرولیتر dNTPs (۵ میلی‌مولار) و ۲/۵ میکرولیتر از هر آغازگر (۲ میکرومولار)، در حجم کل ۲۵

میکرولیتر بود. شرایط دمایی به صورت واسرشته سازی اولیه ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ ثانیه، ۵۸ درجه سلسیوس به مدت ۵ ثانیه، ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه بود (۲). محصولات PCR پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم برماید با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵٪ جداسازی شدند. از مارکر وزنی ۱۰۰ جفت بازی برای برآورد اندازه قطعه PCR استفاده شد.

### نتایج و بحث

#### الگوی تفرق ژن عطر

نتایج حاصل از تلاقی سنگ طارم (معطر) × رقم ندا (غیرمعطر) و هم‌چنین سنگ طارم × نعمت فاقد عطر بودند. این امر نشان‌دهنده کنترل ژنتیکی عطر توسط ژن (های) مغلوب می‌باشد. نتایج بررسی الگوی تفرق صفت عطر در جمعیت‌های  $F_2$  مورد مطالعه یعنی سنگ طارم × ندا و سنگ طارم × نعمت به ترتیب روی ۱۹۱ و ۱۸۹ تک‌بوته از طریق روش بویایی نمونه‌های برگ‌های تک‌بوته‌ها با استفاده از محلول هیدروکسید پتاسیم در جدول ۱ آمده است. بر این اساس، تک‌بوته‌های جوامع مورد مطالعه در دو گروه غیرمعطر و معطر گروه‌بندی شدند. نسبت‌های تفرق مشاهده شده برای جمعیت‌های سنگ طارم × ندا و سنگ طارم × نعمت به ترتیب برابر با ۱۵۳:۳۸ و ۱۴۸:۴۱ به دست آمدند. این نتیجه با نسبت ژنتیکی ۱:۳ (غیرمعطر: معطر) در سطح احتمال  $P=0.01$  مطابقت دارد، زیرا

جدول ۱. الگوی تفرق عطر در جمعیت‌های F<sub>2</sub> براساس ارزیابی فنوتیپی

X <sup>2</sup>	تعداد		تعداد	جمعیت
	تعداد بوته‌های معطر	تعداد بوته‌های غیرمعطر	کل بوته	
۲/۶۵۵ <sup>ns</sup>	۳۸	۱۵۳	۱۹۱	سنگ طارم × ندا
۱/۱۰۳ <sup>ns</sup>	۴۱	۱۴۸	۱۸۹	سنگ طارم × نعمت

مقدار X<sup>2</sup> بحرانی برای نسبت تفرق ۳:۱ با یک درجه آزادی در سطوح ۵٪ و ۱٪ به ترتیب برابر ۳/۸۴ و ۶/۶۴ می‌باشد.

جدول ۲. الگوی تفرق عطر در جمعیت‌های F<sub>2</sub> براساس ارزیابی مولکولی

X <sup>2</sup>	تعداد بوته‌های	تعداد بوته‌های	تعداد بوته‌های معطر	تعداد	جمعیت
	غیرمعطر	هتروزیگوت	خالص	کل بوته	
۳/۲۳۰ <sup>ns</sup>	۳۷	۱۰۳	۵۱	۱۹۱	سنگ طارم × ندا
۲/۴۷۱ <sup>ns</sup>	۳۸	۱۰۲	۴۹	۱۸۹	سنگ طارم × نعمت

مقدار X<sup>2</sup> بحرانی برای نسبت تفرق ۱:۲ با دو درجه آزادی در سطوح ۵٪ و ۱٪ به ترتیب برابر ۵/۹۹ و ۹/۲۱ می‌باشد.

به کمک نشانگر (MAS) در جوامع در حال تفکیک F<sub>2</sub> مبادرت گردید. ابتدا تک‌بوته‌ها در هر دو جمعیت از نظر ویژگی‌های مهم زراعی نظیر زودرسی، ارتفاع، طول خوشه و تعداد پنجه مورد ارزیابی و انتخاب اولیه قرار گرفتند. سپس با استفاده از نشانگر عطر بوته‌های معطر خالص مورد شناسایی قرار گرفتند. این نشانگر به‌طور مؤثر بوته‌های معطر خالص را از بوته‌های غیرمعطر و هتروزیگوت متمایز نمود. به‌طوری‌که بوته‌های معطر هر دو باند مورد انتظار با وزن‌های مولکولی ۵۸۰ و ۲۵۷ جفت باز را تولید نمودند. باند اول حاصل از آغازگرهای EAP و ESP بوده و به‌عنوان کنترل داخلی عمل می‌کند. یعنی وجود این باند حاکی از کارکرد صحیح PCR است. دومین باند مربوط به عطر می‌باشد که حاصل آغازگرهای IFAP و ESP می‌باشد. نتایج این تحقیق نشان داد که در جمعیت‌های سنگ طارم × نعمت و سنگ طارم × ندا به ترتیب تعداد ۱۰ و ۷ بوته معطر خالص با ویژگی‌های زراعی مطلوب شناسایی شدند (شکل ۲). ضمن بذری از این ژنوتیپ‌ها، ویژگی‌های مهم زراعی آنها نیز یادداشت‌برداری گردید (جدول ۳). سایر ارزیابی‌ها روی این لاین‌ها در نسل‌های متعاقب براساس روش شجره‌ای استوار خواهد بود.

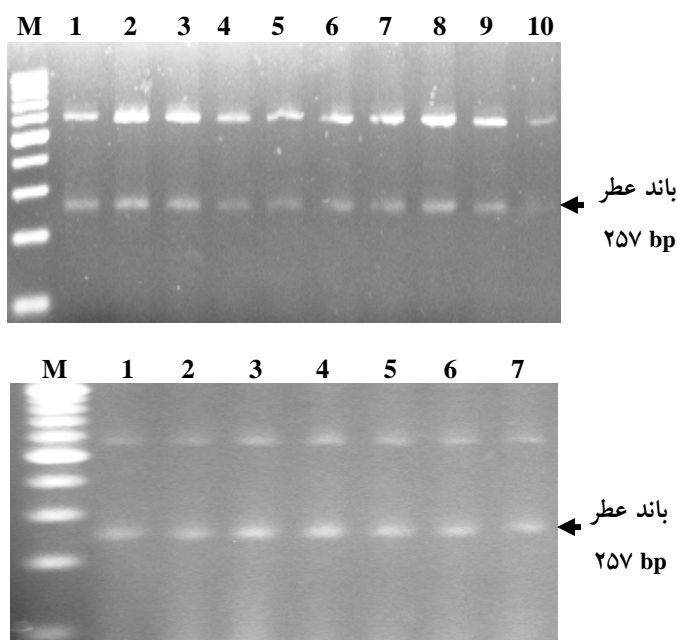
مقدار X<sup>2</sup> آنها به ترتیب برابر ۲/۶۵۵ و ۱/۱۰۳ گردید. نتایج ارزیابی مولکولی الگوی تفرق صفت عطر در جمعیت‌های مورد مطالعه با استفاده از نشانگر آن در جدول ۲ آمده است. با توجه به این‌که این نشانگر قابلیت تشخیص بوته‌های با ژنوتیپ خالص معطر، هتروزیگوت و غیرمعطر را داراست (۳)، نسبت تفرق مشاهده شده بر این اساس در جمعیت‌های سنگ طارم × ندا و سنگ طارم × نعمت به ترتیب برابر با ۵۱:۱۰۳ و ۴۹:۱۰۲:۳۸ مشاهده گردید. این نسبت‌ها با نسبت مورد انتظار ۱:۲:۱ (معطر: هتروزیگوت: غیرمعطر) انطباق دارند، زیرا مقدار X<sup>2</sup> محاسبه شده آنها غیرمعنی‌دار بود که نشان‌دهنده الگوی تفرق تک‌ژن مغلوب در جمعیت‌های F<sub>2</sub> می‌باشد. به‌طورکلی، نتایج ارزیابی فنوتیپی و نیز مولکولی در این تحقیق نشان‌دهنده کنترل صفت عطر به‌صورت مغلوب و تک‌ژنی در رقم معطر سنگ طارم می‌باشد. این نتایج در انطباق با نتایج بسیاری از محققین دیگر است (۵، ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۳).

#### انتخاب به کمک نشانگر برای ژن عطر

با هدف شناسایی تک‌بوته‌های معطر خالص به انتخاب مولکولی

جدول ۳. مشخصات زراعی تک‌بوته‌های انتخابی از جمعیت‌های F<sub>2</sub> مورد مطالعه

بوته	ارتفاع گیاه (سانتی‌متر)	تعداد پنجه	طول خوشه (سانتی‌متر)	تعداد دانه در خوشه	وزن هزار دانه (گرم)
۱	۱۴۰	۳۲	۳۰/۷	۸۵	۲۲/۹
۲	۱۳۰	۲۹	۲۶	۱۱۶	۲۵/۵
۳	۱۴۶	۱۹	۳۰	۱۱۶	۲۲/۷
۴	۱۶۳	۲۰	۳۴	۱۳۸	۲۹/۰
۵	۱۷۰	۱۵	۳۴/۷	۱۵۸	۲۵/۸
۶	۱۳۱	۳۱	۳۳	۱۲۸	۳۱
۷	۱۲۹	۲۰	۲۶/۵	۸۵	۲۳/۷
۸	۱۳۸	۳۰	۳۰	۱۴۸	۳۴
۹	۱۴۵	۱۳	۳۷	۱۵۲	۲۹
۱۰	۱۶۷	۲۲	۳۵/۷	۱۱۱	۲۹/۲
۱۱	۱۶۹	۱۸	۳۵/۵	۸۰	۲۰
۱۲	۱۵۱	۲۵	۳۴	۹۴	۲۶/۲
۱۳	۱۵۰	۲۸	۳۲	۱۷۲	۲۸/۸
۱۴	۱۳۰	۱۴	۲۶	۱۳۹	۲۶/۸
۱۵	۱۵۳	۱۶	۳۰	۱۴۱	۲۱/۶
۱۶	۱۷۵	۱۸	۳۱/۷	۴۸	۱۴/۵۷
۱۷	۱۴۳	۲۸	۳۲	۱۹۸	۲۷/۲۰



شکل ۲. الگوی باندهای بوته‌های معطر خالص شناسایی شده با استفاده از نشانگر عطر در جمعیت‌های سنگ‌طارم × نعمت (شکل بالا) و سنگ‌طارم × ندا (شکل پائین). M مارکر وزنی است.

مطلوب شناسایی نمودند. هم‌چنین بی و همکاران (۲۰) خصوصیات کیفی رقم برنج غیرمعطر Manawthukha را از طریق MAS اصلاح نمودند. آنها ۱۲ لاین اصلاحی با خصوصیات کیفیتی و زراعی مطلوب را شناسایی کردند.

### نتیجه‌گیری

در این تحقیق، ضمن مطالعه نحوه کنترل ژنتیکی عطر در برنج که به صورت تک ژن مغلوب عمل می‌کند، با استفاده از انتخاب فنوتیپی و متعاقب آن انتخاب مولکولی تک‌بوته‌های معطر خالص از جوامع در حال تفکیک  $F_2$  به تعداد ۱۷ ژنوتیپ معطر خالص با ویژگی‌های زراعی مطلوب شناسایی شدند. این کار از نظر تلفیق اصلاح کلاسیک و اصلاح مولکولی می‌تواند حائز اهمیت باشد و روند توسعه و تولید لاین‌های جدید معطر را در اصلاح برنج تسریع نماید.

نهایتاً از این لاین‌ها ارقام معطر برنج با ویژگی‌های زراعی مطلوب در آینده به دست خواهد آمد.

از انتخاب به کمک نشانگر (MAS) می‌توان در مراحل اولیه رشد گیاه استفاده نمود. این کار به خصوص برای صفاتی نظیر کیفیت دانه که در مراحل آخر رشد قابل ارزیابی هستند، بسیار مهم است. بنابراین، بوته‌های نامطلوب را می‌توان به سرعت در مراحل اولیه رشد گیاه از طریق راهکار MAS حذف نمود. هم‌چنین با استفاده از آن ژنوتیپ گیاه را در وضعیت هموزیگوت و هتروزیگوت تشخیص داد که این کار از طریق انتخاب فنوتیپی میسر نمی‌باشد. این مزایا باعث سرعت بخشیدن به برنامه‌های اصلاحی می‌شود (۱۱ و ۱۵). از MAS به طور موفقیت‌آمیز برای اصلاح کیفیت برنج استفاده شده است. به طور مثال، جین و همکاران (۹) خصوصیات کیفی رقم برنج II-32B را از طریق انتخاب به کمک نشانگر مولکولی اصلاح نمودند. آنها نهایتاً ۱۷ لاین اصلاحی را با خصوصیات کیفیتی

### منابع مورد استفاده

1. Bradbury, L. M. T., T. L. Fitzgerald, R. J. Henry, Q. S. Jin and D. L. E. Waters. 2005a. The gene for fragrance in rice. *Plant Biotechnology Journal* 3: 363-370.
2. Bradbury, L. M. T., R. J. Henry, Q. S. Jin, R. F. Reinke and D. L. E. Waters. 2005b. A perfect marker for fragrance genotyping in rice. *Molecular Breeding* 16: 279-283.
3. Chen, S., Y. Yang, W. Shi, Q. Ji, F. He, Z. Zhang, Z. Cheng, X. Liu and M. Xu. 2008. Badh2, encoding betaine aldehyde dehydrogenase, inhibits the biosynthesis of 2-acetyl-1-pyrroline, a major component in rice fragrance. *The Plant Cell* 20: 1850-1861.
4. Dellaporta, S. L., J. Wood and J. B. Hicks. 1983. A plant DNA mini-preparation: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1: 19-21.
5. Dong, J. Y., E. Tsuzuki and H. Terao. 2000. Inheritance of aroma in four rice cultivars (*Oryza sativa* L.). *International Rice Research Notes* 25: 2.
6. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2004. The State of Food and Agriculture 2003-2004. Agricultural Biotechnology: Meeting the Needs of the Poor? Available at: [www.fao.org/docrep/](http://www.fao.org/docrep/), last accessed on 1 June 2005.
7. Geetha, S. 1994. Inheritance of aroma in two rice crosses. *International Rice Research Notes* 19(2): 5.
8. Jin, L., Y. Lu, Y. Shao, G. Zhang, P. Xiao, S. Shen, H. Corke and J. Bao. 2010. Molecular marker assisted selection for improvement of the eating, cooking and sensory quality of rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Cereal Science* 51: 59-64.
9. Jin, Q. S., D. Waters, G. M. Cordeiro, R. J. Henry and R. F. Reinke. 2003. A single nucleotide polymorphism (SNP) marker linked to the fragrance gene in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Science* 165: 359-364.
10. Lorieux, M., M. Petrov, N. Huang, E. Guiderdoni and A. Ghesquiere. 1996. Aroma in rice: Genetic analysis of a quantitative trait. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 1145-1151.
11. Morris, M., K. Dreher, J. M. Ribaut and M. Khairallah. 2003. Money matters (II): Costs of maize inbred line conversion schemes at CIMMYT using conventional and marker aided selection. *Molecular Breeding* 11: 235\_247.
12. Nematzadeh, G. A. and M. T. Karbalaie. 2002. Preliminary studies of aroma inheritance in rice (*Oryza sativa* L.). *Iranian Journal of Agricultural Sciences* 33(1): 29-35. (In Farsi).

13. Nematzadeh, G. A., N. Huang and G. S. Khush. 2004. Mapping the gene for aroma in rice (*Oryza sativa* L.) by bulk segregant analysis via RAPD markers. *Journal of Agricultural Science and Technology* 6: 129-137.
14. Pinson, S. R. M. 1994. Inheritance of aroma in six rice cultivars. *Crop Science* 34: 1151-1157.
15. Ribaut, J. M. and D. Hoisington. 1998. Marker-aided selection: New tools and strategies. *Trends in Plant Science* 3: 236-239.
16. Shi, W. W., Y. Yang, S. H. Chen and M. L. Xu. 2008. Discovery of a new fragrance allele and the development of functional markers for the breeding of fragrant rice varieties. *Molecular Breeding* 22: 185-192.
17. Sood, B. C. and E. A. Seddiq. 1978. A rapid technique for scent determination in rice. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding* 38: 268-271.
18. Vivekanandan, P. and S. Giridharan. 1994. Inheritance of aroma and breadth wise grain expansion in Basmati and non-Basmati rices. *International Rice Research Notes* 19(2): 4-5.
19. Widjaja, R., J. D. Craske and M. Wootton. 1996. Comparative studies on volatile components of non-fragrant and fragrant rices. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 70: 151-161.
20. Yi, M., K. T. New, A. Vanavichit, W. Chai-Arree and T. Toojind. 2009. Marker assisted backcross breeding to improve cooking quality traits in Myanmar rice cultivar Manawthukha. *Field Crops Research* 113: 178-186.
21. Yoshihashi, T. 2002. Quantitative analysis on 2-acetyl-1-pyrroline of aromatic rice by stable isotope dilution method and model studies on its formation during cooking. *Journal of Food Science* 67: 619-622.