

APLIKASI BERBAGAI MARKA AROMATIK PADA VARIETAS PADI INDONESIA

(VARIOUS FRAGRANT MARKERS APPLICATION ON INDONESIA RICE VARIETIES)

Djarot Sasongko Hami Seno^{1,*}, Satya Nugroho¹, Tri Joko Santoso², Dimas Adrianto¹, Dewi Praptiwi², Aniversari Apriana², Zainal Alim Mas'ud³

ABSTRACT

This research applied various *badh2.7* and *badh2.2* fragrant markers (Bradbury *et al.*, 2005b, Lang and Buu 2008, Shi *et al.*, 2008, Sakthivel *et al.*, 2009) on popular Indonesia non-fragrant (Ciherang, Fatmawati) and fragrant (Pandan wangi, Rojo Lele, Mentik Wangi, Gunung Perak, Pulu mandoti, Pare Kembang, Sintanur) rice varieties. For comparison, IR64, Nipponbare and Taipei 309 were included. Rice DNA samples were isolated from young leaves, and PCR amplified using each of those fragrant markers. Results using all *badh2.7* markers were consistently supported the existence of 2 group *badh2.7* mutation pattern, while the use of *badh2.2* marker indicated that there was no exon 2 mutation. *Badh2.7* sequence analysis of non-fragrant Ciherang, and aromatik member of group 1 (Pandan Wangi), as well as group 2 (Mentik Wangi) showed different mutation pattern.

Keywords: *Badh2.2*, *badh2.7*, fragrant maker, fragrant, non-fragrant.

ABSTRAK

Pada penelitian ini diaplikasikan berbagai marka aromatik ekson 7 (*badh2.7*) dan ekson 2 (*badh2.2*) (Bradbury *et al.*, 2005b, Lang and Buu 2008, Shi *et al.*, 2008, Sakthivel *et al.*, 2009) terhadap berbagai varietas populer nonaromatik (Ciherang, Fatmawati) dan aromatik (Pandan wangi, Rojo Lele, Mentik Wangi, Gunung Perak, Pulu mandoti, Pare Kembang, Sintanur) Indonesia. Sebagai pembandingan digunakan IR64, Nipponbare and Taipei 309. DNA sampel padi diisolasi dari daun muda kemudian diamplifikasi PCR dengan masing-masing marka tersebut di atas. Hasil analisis menggunakan semua marka *badh2.7* konsisten mendukung hasil penelitian sebelumnya tentang dugaan adanya 2 kelompok tipe mutasi *badh2.7* pada varietas Indonesia. Sementara penggunaan marka *badh2.2* menunjukkan tidak adanya mutasi pada ekson 2. Hasil sekuensing *badh2.7* sampel yang mewakili varietas non aromatik (Ciherang), aromatik kelompok 1 (Pandan Wangi), dan aromatik kelompok 2 (Mentik Wangi); menunjukkan adanya perbedaan pola mutasi tersebut.

Kata kunci: *Badh2.2*, *badh2.7*, marka aromatik, ekson 2, ekson 7.

PENDAHULUAN

Penemuan mutasi (delesi 8 bp) ekson 7 gen *badh2* (*badh2.7*) pada varietas aromatik (Borquis *et al.*, 2008) telah mendorong konstruksi marka spesifik aroma yang dapat membedakan padi varietas aromatik dan non aromatik, untuk pengembangan metoda seleksi aroma berbasis marker-assisted PCR (Bradbury *et al.*, 2005b, Lang and Buu 2008, Shi *et al.*, 2008, Sakthivel *et al.*, 2009). Perbedaan ukuran gen antara *badh2* termutasi padi aromatik

dengan *badh2* utuh varietas nonaromatik akan menghasilkan amplikon PCR yang berbeda (Bradbury *et al.*, 2005b). Marka aromatik berbasis ekson 7 pertama kali dipublikasikan oleh Bradbury *et al.*, (2005b) dengan menggunakan sistem multipleks (4 primer) sehingga perbedaan ukuran amplikon aromatik (257 bp) dengan nonaromatik (355 bp) relatif besar dan mudah terlihat. Marka ini telah berhasil diaplikasikan untuk varietas Nipponbare dan Kyeema.

Selain delesi 8 bp pada *badh2.7* yang telah dilaporkan (Bradbury *et al.*, 2005a, Borquis *et al.*, 2008), Shi *et al.*, (2008) juga menemukan adanya delesi 7 bp pada *badh2.2* beberapa varietas aromatik dari Cina (Wuxiang9915, Xiangjing111, Zhenxiangjing5, Wuxiangjing9, Xiangjing02-5855, Xiangjing49, Gehuxiangjing, Guanglingxiangjing,

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

²Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI)

³Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik

* Penulis Korespondensi: hamisenodjarot@gmail.com

Xiangjing111/C9083, Wuxiang99-8, Wuxiangjing14, Suxiangjing1) dan mengkonstruksi marka-marka dupleks berbasis mutasi *badh2.7* (FM-E7) dan *badh2.2* (FM-E2). Namun perlunya penggunaan PAGE untuk memisahkan ampikon FM-E7 (8 bp) maupun FM-E2 (7 bp) membuat marka-marka tersebut kurang praktis untuk *genotyping* rutin yang melibatkan material *breeding* dan *germplasm* yang banyak.

Lang and Buu (2008) juga mempublikasikan marka dupleks RM 223 yang menghasilkan ampikon ~160 bp untuk sampel nonaromatik dan ~120 bp untuk sampel aromatik. Marka ini telah diaplikasikan untuk varietas aromatik (Nang Thom Cho Dao, Khao Dawk Mali 105, Jasmine 85), nonaromatik (C51, C53), dan berbagai varietas lain di Thailand. Selain itu digunakan pada seleksi hasil persilangan persilangan Jasmine 85 dengan C53 atau C51. Walaupun perbedaan ampikon relatif besar (~40 bp) namun marka ini masih berjarak tertentu (4,5 cM) dari gen *badh2* (*badh2*-related) sehingga tidak seakurat marka aromatik lain berbasis *badh2* (*badh2*-based).

Marka dupleks lain berbasis *badh2.7* (Badex7-5) juga telah dikonstruksi dan dilaporkan berfungsi pada identifikasi padi aromatik Basmati, nonaromatik Sambha Mashuri, dan hasil persilangan kedua varietas, serta berbagai varietas padi aromatik/nonaromatik dari India (Amarawathi *et al.*, 2008, Sakthivel *et al.*, 2009). Marka ini menghasilkan ampikon 95 bp untuk aromatik dan 103 bp untuk nonaromatik. Pada kisaran tersebut perbedaan 8 bp *badh2* aromatik dan nonaromatik dicoba diperjelas dan tidak perlu menggunakan PAGE.

Pada penelitian ini marka-marka tersebut digunakan untuk *genotyping* aroma varietas aromatik Indonesia, sebagai inisiasi penelitian aroma padi yang baru mulai terinisiasi di Indonesia, serta memberikan informasi marka-marka yang sesuai dan sekaligus kelebihan/kelemahannya untuk pengembangan varietas aromatik baru di Indonesia. Varietas padi yang digunakan meliputi: varietas nonaromatik Indonesia (Ciherang, Fatmawati) dan pembanding (IR64, Nipponbare and Taipei 309), serta varietas aromatik (Pandan wangi, Rojo Lele, Mentik Wangi, Gunung Perak, Pulu mandoti, Pare Kembang, Sintanur).

BAHAN DAN METODE

Benih tanaman padi yang digunakan diperoleh dari BB Biogen KemTan (Bogor), BB Padi (Sukamandi), dan LIPI (Cibinong). DNA diisolasi dari daun muda sampel tanaman padi yang berumur

2 minggu (Doyle and Doyle 1990). Konsentrasi dan kemurnian DNA ditentukan secara spektrofotometri pada 260 nm dan 260/280 nm (Sambrook *et al.*, 1989). Analisis profil PCR dilakukan menggunakan marka aromatik berbasis *badh2.7* (*badh2.7*-based) (Bradbury, Badex7-5, FM-E7) dan ekson 2 (FM-E2A), serta terkait *badh2.2* (*badh2.2*-related) RM223. Campuran reaksi dan siklus suhu mengacu pada Bradbury *et al.*, (2005b) untuk marka Bradbury, Shi *et al.*, (2008) untuk FME-7 dan FME-2, Sakthivel *et al.*, (2009) untuk Badex7-5, serta Lang and Buu, (2008) untuk RM223. Separasi produk PCR dilakukan menggunakan elektroforesis agarose 1-2% untuk marka Bradbury dan 2-3% untuk marka lainnya, dengan menyertakan standar DNA sizer, kemudian divisualisasi dengan pengecatan Ethidium bromida (10 mg/L) dan penyinaran UV, yang dilanjutkan dengan dokumentasi (Sambrook *et al.*, 1989, Bradbury *et al.*, 2005, Shi *et al.*, 2008, Sakthivel *et al.*, 2009, Lang and Buu 2008). Fragmen *badh2.7* diperoleh dari amplifikasi menggunakan primer eksternal dari marka Bradbury *et al.*, (2005b). Sekuensing *badh2.7* Ciherang, Mentik Wangi, dan Pandan Wangi dilakukan di Macrogen Inc., Seoul, Korea Selatan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Genotyping aroma varietas Indonesia

DNA sampel padi diamplifikasi dengan marka aromatik Bradbury, Badex7-5, FM-E7, atau FM-E2A. Hasilnya (Tabel 1) mendapatkan bahwa semua dapat teramplifikasi. Namun hanya Mentik Wangi dan Gunung Perak saja yang menghasilkan pola yang berbeda. Data ini secara konsisten diperoleh dari 3 marka *badh2.7* (Bradbury, Badex7-5, FM-E7). Hasil yang diperoleh sesuai dengan publikasi peneliti terdahulu yang menkonstruksi marka-marka tersebut (Bradbury *et al.*, 2005, Shi *et al.*, 2008, Sakthivel *et al.*, 2009), serta mendukung hasil penelitian terkait sebelumnya (Hami Seno *et al.*, 2009), dimana diduga ada 2 kelompok pola mutasi *badh2.7*. Kelompok 1 meliputi Mentik Wangi dan Gunung Perak, sedang kelompok 2 meliputi Rojo Lele, Pandan Wangi, Pulu Mandoti, Pare Kembang, Sintanur, dan Gilirang. Hasil yang diperoleh pada penelitian ini membuktikan dugaan tersebut secara konsisten berdasarkan penggunaan marka aromatik Bradbury, Badex7-5, atau FM-E7.

Peneliti lain (Shi *et al.*, 2008) mendapatkan beberapa varietas aromatik di Cina tidak mengandung mutasi (delesi 8 bp) pada *badh2.7*

tetapi mengalami mutasi (delesi 7 bp) pada *badh2.2*. Kasus tersebut tidak dijumpai pada varietas aromatik Indonesia. Hal ini terlihat dari hasil yang diperoleh pada penggunaan marka *badh2.2* (FM-E2A), dimana dari semua varietas padi yang dianalisis, tidak ada yang memberikan pola amplifikasi berbeda (Tabel 1).

Marka Bradbury juga telah dilaporkan tidak dapat mengidentifikasi varietas aromatik unggulan Laos (Kai Noi Leung), Burma (Paw Sam Hwe), dan Indonesia (Pandan wangi) (Fitzgerald *et al.*, 2008, Kovach *et al.*, 2009). Para peneliti tersebut mengusulkan adanya mutasi pada *badh2.9*, namun belum terbukti secara detil. Hasil serupa juga telah dilaporkan untuk varietas aromatik khusus Tarunbhog, Ganjeikalli, Bishnubhog, Bansphool A dan Adamchini dari India (Amarawathi *et al.*, 2008, Sakthivel *et al.*, 2009). Hasil analisis lebih lanjut dan sekuensing DNA varietas-varietas khusus tersebut juga tidak mendapatkan adanya mutasi *badh2.7* (Sakthivel *et al.*, 2006, 2009) maupun mutasi *badh2.2* seperti pada beberapa varietas dari Cina (Shi *et al.*, 2008). Ketidakadaan delesi 8 bp *badh2.7* juga telah dilaporkan pada genotip aromatik yang lain (Kuo *et al.*, 2005, Navarro *et al.*, 2007). Analisis sekuen *badh2.7* dari 19 mutan padi aromatik, mendapatkan 6 mutan (SA0418, SA0766, SA0766.1, SA1613, R8_106A, dan TNG71) yang tidak mengandung delesi 8 bp (Kuo *et al.*, 2005). Hal ini menimbulkan spekulasi walaupun gen *badh2* dan delesi 8 bp pada *badh2.7* mengontrol pada kebanyakan varietas aromatik, namun tidak universal dan kemungkinan adanya gen lain pada varietas-khusus tersebut yang mengontrol aroma (Kuo *et al.*, 2005, Navarro *et al.*, 2007, Fitzgerald *et al.*, 2008,

Sakthivel *et al.*, 2009, Kovach *et al.*, 2009). Namun hasil pengamatan selama dilakukan penelitian ini diduga pada varietas-varietas khusus tersebut, serta kelompok 2 varietas aromatik Indonesia, mutasi terjadi pada *badh2.7* tetapi dengan pola yang berbeda. Oleh karena itu dilakukan sekuensing *badh2.7* varietas nonaromatik Ciherang, Mentik wangi yang mewakili kelompok 1, dan Pandan wangi yang mewakili kelompok 2. Selain untuk membuktikan dugaan tersebut, juga karena varietas khusus yang merupakan kelompok minor di luar negeri justru merupakan mayoritas tipe mutasi varietas aromatik Indonesia. Serta pada kondisi saat ini, seperti yang telah diuraikan, hanya Mentik Wangi dan Gunung Perak yang bisa digunakan untuk pengembangan varietas padi aromatik baru.

Perbandingan sekuen *badh2.7* Ciherang, Mentik wangi dan Pandan Wangi.

Badh2.7 varietas Ciherang, mentik Wangi, dan Pandan Wangi diisolasi melalui amplifikasi PCR menggunakan primer eksternal Bradbury, selanjutnya disekuensing (Macrogen Inc., Korea Selatan). Hasilnya (Gambar 1) membuktikan adanya delesi 4 bp pada Pandan Wangi, berbeda dengan Mentik Wangi (8 bp).

Hasil ini mendukung kebenaran dugaan tentang adanya tipe mutasi yang berbeda pada varietas padi aromatik khusus, dalam hal ini kelompok 2 varietas aromatik Indonesia. Bukan mutasi pada ekson lain (Fitzgerald *et al.*, 2008, Kovach *et al.*, 2009), atau adanya gen pengendali aroma yang lain (Kuo *et al.*, 2005, Navarro *et al.*, 2007, Amarawathi *et al.*, 2008, Fitzgerald *et al.*,

Tabel 1. Resume hasil analisis PCR dengan berbagai marka aromatik berbasis *badh2*.

Varietas	Aroma	Teramplifikasi/tidak dengan marka aromatik:			
		Bradbury	Badex7-5	FM-E7	FM-E2A
Nipponbare	tidak	ya	ya	ya	ya
Ciherang	tidak	ya	ya	ya	ya
IR64	tidak	ya	ya	ya	ya
Fatmawati	tidak	ya	ya	ya	ya
Taipei 309	tidak	ya	ya	ya	ya
Mentik Wangi	ya	ya*	ya*	ya*	ya
Gunung Perak	ya	ya*	ya*	ya*	ya
Rojo Lele	ya	ya	ya	ya	ya
Pandan Wangi	ya	ya	ya	ya	ya
Pulu Mandoti	ya	ya	ya	ya	ya
Pare Kembang	ya	ya	ya	ya	ya
Sintanur	ya	ya	ya	ya	ya
Gilirang	ya	ya	ya	ya	ya

Keterangan: *pola amplifikasi dapat dibedakan dari varietas nonaromatik

2008, Kovach *et al.*, 2009, Sakthivel *et al.*, 2009). Pada mutan aromatik yang diteliti oleh Kuo *et al.*, (2005), kemungkinan mutasinya terjadi pada *badh2.2* seperti pada varietas Cina, yang pada saat studi mutan aromatik belum ditemukan. Namun demikian pembuktian ini akan lebih valid lagi jika dilanjutkan dengan konstruksi marka aromatik baru. Penelitian terkait ini dalam inisiasi, diharapkan marka yang dihasilkan dapat mendeteksi varietas aromatik Indonesia kelompok 2 serta varietas-varietas khusus di luar negeri seperti disebutkan di atas, sehingga lebih berdaya guna dan berperan dalam membangun landasan keilmuan terkait aroma padi maupun memfasilitasi pengembangan varietas aromatik baru, terutama di Indonesia.

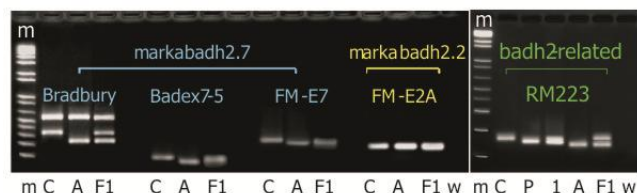
Ciherang	GGTaaAAAGATTATGGCTTCAGCTGCTCCTATG
Mentik Wangi	GGT- - - - - ATAT-ATTTCAGCTGCTCCTATG
Pandan Wangi	GGT- - AACCGCCATGGTCACCG-TGCT-CTATG

Gambar 1. Perbedaan sekuen *badh2.7* Ciherang, Mentik Wangi, dan Pandan Wangi

Profil PCR berbagai marka aromatik pada progeny persilangan

Untuk memberikan informasi tentang marka aromatik yang sesuai beserta kelebihan/kelemahannya pada pengembangan varietas aromatik baru di Indonesia, marka-marka berbasis *badh2.7* dan *badh2.2* dicobakan pada hasil persilangan (F1) varietas nonaromatik dengan aromatik. Hasilnya (Gambar 1) menunjukkan marka Bradbury (Bradbury *et al.*, 2005b) paling jelas perbedaannya. Marka Badex7-5, yang diarahkan agar ukuran amplicon pada sekitar 100 bp untuk memperjelas perbedaan 8 bp antara sampel nonaromatik dan aromatik (Sakthivel *et al.*, 2009) menggunakan agarosa konsentrasi tinggi (tidak menggunakan poliakrilamida), dapat membedakan sampel nonaromatik dan aromatik tetapi masih meragukan untuk penentuan heterozygote F1 hasil persilangan. Kasus yang sama juga ditemui pada penggunaan marka FM-E7 (Shi *et al.*, 2008). Sedang FM-E2A (Shi *et al.*, 2008), tidak mendeteksi perbedaan sampel nonaromatik, aromatik dan hasil persilangannya (F1). Perbedaan amplicon varietas nonaromatik, donor aromatik, dan hasil persilangan dapat terlihat dengan jelas pada penggunaan marka RM223 (Lang and Buu 2008), namun harus dipertimbangkan karena marka ini merupakan *badh2-related* yang masih berjarak dari gen *badh2*.

Berdasarkan hasil yang diperoleh penggunaan marka Bradbury jika donor aromatik yang digunakan Mentik Wangi atau Gunung Perak. Jika sampel yang di analisis tidak terlalu banyak dapat digunakan Badex7-5 atau FM-E7, tetapi menggunakan elektroforesis akrilamida menggunakan. Marka Bradbury telah diaplikasikan pada introgresi gen aroma Mentik Wangi ke Ciherang (Hami Seno *et al.*, 2009, 2010a), sedangkan RM223 pada introgresi gen aroma Pandan Wangi ke Ciherang (Hami Seno *et al.*, 2010b).



Gambar 1. Gambar 2. Profil PCR berbagai marka aromatik pada F1 hasil persilangan.

Keterangan :

C, A, dan F1 menunjukkan sampel padi nonaromatik, donor aroma (Mentik Wangi), dan hasil persilangannya. P=Pandan Wangi, 1=F1Ciherang-Pandan Wangi. Bradbury, Badex7-5, dan FM-E7 merupakan marka aromatik yang spesifik untuk *badh2.7*, sedangkan FM-E2A untuk *badh2.2*. m = size marker dan w = air (kontrol negatif).

Aroma merupakan karakter resesif, oleh karena itu tidak bisa digunakan marka dominan, harus marka kodominan. Ukuran InDel (4, 7, atau 8 bp) antara *badh2* termutasi pada varietas aromatik dan *badh2* utuh pada varietas nonaromatik menjadi kendala pada konstruksi marka aromatik kodominan. Berbagai cara telah dilakukan untuk mengatasi hal ini, diantaranya : penggunaan gel poliakrilamida (Shi *et al.*, 2008), mengarahkan ukuran amplicon pada sekitar 100 bp (Amarawathi *et al.*, 2008, Sakthivel *et al.*, 2009), atau menggunakan sistem multipleks (4 primer) (Bradbury *et al.*, 2005b); namun umumnya masih belum memuaskan, terutama terkait dengan sampel tanaman padi heterozygot. Kendala ini juga dialami pada karakter-karakter padi yang lain seperti toleransi genangan, kekeringan, maupun salinitas tinggi, namun karena toleransi-toleransi tersebut merupakan karakter dominan, masih dapat digunakan marka dominan (Xu *et al.*, 2004, Septiningsih *et al.*, 2009). Kit berbasis kombinasi nanoteknologi dengan *molecular beacon* (Marras *et al.*, 2003, Goel *et al.*, 2005, Wang *et al.*, 2008), yang dapat mendeteksi perbedaan 1 bp pada level nano- hingga

subnanomolar dapat menjadi alternatif yang menjajikan.

KESIMPULAN

Tidak ditemukan mutasi *badh2.2* pada varietas padi aromatik Indonesia, mutasi terjadi pada *badh2.7*. Paling sedikit terdapat 2 kelompok varietas padi aromatik Indonesia, yang dibedakan berdasarkan tipe mutasi *badh2.7*. Hasil sekuensing mendapatkan pola mutasi *badh2.7* Mentik Wangi mengikuti pola umum varietas aromatik di berbagai Negara (delesi 8 bp), sedangkan pada Pandan wangi berbeda (delesi 4 bp). Hanya kelompok 1 yang dapat teridentifikasi oleh marka aromatik berbasis *badh2* yang tersedia pada saat ini. Marka terkait *badh2* RM223 dapat mengidentifikasi varietas aromatik kelompok 1 (Mentik Wangi) maupun 2 (Pandan Wangi).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis beserta tim peneliti mengucapkan terima kasih kepada Kementrian Riset dan Teknologi, 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 asisten peneliti dan teknisi (Bambang Padmadi SSi, Dewi Praptiwi SSi, Rudy Munzirwan SSi, Joel Rivandi Sinaga SSi, Sugihartati, SSi, Euis Marlina SSi, Taufiq) 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 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.
- 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.
- Goel G, A. Kumar A, Puniya1 AK, Chen W and Singh K (2005) Molecular beacon: a multitask probe. *J. Appl. Microbio.* 99: 435–442
- Kovach M J, Calingacion M N, Fitzgerald M A, and McCouch S R (2009) The origin and evolution of fragrance in rice (*Oryza sativa* L.). *PNAS* 106:14444-14449.
- 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
- Hami Seno, DS, Santoso TJ, Trijatmiko 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*, 5: 678-688. ISBN : 978-8853-03-3, 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*.
- Hami Seno DS, Santoso TJ, Hasan AEZ, Kusbiantoro B, Mas'ud ZA (2010) Aplikasi marka RM223 pada introduksi aroma pandan wangi ke varietas nonaromatik ciherang. Prosiding Seminar Hasil-Hasil Penelitian IPB 2010, *in press*.
- Lang NT dan Bu BC (2008) Development of PCR-based markers for aroma (*fgf*) 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.
- Marras SAE, Kramer FR and Tyagi S (2003) Genotyping single nucleotide polymorphisms with molecular beacons. In Kwok, P. Y. (ed.), Single nucleotide polymorphisms: methods and protocols. The Humana Press Inc., Totowa, NJ, Vol. 212, pp. 111-128.
- 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 aromatik and non aromatik 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.
- Qiu ZJ, Zhang YS (2003) Why fragrance rice produced in Thailand can be sold worldwide? *World Agric (China)* 2:33-36
- Reinke RF, Welsh LA, Reece JE, Lewin LG and Blakeney AB (1991) Procedures for quality selection of aromatik 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
- Septiningsih *et al.*, 2009. Development of submergence tolerant rice cultivars: The *Sub1* locus dan beyond. *Annals of Botany* 103:151-160.
- 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. Fedoroff (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 aromatik and nonaromatik 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 aromatik 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-aromatik to aromatik rice (*Oryza sativa* L.) Proceedings of the 1.sup.st International Conference on Rice for the Future, p. 105.
- Wang K, Tang Z, Yang CJ, Kim Y, Fang X, Li W, Wu Y, Medley CD, Cao Z, Li J, Colon P, Lin H, and Tan W (2008) Molecular Engineering of DNA:

Molecular Beacons. Wiley-VCH Verlag, GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Angew. Chem. Int. Ed., 47: 2 – 17. DOI: 10.1002/anie.200800370

- 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.
- Xu K, Deb R, Mackill DJ (2004) A microsatellite Marker and a Codominant PCR-Based Marker for Marker-assisted selection of Submergence Tolerance in Rice. *Crop Sci.* 44:248–253.
- 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.