

SÀNG LỌC CÁC GIỐNG LÚA CÓ CHỨA GEN MÙI THƠM BẰNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ

Application of DNA Marker for Screening Aromatic Gene in Rice

Phan Hữu Tôn*, Tổng Văn Hải

Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội

*Địa chỉ email tác giả liên lạc: Phanhuuton@yahoo.com

TÓM TẮT

Hương thơm ở lúa được tạo nên bởi hơn một trăm loại chất khác nhau, trong đó 2-acetyl-1-pyrroline (2-AP) là chất dễ bay hơi đóng vai trò chính thể hiện mùi thơm trong nhiều giống lúa. Hàm lượng 2-AP cao có liên quan đến đột biến gen mã hóa enzyme betaine aldehyde dehydrogenase 2 (BAD2). Cặp mồi ESP & IFAP dùng để phát hiện gen thơm *fgr* của 19 giống lúa đang cấy phổ biến, 45 giống lúa triển vọng và 39 giống lúa địa phương bằng kỹ thuật PCR được thiết kế dựa trên sự đa hình DNA và được sử dụng để đánh giá về sự tương đồng so với phương pháp ngửi mùi ở bột gạo và lá. Kết quả đã phát hiện gen thơm *fgr* có mặt trong các giống lúa tẻ, nhưng không thấy trong các giống lúa nếp. Một vài giống lúa có gen thơm *fgr* và biểu hiện mùi thơm ở lá và bột gạo. Nghiên cứu đã chọn được 2 dòng lúa tẻ triển vọng tốt (T33 và T12), chứa gen mùi thơm 2-AP, năng suất khá và 2 dòng lúa nếp thơm (NV1 và NV3), nhưng không chứa gen sinh 2-AP.

Từ khóa: Lúa thơm, 2-acetyl-1-pyrroline (2-AP), PCR.

SUMMARY

Scent of aromatic rice derives from more than 100 volatile substances, among them 2-acetyl-1-pyrroline (2-AP) plays a key role. Content of 2-AP involved in the deletion 8 nucleotides and 3 SNPs in the seventh exon of gene coding betaine aldehyde dehydrogenase 2 (BAD2). PCR technique was developed using primers corresponding to DNA polymorphism. We used ESP& IFAP primers in PCR to detect aromatic gene (*fgr*) in 19 dominant planting varieties (10 non - aromatic and 9 aromatic), 39 local accessions and 45 promising lines. Results showed that the MAS method can be applied successfully to detect aromatic gene (*fgr*) in non-glutinous rices, but not for sticky ones. Several non-glutinous accessions containing *fgr* gene and fragrance in leaves and grains were detected for utilization in breeding program. Four promising lines, off them two sticky, namely NV1, NV2 and two non-glutinous lines, T33, T12 with high yield potential, good grain quality and scent character were developed.

Key words: Aromatic rices, 2-acetyl-1-pyrroline, PCR.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Mùi thơm ở lúa là một tính trạng chất lượng đang được ưa chuộng hiện nay. Có khoảng hơn một trăm chất tạo ra, trong đó 2-acetyl-1-pyrroline (2-AP) là chất bay hơi đóng vai trò chính thể hiện mùi thơm trong nhiều giống lúa (Buttery và cs., 1983; Lorieux và cs., 1996; Yoshihashi, 2002). Có ba gen trội quy định mùi thơm ở lúa đã được

xác định là Ska, Skb và Skc (Reddy và Sathyanarayanaiaid, 1980). Tuy nhiên, tùy từng tác giả, tùy từng tổ hợp lai sử dụng mà kết luận về số lượng gen quy định mùi thơm có khác nhau, từ 1- 3 gen trội quy định. Quá trình tổng hợp 2-AP phụ thuộc gián tiếp vào hoạt tính của enzyme Betaine Aldehyde Dehydrogenase (BAD2). Khi BAD2 hoạt động mạnh sẽ cạnh tranh cơ chất với enzyme sinh tổng hợp ra 2-AP dẫn đến hàm lượng 2-AP bị

giảm và lúa sẽ không có mùi thơm (Kuo và cs., 2006). Ngược lại, nếu gen sinh enzyme BAD2 bị đột biến dẫn đến xuất hiện mã kết thúc sớm sẽ làm enzyme BAD2 mất hoạt tính, dẫn đến enzyme tổng hợp sinh ra 2-AP nhiều và thơm, chứa gen thơm lặn *fgr*. Giống lúa nào mang gen mã hóa BAD2 nguyên vẹn bình thường sẽ không thể hiện mùi thơm 2-AP, không chứa gen thơm *fgr*. Sự đa hình DNA này là cơ sở để Bradbury và cs. (2005), Kuo và cs. (2006), Chen và cs. (2006) xây dựng phương pháp chỉ thị phân tử DNA nhằm phát hiện ra gen thơm *fgr* ở lúa. Để tạo giống lúa thơm, các nhà chọn giống thường phải tiến hành lai chuyển gen thơm, chọn lọc các đời phân ly, đồng thời tự phối để làm thuần qua nhiều thế hệ. Trong quá trình đó, việc phát hiện và chọn sớm những cá thể mang hay không mang gen thơm có ý nghĩa quyết định. Đã có một số phương pháp nhằm phát hiện mùi thơm ở lúa như nhấm hạt, ngửi mùi trực tiếp trên lá hoặc ngâm lá hay hạt vào dung dịch KOH 1,7% (Sood và cs., 1978) rồi ngửi mùi hay xác định hàm lượng 2-AP bằng sắc ký (Butterly và cs., 1986). Gần đây có phương pháp nhờ chỉ thị phân tử MAS (Marker-Assisted Selection) phát hiện gen mùi thơm là công cụ hữu hiệu nhất, chọn nhanh, sớm, chính xác, cùng một lúc có thể tiến hành chọn được nhiều tính trạng và chọn lọc không phụ thuộc vào điều kiện môi trường.

Nghiên cứu này ứng dụng phương pháp chỉ thị phân tử DNA để sàng lọc gen qui định mùi thơm 2-AP trong tập đoàn các mẫu giống lúa Việt Nam được lưu giữ tại Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội và một số dòng lúa mới chọn tạo có triển vọng. Kết quả thu được sẽ làm cơ sở cho việc bảo tồn và sử dụng nguồn gen quý này trong chọn tạo giống lúa thơm phục vụ sản xuất ở Việt Nam.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Vật liệu gồm 19 giống lúa đang trồng phổ biến, trong đó 9 giống lúa thơm và 10 giống

không thơm; 39 mẫu giống lúa tẻ địa phương thu thập ở các tỉnh miền núi phía Bắc Việt Nam; 45 dòng triển vọng đã thuần được chọn lọc từ một số tổ hợp lai giữa giống lúa thơm và không thơm, trong đó 18 dòng lúa nếp và 27 dòng lúa tẻ có nguồn gốc từ Bộ môn Công nghệ sinh học ứng dụng, Khoa Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội.

2.2. Phương pháp

Các dòng giống được cấy tuần tự, không nhắc lại, mật độ cấy 42 cây/m², trồng vụ xuân 2009. Đánh giá đặc điểm nông sinh học và năng suất theo phương pháp của IRRI (2002).

2.2.1. Đánh giá cảm quan mùi thơm

Theo Sood và Siddiq (1978), mùi thơm được đánh giá cảm quan như sau:

Mùi thơm trên lá: Thu 10 lá của mỗi mẫu giống ở giai đoạn lúa đẻ nhánh rộ. Lấy 1 g lá, cắt thành những đoạn dài 5 mm, bỏ vào ống nghiệm, ngâm với 5 ml dung dịch KOH 1,7%, đập nắp lại và để ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Mức độ thơm được chấm điểm bởi 5 người cho theo 3 mức: thơm (điểm 3), hơi thơm (điểm 2), không thơm (điểm 1) rồi lấy trung bình.

Mùi thơm của gạo: Lấy 10 hạt của mỗi giống, vừa mới thu hoạch, bóc vỏ, làm trắng rồi nghiền nhỏ. Bột gạo của mỗi giống được cho vào một ống chứa 500 µl KOH 1,7%, đập nắp và để ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Đánh giá mùi thơm cũng bằng phương pháp ngửi của 5 người rồi cho điểm như trên.

2.2.2. Xác định gen thơm *fgr* bằng PCR

* Chiết xuất DNA

Lấy 2 cm lá non, thu vào buổi sáng, cắt nhỏ bỏ vào cối sứ và nghiền với 400 µl dung dịch chiết xuất DNA chứa 50 mM Tris - HCl pH8,0; 0,25 mM EDTA; 300 mM NaCl và 1% SDS, tới khi mẫu chuyển thành màu xanh lá cây. Bổ sung 400 µl dung dịch chiết xuất vào cối, trộn đều rồi chuyển sang ống eppendorf, quay ly tâm nhẹ. Lấy 400 µl dung dịch phía

trên vào ống eppendorf mới rồi thêm 700 μ l dung dịch phenol: chloroform: isosaminealcohol (25:24:1), ly tâm và thu dịch nổi phía trên. Kết tủa DNA bằng ethanol 99,9%, thu kết tủa rồi hoà trong TE chứa 10 mM Tris-HCl pH 8,0 và 1mM EDTA pH 8,0.

*** Phản ứng PCR**

- Sử dụng cặp mồi có trình tự được thiết kế dựa trên đoạn đa hình theo công bố của Bradbury và cs., 2005 là: ESP: 5'-TTG TTT GGA GTC TGC TGA TG-3', IFAP 5'-CAT AGG AGC AGC TGA AAT ATA TACC-3'. Theo đó, giống lúa nào mang gen mùi thơm *fgr* sẽ nhân được đoạn DNA có kích thước 257 bp, giống không mang gen sẽ không nhân được đoạn DNA nào.

- Tiến hành phản ứng PCR với chu kỳ nhiệt sau: 94°C trong 2 giây, 30 chu kỳ 94°C trong 5 giây, 58°C trong 5 giây, 72°C trong 5 giây và cuối cùng 72°C trong 5 phút.

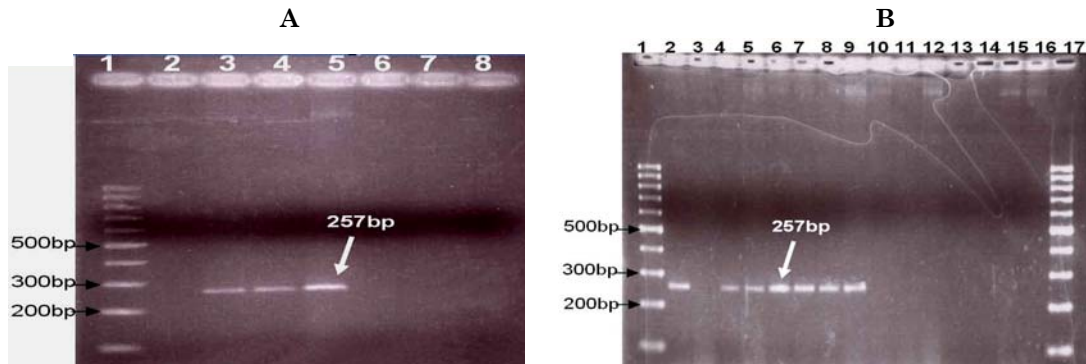
*** Điện di**

Sản phẩm PCR được tiến hành trên gel agarose 2% với hiệu điện thế 65V trong khoảng 45 phút. Bản gel được nhuộm với Ethidium bromide 0,1% trong 10 phút rồi chụp ảnh.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Sự có mặt của gen mùi thơm *fgr* trong một số giống phổ biến

Trước khi thực hiện xác định sự có mặt của gen qui định mùi thơm 2-AP trong các dòng, giống nghiên cứu, chúng tôi tiến hành kiểm tra, phát hiện gen thơm của cặp mồi này ở các dòng giống đã biết rõ thơm hay không thơm. Phản ứng PCR được thực hiện trên các giống đối chứng thơm và không thơm, kết quả thu được sau khi điện di sản phẩm PCR được trình bày ở hình 1 A và 1B.



Hình 1. (A, B) Kết quả điện di sản phẩm PCR sử dụng cặp mồi ESP & IFAP

A

Giếng 1 : ladder 100 bp	Giếng 5: Nếp Lào
Giếng 2 : H ₂ O	Giếng 6: IR64
Giếng 3 : BT7	Giếng 7: ĐR ₃
Giếng 4 : LT3	Giếng 8: DV108

B

Giếng 1, 17 : ladder 100 bp	Giếng 9 : Bao Thai
Giếng 2: BT7	Giếng 10 : Hồng Kông 1
Giếng 3: IR64	Giếng 11 : KD
Giếng 4: Hương cốm	Giếng 12 : Q ₅
Giếng 5: ST ₁₀	Giếng 13 : MT18
Giếng 6: HT ₁	Giếng 14 : ĐB5
Giếng 7: N46	Giếng 15 : Trắc 64
Giếng 8: MT ₁	Giếng 16 : TN13-5

Theo Bradbury và cs. (2005), giống chứa gen *fgr* sẽ cho vết băng kích thước 275 bp, còn những giống không chứa gen *fgr* thì ADN không được nhân, tức không có vạch nào. Hình 1A và 1B cho thấy, các giống có mùi thơm như: Bắc thơm 7 (BT 7), LT3, nếp Lào, Hương cốm, ST10, HT1, N46, MT1 và Bao thai có xuất hiện vạch băng 257bp, còn các giống không có mùi thơm như: IR64, ĐR3, DV108, Hồng Kông 1, KD, Q5, MT18, ĐB5, Trắc 64 và TN13-5 đều không có vạch băng nào được nhân lên. Để kiểm chứng lại độ chính xác của phương pháp PCR, chúng tôi tiến hành đánh giá cảm quan mùi thơm thể hiện ở lá và gạo (Bảng 1).

Số liệu ở bảng 1 cho thấy, trong số 19 giống, 9 giống đánh giá cảm quan có mùi thơm đều thể hiện vạch băng dài khoảng 257bp chứng tỏ có chứa gen *fgr*, 10 giống không có mùi thơm thì không có vạch băng nào được nhân lên. Từ kết quả này, có thể kết luận là mùi thơm của các giống nghiên cứu đều là mùi thơm do chất 2-AP gây lên và các giống có mùi thơm đều chứa gen *fgr* đột biến lặn mất khả năng tổng hợp enzyme BAD2 hoạt hóa.

3.2. Điều tra gen mùi thơm của các mẫu giống lúa địa phương

Trong tổng số 39 mẫu giống lúa tẻ địa phương được điều tra bằng chỉ thị phân tử DNA (Bảng 2), đã phát hiện được 12 mẫu giống có chứa gen *fgr* là: 10600, 10596, 10595, 10585, 10689, 10577, 10574, 10504, 10672, 10619, 10606, 10449. Tuy chứa gen mùi thơm nhưng mức độ thể hiện mùi thơm trên lá và gạo giữa các mẫu giống có khác nhau. Ví dụ ở mẫu 10604, 10595, 10577, 10574, 10572 và 10607, cả lá và gạo đều thơm, trong khi đó mẫu giống 10585 và 10619 chỉ thấy mùi thơm trên gạo. Riêng 2 dòng 10596 và 10449 có gen thơm nhưng không có mùi thơm. Điều này có thể là do một cơ chế nào đó gây mất mùi thơm 2-AP sau khi được sinh ra hoặc gen này nằm ở trạng thái dị hợp tử lặn nên không thể hiện ra kiểu hình thơm. Trường hợp này cần tiếp tục được nghiên cứu để làm rõ.

3.3. Kết quả xác định gen thơm 2-AP dòng lúa nếp mới chọn tạo

Kết quả thực hiện kỹ thuật PCR xác định gen *fgr* trong 18 dòng, giống lúa nếp kết hợp với đánh giá cảm quan bằng ngửi mùi trên lá và bột gạo cho ở bảng 2.

Bảng 1. Kết quả đánh giá mùi thơm và PCR của các giống lúa thơm và không thơm (điểm)

Giống thơm		Lá	Gạo	Gen <i>fgr</i>	Giống lúa không thơm		Lá	Gạo	Gen <i>fgr</i>
1	Bắc thơm 7 (BT7)	3,0	3,0	+	10	IR64	1,0	1,0	-
2	HT1	2,8	2,0	+	11	ĐR3	1,0	1,0	-
3	Hương cốm	3,0	2,0	+	12	HK 1	1,0	1,0	-
4	Nếp Lào	2,8	2,6	+	13	DV108	1,0	1,0	-
5	ST10	2,0	2,8	+	14	Khang dân (KD)	1,0	1,0	-
6	LT3	2,8	2,6	+	15	MT18	1,0	1,0	-
7	MT1	2,8	2,0	+	16	ĐB5	1,0	1,0	-
8	Bao thai	1,8	2,6	+	17	Q5	1,0	1,0	-
9	N46	3,0	2,6	+	18	TN13-5	1,0	1,0	-
					19	Trắc 64	1,0	1,0	-

Ghi chú: + có mùi thơm
- không có mùi thơm

Bảng 2. Kết quả đánh giá mùi thơm bằng ngửi mùi và PCR của các mẫu giống

Tên giống	Mùi trên lá	Mùi bột gạo	Gen <i>fgr</i>	Tên giống	Mùi trên lá	Mùi bột gạo	Gen <i>fgr</i>	Tên giống	Mùi trên lá	Mùi bột gạo	Gen <i>fgr</i>
Mẫu giống lúa địa phương											
10698	2,0	1,8	-	10689	3,0	2,6	+	10675	1,0	1,0	-
10696	1,0	1,0	-	10682	2,0	1,0	-	10674	2,6	1,0	-
10694	1,0	1,0	-	10681	1,0	1,0	-	10672	3,0	2,0	+
10693	1,0	1,0	-	10678	2,6	3,0	-	10666	1,0	1,0	-
10605	1,8	1,0	-	10577	2,0	2,0	+	10495-1	1,0	1,0	-
10604	1,0	1,0	-	10574	2,0	2,0	+	10471cc	1,0	1,0	-
10600	2,8	1,8	+	10518	1,0	1,0	-	10122-1	1,0	1,0	-
10596	1,0	1,0	+	10517	1,0	1,0	-	10619	2,0	1,0	+
10595	2,4	2,0	+	10512	2,0	1,0	-	10606	2,4	2,6	+
10594	1,0	1,0	-	10504	2,0	1,0	+	10489	2,0	1,0	-
10585	2,0	1,0	+	10503	1,0	1,0	-	10449	1,0	1,0	+
10581	1,0	1,0	-	10491	1,0	1,0	-	10196	1,0	1,0	-
10342	1,9	2,6	-	10341	2,8	3,0	-	10097	1,0	1,0	-
Mẫu dòng lúa nếp mới chọn tạo											
NV8(1)	2,4	3,0	-	NV10(1)	2,0	3,0	-	HĐ10(2)	2,8	2,0	-
NV6	3,0	2,4	-	NV12(1)	3,0	2,4	-	HĐ10(1)	3,0	3,0	-
NV5(1)	2,0	2,0	-	N56	2,6	3,0	-	HĐ1(1)	3,0	3,0	-
NV4	1,0	1,9	-	HĐ9	3,0	3,0	-	NV1	3,0	3,0	-
NV3	3,0	3,0	-	HĐ6	2,4	3,0	-	BM9603	2,8	3,0	-
NV2	3,0	2,4	-	HĐ3	1,0	1,0	-	HĐ11	2,4	3,0	-
Các dòng lúa tẻ mới chọn tạo											
TH7A-2	1,0	1,0	-	21-8-1B-1	1,0	1,0	-	21-1-2	1,0	1,0	-
SS-2'	1,0	1,0	-	21-8-1B	1,0	1,0	-	21-1-1-3	2,0	1,0	-
SS-2	1,0	1,0	-	21-8-1A	1,9	1,0	-	21-1-1	1,0	1,0	-
SS-1	1,0	1,0	-	21-8-16-2	1,0	1,0	-	128T-2B2	1,0	1,0	+
SS	2,0	1,0	-	21-13-1A	1,0	1,0	-	N50	1,0	1,0	-
SC2	2,4	3,0	+	21-12-3-2	1,0	1,0	-	N19	1,0	1,0	-
SC1(1)	1,0	1,0	-	21-12-3-1	1,0	1,0	-	N18	1,0	1,0	-
21-8-2B-2	1,0	1,0	-	21-8-2A	1,0	1,0	-	TN13-5	1,0	1,0	-
T33	1,0	1,0	+	T59	3,0	3,0	+	T12	3,0	2,0	+

Kết quả ở bảng 2 cho thấy, hầu hết các dòng nếp đều thể hiện mùi thơm nhưng lại không chứa gen thơm *fgr*. Điều này chứng tỏ dạng mùi thơm có trong các dòng lúa nếp nghiên cứu ở trên, có bản chất di truyền khác với dạng mùi thơm của các giống lúa tẻ. Bản chất mùi thơm của lúa nếp khác với lúa tẻ như thế nào, tại sao trên lúa tẻ phát hiện ra gen mùi thơm đồng nghĩa với có mùi thơm bằng đánh giá cảm quan mà trên lúa nếp có mùi thơm lại không tìm thấy gen *fgr* cho đến nay chưa được tác giả nào đề cập.

Tuy nhiên để có kết luận chính xác, cần có những nghiên cứu tiếp theo về cơ chế tạo mùi thơm ở lúa nếp.

3.4. Kết quả xác định gen thơm của các dòng lúa triển vọng

Sử dụng 2 môi ESP và IFAP để xác định sự có mặt của gen thơm 2-AP trong các dòng, giống lúa triển vọng mới được lai tạo. Kết quả điện di sản phẩm PCR của 27 dòng cho thấy có 5 dòng có chứa gen *fgr* là SC2, T33, T59, 128T-2B2 và T12. So sánh với việc đánh giá cảm quan qua lá, hạt gạo cho

thấy, trong 5 dòng chứa gen thơm thì chỉ có 3 dòng SC2, T59 và T12 là có mùi thơm, các dòng còn lại 128T - 2B2 và T33 không có mùi thơm. Điều này có thể do gen thơm là gen lặn, qua phép lai giữa các giống, cặp alen này có thể tồn tại ở dạng dị hợp tử nên không biểu hiện mùi thơm ở lá và bột gạo.

3.5. Giới thiệu một số dòng tốt

Nghiên cứu này đã chọn được 4 dòng có năng suất khá, chất lượng cao và có mùi thơm (Bảng 3).

Hai dòng lúa nếp NV1 và NV3 tuy phương pháp PCR không phát hiện thấy gen *fgr* nhưng bằng cảm quan nhận thấy chúng rất thơm, năng suất trung bình đạt lần lượt là 51,32 tạ/ha và 52,25 tạ/ha, cho cơm dẻo.

Hai dòng lúa tẻ T33 và T12 bằng phương pháp PCR đều phát hiện thấy có sự hiện diện của gen *fgr*, nhưng bằng đánh giá cảm quan chỉ có dòng T12 là có mùi thơm, còn dòng T33 không thơm, tuy nhiên cơm ăn đậm, ngon và mềm đáp ứng yêu cầu của người tiêu thụ.

Bảng 3. Giới thiệu một số dòng lúa chất lượng và thơm tốt

Tên dòng	Đặc điểm	Gen <i>fgr</i>	TGST (ngày)	Số nhánh hữu hiệu/ khóm	Số bông hữu hiệu/ khóm	Số hạt trên bông	Khối lượng 1000 hạt (g)	Năng suất (tạ/ha)	Hàm lượng amylose (%)
NV1	Nếp (thơm)	-	152	7,3	6,5	156,0	27,0	51,32	9,6
NV3	Nếp (thơm)	-	153	7,9	6,4	162,0	27,2	52,25	9,5
T33	Tẻ (không thơm)	+	142	6,7	5,8	197,0	24,5	62,35	19,5
T12	Tẻ (thơm)	+	140	6,8	6,0	215,0	23,5	63,50	20,5

4. KẾT LUẬN

Bằng chỉ thị phân tử DNA đã phát hiện được sự hiện diện của gen *fgr* trong tập đoàn các giống lúa cấy phổ biến, các giống lúa địa phương và các dòng giống lúa tẻ mới chọn tạo. Đối với các dòng lúa nếp không phát hiện được gen *fgr* mặc dù bằng cảm quan đánh giá lại rất thơm.

Dựa trên kết quả PCR nhân gen *fgr* và ngửi mùi lá, bột gạo ở các giống tẻ và nếp, chúng tôi bước đầu đưa ra kết luận mùi thơm ở lúa tẻ và lúa nếp có bản chất di truyền khác nhau. Tuy nhiên, vấn đề này cần được nghiên cứu thêm.

Nghiên cứu này đã chọn được 2 dòng nếp (NV1, NV2) và 2 dòng lúa tẻ (T12, T33) có năng suất cao, chất lượng tốt và có mùi thơm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bradbury L.M.T, Henry R.J, Jin Q.S, Reinke R.F and Waters D.L.E. (2005). A perfect marker for fragrance genotyping in rice. *Molecular Breeding* (2005) 16:279-283.
- Buttery RG, Ling LC, Juliano BO, and Turnbaugh J. (1983). Cooked rice aroma and 2-acetyl-1-pyrroline. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 31, 823-826.
- Chen S, Wu J, Yang Y, Shi W, Xu M.L (2006). The *fgr* gene responsible for rice fragrance was restricted within 69bp. *Plant Sci*. (2006). Vol.171, No. 4, pp:505-511.
- IRRI (2002). Standard Evaluation System for Rice.
- Kuo S.M, Chou S.Y, Wang A.Z, Tseng T.H, Chueh F.S, Yen H.C, Wang C.S. (2006). The betaine aldehyde dehydrogenase (BAD2) gene is not responsible for the aroma trait of SA0420 rice mutant derived by sodium azide mutagenesis. National Science Council (NSC 94-2317-B-055-006).
- Lorieux M, Petrov M, Huang N, Guiderdoni E, Ghesquiere A. (1996). Aroma in rice: Genetic analysis of a quantitative trait. *Theor Appl Genet* (1996) 93:1145-1151.
- Reddy, P.R. and K. Sathyanarayanaiah (1980). Inheritance of aroma in rice. *Indian J. Genet.* 40: 327 – 329.
- Sood BC, Siddiq EA (1978). A rapid technique for scent determination in rice. *Indian J Genet Plant Breed* 38:268-271.
- Yoshihashi T, Kabaki N, Nguyen T.T.H and Inatomi H. (2002). Formation of flavor compound in aromatic rice and its fluctuations with drought stress. *JIRCARS Research Highlights*.