

ULASAN

Pemanfaatan Markah Molekuler dalam Proses Seleksi Pemuliaan Tanaman

Muhammad Azrai

Balai Penelitian Tanaman Serealia, Jalan Dr. Ratulangi No. 274, Maros

ABSTRACT

Application of Marker-Assisted Selection in Crop Breeding. Muhammad Azrai. DNA-based technology has dramatically enhanced the efficiency of plant breeding, especially when selections are to be done under unfavourable conditions. Although significant strides have been made in crop improvement through phenotypic selections for ergonomically important traits, this often encounters considerable difficulties, particularly those posed by genotype x environment interactions. Besides testing procedure may be many times difficult, unreliable or expensive due to the nature of the target traits (e.g. abiotic and biotic stresses) or the target environment. The most widespread use of Marker Assisted Selection (MAS) to date is to assist backcrossing of major gene already proven elite cultivars. If individual genes or Quantitative Trait Loci (QTL) significantly influencing specific target traits can be identified based on their linkage to molecular markers, the efficiency of incorporating the desired traits in elite germplasm could be greatly enhanced. By combining QTL approach with backcrossing, useful genes that control quantitative traits have been identified in plant germplasm that are not for agriculture and have successfully been transferred to danced breeding lines. Indonesian molecular breeders should have a research program on DNA marker work that leads to application of useful selection tools and valuable germplasm. As molecular breeders adopt more rigorous experimental guidelines and ambitious goals, they also need to integrate the growing body of knowledge from genomics and bioinformatics.

Key words: DNA markers, selection, crops breeding.

PENDAHULUAN

Kebutuhan pangan dunia semakin meningkat seiring dengan semakin pesatnya pertumbuhan penduduk dan perkembangan industri pakan dan pangan. Namun demikian, pada kenyataannya produsen pangan tidak mampu memenuhi kebutuhan konsumen yang semakin meningkat dan beragam. Upaya yang sedang dilakukan untuk menjawab permasalahan pangan tersebut adalah dengan mengintensifkan kegiatan pemuliaan. Pemuliaan tanaman merupakan suatu metode yang mengeksplorasi potensi genetik tanaman untuk memaksimalkan ekspresi dari potensi ge-

netik tanaman pada suatu kondisi lingkungan tertentu (Guzhov 1989; Stoskopf *et al.* 1993). Tujuan pemuliaan tanaman adalah memaksimalkan potensi genetik tanaman melalui perakitan kultivar unggul baru yang berdaya hasil dan berkualitas tinggi, resisten terhadap kendala biotik dan abiotik (Shivanna dan Sawhney 1997; Mayo 1980). Walaupun teknologi pemuliaan konvensional telah terbukti berhasil meningkatkan produksi tanaman dan mampu memenuhi pangan penduduk bumi saat ini, namun pemuliaan konvensional memiliki keterbatasan, terutama dalam hal waktu yang diperlukan untuk mengintrogressikan gen-gen yang diinginkan. Selain itu, jumlah genotipe yang harus ditangani, terutama pada saat awal seleksi sangat banyak sehingga tenaga kerja yang dibutuhkan juga banyak. Teknologi maju diperlukan untuk mengatasi keterbatasan penerapan teknik pemuliaan konvensional dan mempercepat pencapaian tujuan akhir suatu program pemuliaan. Hal ini sangat penting dan mendesak dilakukan untuk mengatasi permasalahan-permasalahan pangan di masa yang akan datang.

Pemecahan kendala dalam pemuliaan konvensional mulai mendapat titik terang dengan ditemukannya markah molekuler. Markah molekuler yang pertama kali dikenal adalah markah protein yang secara genetik dikenal sebagai markah isozim (Hunter dan Markert 1957). Meskipun markah ini telah banyak digunakan dalam analisis genetik tanaman, namun dalam perkembangannya, markah isozim masih sangat terbatas jumlahnya. Selain itu, beberapa sistem enzim tertentu dipengaruhi oleh regulasi perkembangan jaringan, yaitu hanya mengekspresikan suatu sifat pada jaringan tertentu. Kedua faktor tersebut merupakan kendala utama penggunaan markah isozim dalam mengeksplorasi potensi genetik tanaman (Hamrick dan Gode 1989).

Dengan semakin berkembangnya ilmu pengetahuan, maka pada awal tahun 1980-an ditemukan teknologi molekuler yang berbasis pada DNA. Markah molekuler tersebut dapat menutupi kekurangan dari markah isozim, karena jumlah yang tidak terbatas dan dapat melingkupi seluruh genom tanaman, tidak di-

pengaruhi oleh regulasi perkembangan jaringan, sehingga dapat dideteksi pada seluruh jaringan, dan memiliki kemampuan yang sangat tinggi dalam menangkap keragaman karakter antar individu (Smith dan Smith 1992).

Pemanfaatan markah DNA sebagai alat bantu seleksi *Marker Assisted Selection* (MAS) lebih menguntungkan dibandingkan dengan seleksi secara fenotipik. Seleksi dengan bantuan markah molekuler didasarkan pada sifat genetik tanaman saja, tidak dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Dengan demikian, kegiatan pemuliaan tanaman menjadi lebih tepat, cepat, dan relatif lebih hemat biaya dan waktu. Seleksi berdasarkan karakter fenotipik tanaman di lapang memiliki beberapa kelemahan seperti yang disarikan oleh Lamadji *et al.* (1999), di antaranya (1) memerlukan waktu yang cukup lama, (2) kesulitan memilih dengan tepat gen-gen yang menjadi target seleksi untuk diekspresikan pada sifat-sifat morfologi atau agronomi, (3) rendahnya frekuensi individu yang diinginkan yang berada dalam populasi seleksi yang besar, dan (4) fenomena pautan gen antara sifat yang diinginkan dengan sifat tidak diinginkan sulit dipisahkan saat melakukan persilangan.

Berdasarkan uraian di atas, tulisan ini membahas secara sekilas markah DNA yang banyak digunakan oleh peneliti untuk perbaikan tanaman mulai dari pengenalan tipe markah hingga contoh kasus penggunaan markah DNA sebagai alat bantu seleksi. Dari bahasan tersebut akan tergambar prospek dan tantangan pemanfaatan markah molekuler dalam pemuliaan tanaman.

MARKAH DNA

Seiring dengan semakin berkembangnya teknologi yang berbasis markah DNA, maka saat ini telah ditemukan tiga tipe markah DNA dengan segala kelebihan dan kekurangan masing-masing. Ketiga tipe markah DNA tersebut adalah (1) markah yang berdasarkan pada hibridisasi DNA seperti *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP); (2) markah yang berdasarkan pada reaksi rantai polimerase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) dengan menggunakan sekuen-sekuen nukleotida sebagai primer, seperti *Randomly Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), dan *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP); dan (3) markah yang berdasarkan pada PCR dengan menggunakan primer yang menggabungkan sekuen komplementer spesifik dalam DNA sasaran, seperti *Sequence Tagged Sites* (STS), *Sequence Characterized Amplified Regions*

(SCARs), *Simple Sequence Repets* (SSRs) atau mikrosatelit (*microsatellites*), dan *Single Nucleotide Polymorphism* (SNPs).

RFLP

Analisis RFLP merupakan suatu prosedur hibridisasi Southern (Bostein *et al.* 1980). Variasi (polimorfisme) dideteksi berdasarkan hibridisasi diferensial DNA yang diklon untuk fragmen DNA dalam suatu sampel enzim restriksi yang memotong DNA. Markah-markah RFLP didefinisikan sebagai suatu kombinasi dari probe enzim spesifik. Sumber utama probe untuk memetakan RFLP pada tanaman adalah klon-klon cDNA dan *PstI* dari klon-klon genom (Tanskey *et al.* 1982). Markah ini bersifat kodominan, sehingga sangat baik untuk komparatif pemetaan genom. Namun demikian, markah RFLP memiliki keterbatasan jika digunakan sebagai alat bantu seleksi. Hal ini disebabkan oleh beberapa faktor, di antaranya (1) pada beberapa spesies tingkat polimorfisme DNA-nya sangat rendah, (2) menyita banyak tenaga dan waktu, (3) kuantitas dan kualitas DNA yang diperlukan sangat tinggi, (4) prosedur hibridisasinya rumit, sehingga menyulitkan otomatisasi, dan (5) memerlukan pustaka probe untuk spesies-spesies tanaman yang belum pernah dieksplorasi sebelumnya (Prasanna 2002).

RAPD

Prinsip kerja markah RAPD adalah berdasarkan perbedaan amplifikasi PCR pada sampel DNA dari sekuen oligonukleotida pendek yang secara genetik merupakan kelompok markah dominan (Williams *et al.* 1990; Welsh dan McClelland 1990). Primer RAPD bersifat random dengan ukuran panjang biasanya 10 nukleotida. Jumlah produk amplifikasi PCR berhubungan langsung dengan jumlah dan orientasi sekuen yang komplementer terhadap primer di dalam genom tanaman.

Keunggulan dari teknik analisis menggunakan markah RAPD di antaranya adalah (1) kuantitas DNA yang dibutuhkan sedikit, (2) hemat biaya, (3) mudah dipelajari, dan (4) primer yang diperlukan sudah banyak dikomersialisasikan sehingga mudah diperoleh. Kelemahan teknik ini antara lain (1) tingkat reproduktibilitas pola markah dari laboratorium ke laboratorium berbeda dan antara hasil percobaan dalam laboratorium itu sendiri yang sama, (2) sangat sensitif terhadap variasi dalam konsentrasi DNA, dan (3) memerlukan konsentrasi primer dan kondisi siklus suhu yang optimal pada saat pengujian. Selain itu, markah RAPD dominan dan tidak mampu menampilkan perbedaan sekuen DNA yang homolog, di antara

fragmen-fragmen yang ukurannya hampir sama (Riedy *et al.* 1992).

SCAR dan STS

Markah SCAR dan STS merupakan markah berbas PCR yang diperoleh melalui sekuensing fragmen RFLP, RAPD, dan AFLP atau gen yang sudah diketahui ukurannya. Primer SCAR memiliki panjang 18-25 nukleotida. Reproduksiabilitas dan kegunaan markah SCAR jauh lebih tinggi dibandingkan dengan markah RAPD. Meskipun markah SCAR secara genetik bersifat kodominan, namun dapat dikonversi menjadi markah kodominan melalui pemotongan dengan menggunakan enzim restriksi. Markah STS dapat digunakan dalam pemetaan genetik, bersifat kodominan, dan menghasilkan amplifikasi yang stabil dan berulang-ulang. Teknik STS mudah diadopsi dan diterima dalam hal otomatisasi, tetapi keterbatasannya belum banyak ditemukan karena markah STS polimorfik pada tanaman budidaya.

Mikrosatelit atau SSR

Markah mikrosatelit merupakan sekuens DNA yang bermotif pendek dan diulang secara tandem dengan 2 sampai 5 unit nukleotida yang tersebar dan meliputi seluruh genom, terutama pada organisme eukariotik. Akhir-akhir ini, mikrosatelit banyak digunakan untuk karakterisasi dan pemetaan genetik tanaman, di antaranya jagung, padi, anggur, kedelai, jawawut, gandum, dan tomat (Gupta *et al.* 1996; Powell *et al.* 1996). Pasangan primer mikrosatelit (*forward* dan *reverse*) diamplifikasi dengan PCR berdasarkan hasil konservasi daerah yang diapit (*flanking-region*) markah untuk suatu gen pada kromosom. Menurut Powell *et al.* (1996), beberapa pertimbangan untuk penggunaan markah mikrosatelit dalam studi genetik di antaranya (1) markah terdistribusi secara melimpah dan merata dalam genom, variabilitasnya sangat tinggi (banyak alel dalam lokus), sifatnya kodominan dan lokasi genom dapat diketahui; (2) merupakan alat uji yang memiliki reproduksiabilitas dan ketepatan yang sangat tinggi; (3) merupakan alat bantu yang sangat akurat untuk membedakan genotipe, evaluasi kemurnian benih, pemetaan, dan seleksi genotip untuk karakter yang diinginkan; (4) studi genetik populasi dan analisis diversitas genetik. Kelemahan teknik ini adalah markah SSR tidak tersedia pada semua spesies tanaman, sehingga untuk merancang primer baru membutuhkan waktu yang lama dan biaya yang cukup mahal.

AFLP

Markah AFLP merupakan jenis markah yang berdasarkan pada amplifikasi selektif dari potongan DNA hasil restriksi genomik total dengan enzim restriksi endonuklease. Hasil amplifikasi tersebut dipisahkan dengan elektroforesis, kemudian divisualisasi dengan menggunakan otoradiografi atau pewarnaan perak (*silver staining*) (Vos *et al.* 1995). Sebenarnya markah ini mirip markah RAPD, tetapi primernya spesifik dan jumlah pitanya lebih banyak. Markah AFLP dikategorikan sebagai markah kodominan, walaupun pada kenyataannya seringkali diperlakukan sebagai markah dominan. Hal ini diakibatkan sulitnya membedakan intensitas pita antara dominan homozigot dari heterozigot (Setiawan *et al.* 2000).

Keunggulan teknik AFLP menurut Vos *et al.* (1995), antara lain (1) tidak memerlukan informasi sekuens dari genom dan perangkat (*kit*) oligonukleotida yang sama ketika dilakukan analisis dan dapat diaplikasikan pada semua spesies tanaman; (2) hasil amplifikasinya stabil, tingkat pengulangan dan variabilitasnya sangat tinggi; (3) memiliki efisiensi yang sangat tinggi dalam pemetaan lokus, karena sekali amplifikasi dapat meliputi beberapa lokus; (4) dapat digunakan untuk menganalisis sidik jari semua DNA dengan mengabaikan kompleksitas dan asal usulnya; (5) dapat bertindak sebagai jembatan antara peta genetik dan peta fisik pada kromosom. Keterbatasan dari teknik AFLP adalah cara aplikasinya relatif lebih rumit, sehingga memerlukan waktu lebih lama, keterampilan khusus, serta pengadaan alat dan bahan sangat mahal.

SNP

Markah SNP dapat dikategorikan sebagai 'markah generasi ketiga'. Markah ini merupakan mutasi titik di mana satu nukleotida disubstitusi oleh nukleotik lain pada lokus tertentu. SNP merupakan tipe yang lebih umum untuk membedakan sekuens di antara alel, kodominan di alam, dan menandakan markah polimorfik dari suatu sumber yang tidak pernah habis untuk penggunaannya pada resolusi tinggi dalam pemetaan genetik suatu karakter. Deteksi markah SNP bersifat kodominan, berdasarkan pada amplifikasi primer yang berbasis pada informasi sekuens untuk gen spesifik. Uji dengan markah SNP dapat dilakukan pada tanaman seperti padi dan jagung yang informasi genomnya sudah cukup lengkap (Phillips dan Vosil 1994).

Keunggulan teknik SNP adalah lebih mudah diaplikasikan dibandingkan dengan teknik SSR atau AFLP serta lebih bermanfaat ketika beberapa lokus SNP posisinya sangat berdekatan, sehingga dapat

mendefinisikan haplotipe dan dalam pengembangan *haplotype tags*. Kelemahan dari teknik SNP adalah memerlukan informasi sekuen untuk suatu gen yang menjadi target analisis dan untuk pengadaan alat dan bahan memerlukan biaya yang sangat tinggi (Deorge dan Churcill 1996).

PERTIMBANGAN DALAM MEMILIH MARKAH MOLEKULER UNTUK MAS

Pada uraian sebelumnya telah dijelaskan secara ringkas beberapa markah yang sering digunakan oleh peneliti dalam kegiatan analisis molekuler dengan semua kelebihan dan kekurangannya. Pemilihan teknik molekuler yang tepat disesuaikan dengan materi genetik yang akan digunakan, jenis studi genetik, dan tujuan yang ingin dicapai. Selain itu, ketersediaan alat yang dimiliki suatu laboratorium dan dana yang tersedia merupakan hal utama yang harus dipertimbangkan sebelum memilih markah yang sesuai.

Keberhasilan penggunaan suatu markah penyelesaian dalam kegiatan pemuliaan bergantung pada tiga syarat utama yang harus dipenuhi, yaitu (1) peta genetik dengan jumlah markah polimorfik yang cukup memadai, sehingga dapat mengidentifikasi QTL atau gen-gen mayor sasaran dengan akurat, (2) markah ter-kait erat antara QTL atau gen mayor target pada peta genetik yang sudah dikonstruksi, dan (3) kemampuan menganalisis sejumlah besar tanaman dalam waktu dan biaya secara efektif.

Saat ini, markah DNA yang banyak digunakan dalam program pemuliaan terutama adalah AFLP, SSRs, dan *Expressed Sequence Tags* (ESTs). Masing-masing markah tersebut mempunyai kelebihan dan keterbatasan seperti yang telah diutarakan. Walaupun masih terbatas penggunaannya pada tanaman, penggunaan SNP mampu mempercepat pengembangan markah untuk analisis sidik jari plasma nutfah, sebagai alat bantu seleksi, terutama pada metode silang balik. Peluang pengembangan teknologi markah DNA secara umum sangat tinggi sebagai alat bantu baru pada kegiatan genotipik untuk pemetaan genetik dan penggunaan markah sebagai alat bantu pemuliaan dan perlin-dungan plasma nutfah tanaman.

APLIKASI MAS PADA PEMULIAAN TANAMAN

Dalam konteks MAS, markah berbasis DNA dapat menjadi efektif jika digunakan untuk tiga tujuan dasar, yaitu (1) identifikasi galur-galur tetua dengan tepat untuk perbaikan suatu karakter untuk tujuan khusus, (2) penelusuran alel-alel yang sesuai (*favorable*) dominan atau resesif pada tiap generasi persilangan, dan (3) identifikasi individu-individu sasaran sesuai

dengan karakter yang diinginkan di antara turunan yang berse-gregasi, berdasarkan pada komposisi alelik persilangan sebagian atau seluruh genom.

MAS PADA GALUR-GALUR TETUA UNTUK PERBAIKAN SUATU KARAKTER

Analisis genetik dengan memanfaatkan markah molekuler dapat digunakan untuk mengestimasi jarak genetik di antara materi genetik yang dievaluasi. Selain itu, plasma nutfah yang berbeda dalam ekspresi untuk suatu karakter spesifik, sebagai contoh resistensi pe-nyakit karat pada gandum dapat dikarakterisasi pada lokus spesifik yang telah diketahui pengaruhnya pada karakter tersebut. Dengan fasilitas ini, dapat diidentifikasi galur-galur yang komposisi aleliknya lebih sesuai pada lokus yang mengendalikan karakter target. Analisis sidik jari pada galur tetua harapan dapat dijadikan sebagai sumber informasi dalam merencanakan program pemuliaan untuk membuat segregasi baru melalui persilangan. Walaupun informasi yang diberikan oleh markah molekuler bukan merupakan jaminan untuk dapat mengidentifikasi dengan tepat pasangan persilangan yang memiliki peluang besar untuk menghasilkan produk sesuai dengan karakter target, tetapi minimal dapat membantu mengurangi jumlah persilangan atau segregasi turunan yang diperlukan untuk evaluasi lebih lanjut. Peningkatan efisiensi pemuliaan dapat lebih nyata melalui seleksi terarah dari galur-galur berdasarkan pada kombinasi antara data fenotipik dan data molekuler.

PENELUSURAN ALEL-ALEL YANG DIINGINKAN PADA SETIAP GENERASI PERSILANGAN

Akhir-akhir ini, penggunaan markah molekuler untuk menelusuri keberadaan gen-gen sasaran semakin meningkat seperti halnya dengan percepatan pemuliaan tetua *recurrent (background selection)* pada program silang balik. Holland (2005) mengemukakan bahwa penggunaan markah sebagai alat bantu silang balik (*Marker Assisted Back Crossing*, MAB) telah berhasil meningkatkan efisiensi pemuliaan metode silang balik melalui tiga cara, yaitu (1) jika fenotipe tetua yang mengandung gen target tidak mudah diamati, maka turunan silang balik yang terdeteksi dengan markah dari tetua donor pada lokus yang berdekatan atau di dalam gen target yang diseleksi mempunyai peluang keberhasilan yang besar untuk membawa gen tersebut, (2) markah juga dapat digunakan untuk

me-nyeleksi turunan silang balik yang mempunyai porsi genom non-target lebih besar yang berasal dari plasma nutfah tetua donornya, dan (3) markah dapat diguna-kan untuk menyeleksi progeni langka yang menghasil-kan rekombinasi gen yang berdekatan dengan gen tar-get, sehingga peluang terjadinya efek pautan yang ti-dak diinginkan ikut bersama gen target (*linkage drag*).

Pemisahan gen-gen resesif melalui pemuliaan konvensional memerlukan tambahan generasi silang diri pada setiap generasi silang balik. Hal ini menghambat kegiatan pemuliaan untuk tujuan komersialisasi. Penggunaan markah sebagai alat bantu seleksi untuk menelusuri gen target secara efektif seperti yang ditemukan oleh Melchinger (1990), yaitu introgressi gen-gen oligogenic untuk ketahanan tanaman terha-dap penyakit. Kegiatan ini dilakukan berdasarkan pen-dekatan dengan memperhatikan jumlah minimum individu-individu dan ukuran famili yang diperlukan dalam setiap generasi silang balik. Namun demikian, jika markah-markah alel spesifik belum ada, maka pe-luang penerapannya pada kasus lain dalam program pemuliaan tanaman masih terbatas. Suatu contoh ke-berhasilan yang telah dicapai dari pemanfaatan mar-kah adalah konversi galur-galur jagung normal menja-di jagung berkualitas protein tinggi menggunakan mar-kah molekuler alel spesifik untuk memindahkan suatu alel mutan resesif *opaque-2* (Yang *et al.* 2004).

Penggunaan markah sebagai alat bantu *background selection* pemulihan tetua *recurrent* pada pemuliaan silang balik merupakan strategi pemuliaan yang telah digunakan secara ekstensif dalam program pemuliaan jagung komersial, terutama untuk menyeleksi galur pembawa gen toleransi terhadap herbisida dan ketahanan terhadap serangga (Ragot *et al.* 1995). Beberapa parameter seperti persentase pindah silang, ekspresi gen yang diwariskan dari tetua donor dan komposisi alel-alel baik dari tetua silang balik sangat diperlukan untuk optimalisasi program *background selection*. *Flanking* markah untuk alel target diperlukan untuk memindahkan pautan gen yang tidak diinginkan. Seleksi secara intensif dapat digunakan mengop-timalisasi jarak antara gen target dan *flanking*. Metode ini sangat berguna untuk menentukan jumlah tanam-an silang balik yang diperlukan untuk diregenerasi dan diaklimatisasi dengan set *flanking* markah tertentu (Hospital dan Charcosset 1997).

MAS UNTUK PERBAIKAN KARAKTER KUALITATIF

Karakter kualitatif adalah jika ekspresi suatu karakter sasaran dikendalikan oleh satu gen atau beberapa gen yang bertanggung jawab penuh terhadap terjadinya variasi fenotipe pada karakter tersebut. Introgressi gen (genom) spesifik dari galur donor ke galur penerima melalui metode silang balik dapat berperan untuk memperbaiki karakter sasaran secara nyata. Metode ini telah banyak digunakan pada seleksi secara konvensional, namun waktu yang dibutuhkan cukup lama untuk mengintrogressikan gen tunggal dominan resesif (Allard 1960).

Perencanaan program pemuliaan dengan metode silang balik secara konvensional menggunakan asumsi bahwa proporsi genom tetua *recurrent* dipulihkan dengan laju $1 - \sqrt{2}^t + 1$ untuk masing-masing generasi t pada silang balik. Dengan demikian, setelah empat kali silang balik diperkirakan pemulihan genom tetua *recurrent* sebesar 96,9%. Beberapa progeni silang balik spesifik bagaimanapun akan menyimpang dari harapan dalam kaitannya dengan peluang dan pautan antara gen dari tetua donor yang terseleksi untuk gen yang berdekatan. Sebagai contoh adalah introgressi gen *tm-2* untuk ketahanan penyakit pada tanaman tomat (Young dan Tanksley 1989). Gen tersebut diintrogressikan dari kerabat liar tomat (*Lycopersicon peruvianum*) ke kultivar tomat komersial melalui pemuliaan silang balik. Mereka menemukan bahwa kultivar yang dikembangkan dengan 20 generasi silang balik memiliki segmen yang diintrogressikan sebesar 4 cM, sedangkan kultivar yang dikembangkan melalui 11 generasi silang balik masih mengandung seluruh le-ngan kromosom yang membawa gen dari tetua donor. Selain itu, untuk memindahkan gen dominan tunggal diperlukan paling sedikit enam generasi silang balik, sedangkan untuk gen resesif tunggal selain memerlu-kan enam generasi silang balik juga perlu ditambah dengan enam generasi silang diri untuk memulihkan 99% genom tetua *recurrent*. Prosedur ini memerlukan waktu terlalu lama, sehingga sangat sulit berkompetisi dengan program pemuliaan modern untuk pemben-tukan hibrida, karena kultivar hibrida memiliki perpu-taran waktu yang sangat cepat.

Berikut ini diuraikan dua kasus dalam program pemuliaan molekuler yang berhasil untuk perbaikan karakter kualitatif.

Perbaikan Ketahanan Tanaman Kedelai terhadap Netamotoda Kista (Cyst Nematoda, *Heterodera glycine*)

Seleksi di rumah kaca membutuhkan tenaga kerja, waktu, dan tempat yang banyak, dengan tingkat

akurasi data yang rendah, karena peluang terjadinya lolos (*escape*) cukup besar. Jika penyaringan dilakukan dengan menggunakan markah, maka pekerjaan menjadi lebih efisien dengan tingkat akurasi sangat tinggi. Penyaringan dengan markah untuk ketahanan kedelai terhadap penyakit telah berhasil dilakukan setelah ditemukan markah mikrosatelit (SSR) yang berasosiasi kuat dengan gen *rghl* yang responsif terhadap ketahanan tanaman kedelai terhadap *H. glycine* (Mudge *et al.* 1997). Markah SSR *sat309* yang berlokasi 1-2 cM dari gen *rghl* secara ekstrim efektif untuk menyaring populasi kedelai pemuliaan (Cregan *et al.* 2000). Seleksi secara genotipik dengan menggunakan markah SSR *sat309* dapat memprediksi galur-galur rentan dengan tingkat akurasi 99%.

Pemuliaan untuk Perbaikan Kandungan Protein pada Jagung (QPM)

Pemuliaan yang bertujuan untuk perbaikan mutu protein pada jagung *Quality Protein Maize* (QPM) telah dilakukan secara intensif setelah Mertz *et al.* (1964) menemukan mutan jagung berbiji opak yang mengandung lisin tinggi yang diatur oleh gen *opaque-2*. Gen *opaque-2* yang meningkatkan kadar lisin dan triptofan pada endosperma jagung telah dimanfaatkan untuk menghasilkan QPM. Pada awal kegiatan pemuliaan, jagung yang mengandung gen *opaque-2* memiliki endosperma yang lunak sehingga menyulitkan proses pengeringan dan rentan terhadap penyakit. Setelah melalui serangkaian penelitian yang cukup panjang, pemuliaan dengan metode silang balik konvensional telah berhasil memindahkan gen *opaque-2* ke dalam jagung biasa, sehingga menghasilkan lisin dan triptofan dua kali lipat dan endosperma yang keras (Vasal 2001).

Meskipun prosedur pemuliaan konvensional telah berhasil mengubah kultivar jagung komersial menjadi varietas QPM sintetik, intrograsi *opaque-2* bersama dengan *modifiers* endosperma ke dalam

galur elit melalui pemuliaan konvensional cukup rumit, karena terdapat tiga faktor pembatas utama, yaitu (1) pada setiap generasi persilangan memerlukan enam gene-rasi silang balik dan setiap generasi silang balik memerlukan silang diri untuk mengidentifikasi gen resesif *opaque-2*, (2) selain memerlukan pemeliharaan gen *opaque-2* homozigot, jumlah *modifiers* yang harus di-seleksi cukup banyak, dan (3) pengujian biokimia se-cara tepat diperlukan untuk memastikan kadar lisin dan triptofan dalam materi hasil seleksi dari setiap generasi pemuliaan. Untuk mengatasi kendala tersebut, peneliti CIMMYT telah berhasil mengembangkan kombinasi teknologi yang inovatif berdasarkan markah SSR terhadap alel *opaque-2*, sehingga terjadi efisiensi waktu dan biaya untuk mengkonversikan galur jagung normal menjadi QPM. Tiga markah SSR telah diidentifikasi pada kromosom 7, *bin 7.01* yang memiliki hubungan erat dengan gen *opaque-2*, yaitu *phi057*, *phi 112*, dan *umc1066* (CIMMYT 2002). Dengan pemanfaatan markah SSR tersebut, maka waktu yang diperlukan untuk memulihkan tingkat genom tetua *recurrent* hanya tiga generasi silang balik secara berturut-turut yang setara dengan enam generasi silang balik pada seleksi secara konvensional. Tingkat kesalahan untuk merekombinasikan antar gen-gen target dan pautan markah juga dapat dikurangi selama markah SSR dapat mendeteksi gen target itu sendiri. Selain itu, pengujian biokimia secara rutin untuk mendeteksi keberadaan gen *opaque-2* pada setiap generasi tidak diperlukan lagi. Dengan ditemukannya MAS yang berdasarkan markah SSR, maka konversi galur jagung normal menjadi QPM menjadi cukup sederhana, cepat, akurat, serta efisien dari segi biaya dan waktu (Dreher *et al.* 2000).

Tagging dan Pyramiding Gen

Tagging dan pyramiding gen dengan markah molekuler telah digunakan sebagai alat bantu penelu-

Tabel 1. Daftar gen ketahanan terhadap penyakit tanaman yang dapat diidentifikasi dengan markah DNA.

No. Penyakit	Patogen	Gen ketahanan	Markah	Pustaka
1. Gosong bengkak pada gandum (<i>loose smut of wheat</i>)	<i>Ustilago segatium tritici</i>	<i>T 10</i>	SCAR	Procunier <i>et al.</i> (1997)
2. Embun tepung pada tomat (<i>powdery mildew of tomato</i>)	<i>Leveillula taurica</i>	<i>Lv</i>	RAPD	Chunwongse <i>et al.</i> (1997)
3. Nematode kentang (<i>potato</i>)	<i>Globodera pallida</i>	<i>Gpa2</i>	AFLP	Roupe <i>et al.</i> (1997)
4. Kudis apel (<i>apple scab</i>)	<i>Venturia inaequalis</i>	<i>Vf</i>	RAPD	Tartarini <i>et al.</i> (1998)
5. Blas pada padi (<i>rice blast</i>)	<i>Magnaporthe grisea</i>	<i>Pi 44(t)</i>	RFLP	Chen <i>et al.</i> (1999)
6. Antrak pada kacang-kacangan (<i>bean anthracnose</i>)	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	<i>Co4</i>	RAPD	Arruda <i>et al.</i> (2000)
7. Virus mosaik gandum (<i>barley mild mosaic virus</i>)	<i>BaMMV</i>	<i>Ryma9</i>	STS	Werner <i>et al.</i> (2000)
8. Karat daun (<i>leaf rust of barley</i>)	<i>Puccinia hordei</i>	<i>Rph7</i>	RFLP	Graner <i>et al.</i> (2000)
9. Virus kuning lobak cina (<i>turnip yellow virus</i>)	<i>TuYV</i>	<i>QTLs</i>	AFLP	Dreyer <i>et al.</i> (2001)
10. Embun tepung gandum (<i>powdery mildew of wheat</i>)	<i>Erysiphe graminis tritici</i>	<i>Pm24</i>	RFLP	Huang <i>et al.</i> (2000)
11. Karat daun gandum (<i>leaf rust of wheat</i>)	<i>Puccinia graminis tritici</i>	<i>Lr47</i>	RAPD	Helguera <i>et al.</i> (2000)

Sumber: Sharma (2002).

suran dan seleksi. *Tagging* gen merupakan cara cepat untuk mengidentifikasi markah yang terpaut kuat dengan suatu karakter, terutama gen ketahanan terhadap penyakit seperti blas dan hawar daun bakteri pada padi dan karat daun pada gandum dengan pendekatan analisis segregasi bulk (*Bulk Segregation Analysis*, BSA). Beberapa gen ketahanan yang telah di-*tagging* dengan markah molekuler disajikan pada Tabel 1. Setelah mengidentifikasi markah yang terpaut kuat dengan karakter yang diinginkan, kegiatan dilanjutkan dengan aplikasi markah tersebut sebagai alat bantu seleksi silang balik (MAB) untuk memindahkan gen target kultivar komersial.

MAS UNTUK PERBAIKAN KARAKTER KUANTITATIF

Sebagian besar karakter agronomi penting tanaman sangat kompleks dan dikendalikan oleh beberapa gen. Ketidakterpautan karakter sederhana yang dikendalikan oleh satu atau beberapa gen mayor mengakibatkan perbaikan karakter poligenik melalui MAS menjadi sangat rumit. Kesulitan memanipulasi karakter kuantitatif yang berhubungan dengan karakter genetik yang kompleks adalah karena ekspresinya melibatkan banyak gen, sementara itu efek dari setiap gen terhadap penampilan fenotip tanaman kecil. Selain itu, interaksi antar gen-gen (epistasis) juga merupakan faktor penghambat dalam memanipulasi karakter kuantitatif. Dengan demikian, beberapa lokasi genom yang harus dimanipulasi pada waktu yang sama untuk mendapatkan pengaruh yang nyata pada suatu lokasi genom pada individu tanaman meskipun tidak mudah dilakukan. Pada kasus ini, reposisi pengujian lapang diperlukan untuk mengkarakterisasi efek QTL secara akurat dengan cara menguji stabilitasnya pada beberapa lingkungan yang berbeda di tahun yang terbaru. Evaluasi interaksi QTL dengan lingkungan (Q x E) secara kontinu merupakan pembatas utama efisiensi MAS (Beavis dan Keim 1996). Interaksi epistasis di daerah yang berbeda pada genom juga dapat mempengaruhi pengujian arah efek QTL. Jika semua lokasi genom yang terlibat dalam interaksi tidak menyatu dalam skema seleksi, maka efek QTL pada proses seleksi tersebut menjadi bias. Selain pengembangan pemetaan QTL memerlukan pengujian pada tahun terbaru, sejumlah penghambat juga membatasi efisiensi penggunaan informasi pemetaan QTL pada pemuliaan tanaman melalui MAS. Penghambat yang paling menonjol menurut Tanskley dan Nelson (1996) antara lain (1) identifikasi jumlah terbatas pada *players* mayor (QTLs) pengendali karakter spesifik, (2) defisiensi percobaan dalam analisis QTL terutama dalam estimasi yang berlebihan atau estimasi yang sangat rendah pada jumlah dan efek QTL, (3) ketiadaan karakter yang bersifat umum dalam validasi

QTL (markah) yang berhubungan dengan penerapan set materi pemuliaan yang berbeda, (5) kekuatan interaksi QTL x E, dan (6) kesulitan untuk mengevaluasi efek epistasi dengan tepat.

Peningkatan efisiensi MAS untuk karakter kuantitatif dapat dilakukan dengan cara memperbaiki rancangan percobaan di lapang, menyempurnakan model matematika, dan pendekatan metode statistik yang tepat. Dalam hal ini, data lapang dari lingkungan yang berbeda dapat diintegrasikan ke dalam analisis gabungan untuk mengevaluasi Q x E dengan *Composite Interval Mapping* (CIM). Selanjutnya, identifikasi QTL yang stabil dari beberapa lingkungan dapat dilakukan (Jiang dan Zeng 1995). Dengan peta pautan yang rinci, CIM juga mampu mengidentifikasi suatu presisi pada QTL dalam genom dan mengidentifikasi pautan QTL terbaik (gabungan) yang berasal dari beberapa galur tetua. Markah DNA yang berbasis DNA menawarkan keuntungan yang unik pada identifikasi dan penggunaan QTL yang sesuai dari suatu galur tetua yang berbeda (*repulsion*). Pengetahuan tentang lokasi dan efek QTL dapat dimanfaatkan untuk mempercepat program pemuliaan.

Beberapa contoh pemanfaatan markah sebagai alat bantu seleksi karakter kuantitatif adalah sebagai berikut:

Peningkatan Kualitas Plasma Nutfah Tomat Menggunakan Strategi Kombinasi QTL dengan Metode Silang Balik *Advanced Backcrossing* (AB-QTL)

Efisiensi metode AB-QTL telah didemonstrasikan pada tomat oleh Tanskley *et al.* (1996) dan Bernacchi *et al.* (1998) melalui serangkaian studi. Peningkatan kualitas genetik menggunakan teknik AB-QTL pada tanaman dimaksudkan untuk meningkatkan variasi karakter agronomi penting pada tanah, termasuk kualitas buah dan ketahanannya terhadap jamur hitam (*black mold*) dengan memanfaatkan spesies liarnya, yaitu *Lycopersicon pimpinellifolium*, *L. peruvianum*, *L. hirsutum*, dan *L. cheesmanii*.

Penggunaan MAS untuk Memperbaiki Penampilan Heterotik pada Jagung

Di Amerika Serikat, galur jagung B73 dan Mo17 di samping dibudidayakan secara luas untuk hasil tinggi, keduanya juga termasuk kelompok heterotik yang berbeda dalam program pemuliaan jagung. Berdasarkan hasil persilangan B73 x Mo17, dapat diketahui bahwa QTL berkontribusi terhadap heterosis untuk hasil biji yang telah dipetakan pada sembilan dari 10 kromosom jagung dengan famili

berbeda menggunakan pen-dekatan kombinasi markah molekuler dan metode si-lang balik (Stuber *et al.* 1992). Dengan bantuan mar-ka-h molekuler, hanya dibutuhkan tiga generasi silang balik dan dua generasi silang diri untuk memindahkan gen-gen pengendali sifat-sifat yang baik dari T x 303 dan Oh43 pada enam segmen kromosom ke galur sasaran B73 dan Mo17. Hasilnya menunjukkan bahwa hasil biji hibrida silang tunggal B73 x Mo17 yang telah diperbaiki meningkat hingga 17% dibandingkan de-ngan hasil hibrida dengan tetua yang sama sebelum diperbaiki (Stuber *et al.* 1999). Kajian ini merupakan awal demonstrasi pemanfaatan MAS dengan metode silang balik yang berhasil memanipulasi dan memper-baiki karakter yang kompleks seperti hasil biji pada jagung.

MAS untuk Ketahanan Jagung terhadap Kekeringan

Peneliti CIMMYT berusaha menghasilkan kultivar jagung yang tahan kekeringan dengan fokus utama pada toleransi cekaman kekeringan sebelum dan sete-lah pembungaan. Mereka telah berhasil memperbaiki ketahanan beberapa plasma nutfah jagung terhadap cekaman kekeringan melalui pemuliaan konvensional, namun prosesnya sangat lambat dan perlu waktu la-ma. Saat ini, mereka mencoba menerapkan MAS un-tuk mengatasi kendala pemuliaan konvensional. Se-bagai langkah awal menuju MAS telah diperoleh suatu peta QTL ketahanan tanaman jagung terhadap keke-ri-ngan. Markah yang terpaut erat dengan peta QTL ini diharapkan dapat memberikan informasi yang sangat berguna untuk membantu keefektifan seleksi pada pemuliaan konvensional guna merakit kultivar jagung yang toleran kekeringan (Ribaut *et al.* 2002).

Identifikasi lokasi *putative* QTL dan markah DNA yang berasosiasi dengan QTL telah membuka peluang untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi secara molekuler melalui pendekatan pemetaan gen berbasis kloning. Walaupun demikian, sebaiknya hanya digunakan QTL yang memiliki efek terbesar dan berasosiasi erat dengan markah. Kloning QTL yang memiliki efek yang kecil dan lokasi jauh dengan markah atau wilayah QTL yang berukuran besar sulit dilakukan mengingat jarak 1 cM antara QTL dengan markah dapat berarti ratusan sampai ribuan kbp (pasangan kilobasa) dan satu QTL dapat berasosiasi dengan lebih dari satu gen. Salah satu contoh keberhasilan tersebut adalah kloning lokus *hm1* pada jagung yang mengendalik-an ketahanan terhadap penyakit bercak daun yang disebabkan oleh *Cochliobolus carbonum* Nelson ras 1 (Johal dan Briggs 1992). Alel *hm1* mengkode en-zim fungsional NADP reduktase yang dapat mendetok-sifikasi toksin HC, patotoksin yang dihasilkan *C. carbo-num* ras 1.

Selain pemetaan berbasis kloning, kegiatan lain yang harus dilakukan setelah mendapatkan QTL adalah *fine-mapping* atau pemetaan QTL dengan resolusi yang sangat tinggi. Hal ini merupakan keharusan jika QTL yang didapatkan akan digunakan baik untuk penelitian dasar maupun penelitian terapan. Setelah peta QTL yang memiliki resolusi tinggi tersedia, maka QTL dapat dimanfaatkan dalam kegiatan komparatif ge-nom, genom fungsional, dan studi evolusi (Ribaut *et al.* 2002).

Walaupun informasi mengenai struktur dan fungsi QTL belum sepenuhnya dipahami, namun introgresi QTL ke dalam galur-galur elit atau plasma nutfah dan MAS untuk QTL dalam suatu program pemuliaan masih dapat dikerjakan secara efektif, misalnya pada pemuliaan jagung, padi, dan tomat. Pemulia tanaman mungkin tidak memerlukan informasi mengenai lokasi QTL secara sangat akurat, sepanjang QTL yang akan digunakan memiliki efek yang sangat besar dan dapat diintrogresikan dengan pendekatan MAB. Metode yang tersedia, seperti AB-QTL, dapat memanfaatkan QTL secara optimal untuk mengidentifikasi karakter yang mungkin terlewatkan dengan seleksi fenotipik secara konvensional. Perkembangan terbaru dalam teknologi markah diharapkan dapat meningkatkan kekuatan dan ketepatan dalam mendeteksi QTL serta meningkatkan pemanfaatan informasi QTL untuk perbaikan tanaman.

Hasil identifikasi posisi QTL selain dapat dimanfaatkan untuk percepatan program seleksi dalam pemuliaan tanaman juga dapat dimanfaatkan untuk isolasi QTL berdasarkan *fine mapping* QTL. Dengan demikian, teknologi rekayasa genetik dalam waktu singkat dapat digunakan untuk memperoleh tanaman dengan sifat yang diharapkan.

PROSPEK DAN TANTANGAN APLIKASI MAS PADA PROGRAM PEMULIAAN TANAMAN DI INDONESIA

Prospek

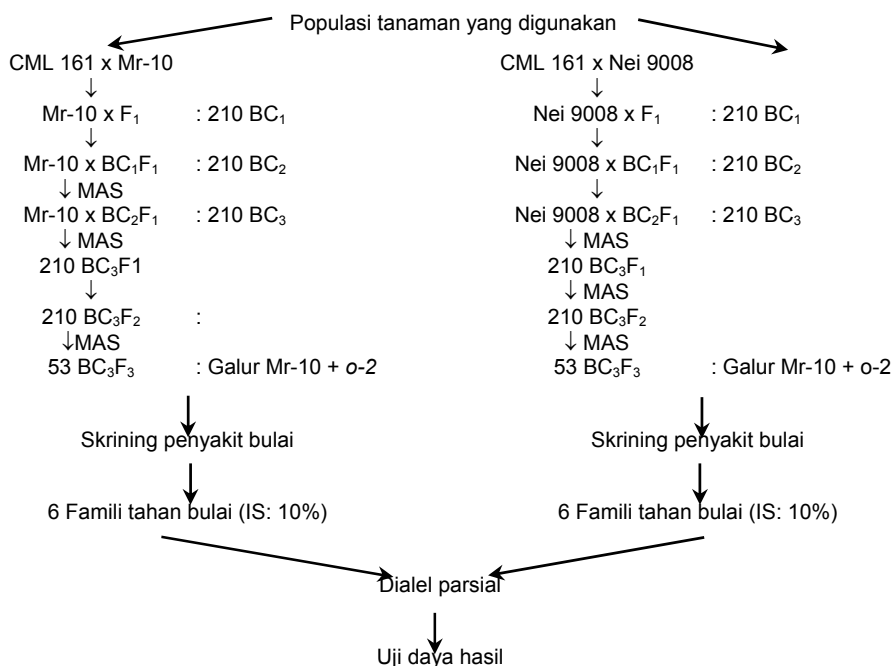
Pemanfaatan markah molekuler sebagai alat bantu seleksi pada program pemuliaan di Indonesia masih sangat sedikit dibandingkan dengan pemuliaan secara konvensional. Arah pemanfaatan markah untuk meningkatkan efisiensi dan efektifitas pemuliaan se-cara konvensional di bidang tanaman pangan terfokus pada dua komoditas, yaitu padi dan jagung. Kegiatan biologi molekuler pada tanaman padi di Indonesia umumnya diarahkan untuk ketahanan terhadap ce-kaman biotik, seperti penyakit hawar daun bakteri, blas, virus tungro, dan penggerek batang, serta cekam-an abiotik, seperti toleransi

terhadap kekeringan dan aluminium. Dua varietas padi unggul baru, yaitu varietas Conde dan Angke telah dilepas. Kedua varietas ini merupakan perbaikan dari varietas IR64 untuk ketahanan terhadap penyakit hawar daun bakteri *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*), khususnya strain III dan VIII untuk varietas Conde dan strain III, IV, dan VIII (varietas Angke) (Puslitbang Tanaman Pangan 2002). Varietas tersebut dibentuk dengan menggunakan metode silang balik dengan varietas IR64 sebagai tetua berulang serta IRBB5 dan IRBB7 masing-masing memiliki sumber gen *Xa5* dan *Xa7*, sebagai tetua donor. Pada setiap tahap silang balik, tanaman yang membawa gen *Xa-5* diidentifikasi melalui analisis DNA dengan teknik RFLP menggunakan markah RG556, sedangkan tanaman yang membawa *Xa-7* diseleksi melalui inokulasi penyakit hawar daun bakteri menggunakan metode pengguntingan daun. Selain itu, seleksi berdasarkan kemiripannya dengan tetua berulang IR64 dan uji progeni juga dilakukan (Suwarno *et al.* 1999).

Kegiatan biologi molekuler pada tanaman jagung meliputi pemanfaatan markah molekuler untuk mengidentifikasi keragaman genetik antar galur-galur untuk membentuk kelompok heterotik yang sangat bermanfaat dalam pembentukan hibrida, pemetaan QTL ketahanan penyakit bulai pada jagung, dan

aplikasi mar-kah molekuler untuk mengintrogresikan gen *opaque-2* sebagai pengendali peningkatan kualitas protein pada jagung tahan penyakit bulai dengan metode silang balik.

Salah satu contoh kasus yang sedang dilakukan di Indonesia adalah aplikasi MAS untuk meningkatkan kualitas protein pada jagung. Produk akhir yang diharapkan dari kegiatan ini adalah jagung hibrida unggul baru yang berdaya hasil tinggi, tahan penyakit bulai serta kandungan lisin dan triptofan meningkat dua kali lipat. Kegiatan ini diawali dengan identifikasi jarak genetik antara galur QPM dengan galur *Downy Mildew Resistant* (DMR) menggunakan 29 markah SSR. Galur jagung DMR telah diidentifikasi oleh Kasim *et al.* (2002) dengan menyaring 40 galur menggunakan metode inokulasi semi buatan pada 5 lokasi dan dua musim tanam di Indonesia. Hasil analisis kemiripan genetik menunjukkan tiga kelompok (klaster), yaitu (1) kelompok 1 terdiri dari 5 galur QPM (CML-161, CML-162, CML-163, CML-164, dan CML-172) dan satu galur DMR (P345); (2) kelompok 2 terdiri dari dua galur DMR (Nei9008 dan Ki-3); (3) kelompok 3 hanya terdiri dari satu genotipe DMR (MR-10) (Wicaksana 2004). Berdasarkan korelasi antara data genotipik dan fenotipik, telah dipilih dua galur DMR (Nei9008 dan Mr-10) untuk diintrogresikan gen *opaque-2* dengan metode silang balik (Gambar 1). Saat ini,



Gambar 1. Skema pembentukan jagung hibrida QPM dengan markah SSR menggunakan metode pemuliaan silang balik *Molecular Assisted Breeding* (MAB). Markah SSR yang digunakan adalah *umc1066* dan *phi057*, galur tahan bulai: Mr-10 dan Nei 9008; galur QPM: CML161.

Sumber: Azrai (2005).

kegiatan MAS sudah sampai pada generasi silang balik kedua, sehingga diharapkan 2-3 tahun ke depan dapat dilepas kultivar jagung unggul baru.

Tantangan

Beberapa kendala utama dari kegiatan penelitian biologi molekuler di Indonesia menurut Subagyo (2004) adalah (1) kualitas sumber daya manusia dan fasilitas yang belum memadai, (2) penelitian umumnya masih bersifat memanfaatkan kerja sama luar negeri dengan fokus pengembangan kapasitas, (3) pendanaan penelitian masih bersifat tahunan dan sering tidak tuntas, (4) penelitian tidak tuntas sampai dengan perakitan kultivar unggul baru dan komersialisasi, (5) belum ada kerja sama yang baik antara peneliti biologi molekuler dan pemulia tanaman, dan (6) kontroversi mengenai penggunaan produk rekayasa genetik. Kendala dan tantangan tersebut harus segera diatasi melalui perencanaan program, kerja sama, serta sosialisasi yang baik dan terarah, sehingga arah penelitian biologi molekuler untuk melahirkan kultivar unggul baru dapat tercapai.

KESIMPULAN

Beberapa teknik analisis genetik dengan menggunakan markah DNA telah tersedia dengan segala kekurangan dan kelebihan masing-masing. Pertimbangan utama memilih markah yang akan digunakan dalam kegiatan analisis genetik adalah materi genetik yang akan digunakan, jenis studi genetik, tujuan yang ingin dicapai, ketersediaan dana yang cukup, dan sarana dan prasarana yang diperlukan di laboratorium.

Beberapa studi kasus yang telah diuraikan, menunjukkan bahwa pemanfaatan markah molekuler dapat mempercepat pemuliaan konvensional dengan meningkatkan efisiensi dan efektifitas waktu, jumlah materi yang ditangani, dan biaya. Pemuliaan dengan bantuan markah sangat bermanfaat untuk mengatasi kendala yang sering muncul pada pemuliaan konvensional terutama untuk seleksi karakter kualitatif yang dikendalikan oleh gen resesif dan seleksi untuk karakter kuantitatif.

Meskipun masih sangat terbatas, kegiatan molekuler yang memanfaatkan markah DNA sebagai alat bantu seleksi di Indonesia telah dilakukan pada beberapa komoditas penting, sehingga diharapkan pada masa mendatang dapat diperoleh kultivar unggul baru yang bermanfaat bagi petani dan konsumen.

DAFTAR PUSTAKA

- Allard, R.W. 1960.** Principles of Plant Breeding. John Wiley & Sons, New York.
- Azrai, M. 2005.** Studi awal pemanfaatan markah molekuler dalam introgresi gen *opaque-2*. Disampaikan pada Seminar Tahunan Hasil-hasil Penelitian Balitsereal Tahun 2004. Maros, Sulawesi Selatan 11-15 Juli 2005. Tidak dipublikasi.
- Beavis, N.D. and P. Keim. 1996.** Identification of QTL that are effected by environment. *In* Kang, M.S. and H.G. Gauch (Eds.). Genotype-by-environment Interaction. CRC Press. p. 123-149.
- Bernancchi, D., T. Beck-Bunn, Y. Eshed, J. Lopez, D. Zamir, and S. Tanksley. 1998.** Advanced backcross QTL analysis of tomato. II. Evaluation of near isogenic lines carrying single donor introgression for desirable wild QTL alleles derived from *L. hirsutum* and *L. pimpinellifolium*. *Theor. Appl. Genet.* 97:381-397.
- Bostein D., R.L. White, M. Stocknick, and R.W. Davis. 1980.** Construction of genetic linkage map using restriction fragment length polymorphism. *Amer. J. Human Genet.* 32:314-331.
- CIMMYT. 2002.** SSR markers for *opaque-2*. Service Lab Protocols. Applied Biotechnology Laboratory, CIMMYT, Mexico.
- Cregan, P.B., J. Mudge, J.P. Kenworthy, W.J. Kenworthy, J.H. Orf, and N.D. Young. 2000.** Two simple sequence repeat markers to select for soybean cyst nematode resistance conditioned by *rgl* locus. *Theor. Appl. Genet.* 99:172-181.
- Doerge R.W. and G.A. Churchill. 1996.** Permutation tests for multiple loci affecting a quantitative character. *Genetics* 142:285-294.
- Dreher, K. Morris, M. Khairallah, J.M. Ribaut, S. Pandey, and G. Sinivasan. 2000.** Is marker assisted selection cost-effective compared to conventional plant breeding methods? The case of quality protein maize. A Paper Presented at the Fourth Annual Conference of the International Consortium on Agricultural Biotechnology Research (ICBR). Economics of Agricultural Biotechnology. 24-28 August 2000. Ravello, Italy.
- Gupta, P.K., H.S. Balyan, P.C. Sharma, and B. Ramesh. 1996.** Microsatellites in plants: A new class of molecular markers. *Curr. Sci.* 70:45-54.
- Guzhov, Y. 1989.** Genetics and plant breeding for agriculture. Mir Publ. Moscow.
- Hamrick, J.L. and M.J.W. Gode. 1989.** Allozyme diversity in plants. *In* Brown, A.H.D., M.T. Clegg, A.L. Kahler, and B.S. Weir (Eds.). Plant Population Genetics. Breeding and Genetic Resources. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA. p.318-370.
- Herrera-Estrella, L. 1999.** Transgenic plants for tropical regions: Some considerations about their development and their transfer to the small farmer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:5978-5981.

- Holland, J.B. 2005.** Implementation of molecular marker for quantitative traits in breeding programs challenges and opportunities. Training Manual on Advances in Marker-Assisted Selection Workshop, 21-24 February. IRRI, Los Banos, Filipina.
- Hospital, F. and A Charcosset. 1997.** Marker assisted introgression of quantitative trait loci (QTL). *Genetics* 132:1199-1210.
- Hunter, R.L. and C.L. Markert. 1957.** Hits a chemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science* 125:1294-1295.
- Jiang, C. and Z.B. Zeng. 1995.** Multiple trait analysis of genetic mapping for quantitative trait loci. *Genetics* 140:1111-1127.
- Johal, G.S. and S.P. Brigg. 1992.** Reductase activity encoded by the *HM1* disease resistance gene in maize. *Science* 258:985-987.
- Kasim, F., M. Azrai, Sutrisno, and D. Ruswandi. 2002.** Preliminary marker assisted selection breeding program for downy mildew resistance in Indonesia. Proceedings of the 8th Asian Regional Maize Workshop. August 5-8-2002. Bangkok, Thailand.
- Lamadji, S., L. Hakim, dan Rustidja. 1999.** Akselarasi pertanian tangguh melalui pemuliaan non-konvensional. *Dalam* Ashari *et al.* (Eds.). Prosiding Simposium V Pemuliaan Tanaman PERIPI Komda Jawa Timur. hal. 28-32.
- Mayo, O. 1980.** The theory of plant breeding. Clarendon Press, Oxford.
- Melchinger, A.E. 1990.** Use of molecular markers in breeding for oligogenic disease resistance. *Plant Breed.* 104:1-19.
- Mertz, E.T., L.S. Bates, and O.E. Nelson. 1964.** Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm. *Science* 145:279-280.
- Mudge, J., P.B. Cregan, J.P. Kenworthy, W.J. Kenworthy, J.H. Orf, and N.D. Young. 1997.** Two microsatellite markers that flank the major soybean cyst nematode resistance locus. *Crop Sci.* 37:1611-1615.
- Philips, R.L. and I.K. Vosil. 1994.** DNA-based in plants. Kluwer Academic Publisher, the Netherlands.
- Powell, W., G.C. Macharay, and J. Provan. 1996.** Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci.* 1:215-222.
- Prasanna, B.M. 2002.** DNA-based markers in plants. Part of Manual ICAR Short-Term Training Course: Molecular Marker Application in Plant Breeding, Sept. 26-Oct. 5, 2002. Division of Genetics Indian Agricultural Research Institute, New Delhi.
- Pusat Penelitian Tanaman Pangan. 2002.** Deskripsi varietas unggul padi dan palawija 2001-2002. Pusat Penelitian Tanaman Pangan, Bogor. hal. 9-10.
- Ragot, M., A. Beeville, and M. Tarsac. 1995.** Marker assisted back crossing: A practical example in techniques et utilisations des marquees moleculaires. Les Colloques, Institute National de la Recherche Agronomique 72:45-56.
- Ribaut, J.M., C. Jiang, and D. Hoisington. 2002.** Simulation experiments on efficiencies of gene introgression by backcrossing. *Crop Sci.* 42:557-565.
- Riedy, M.F., W.J Hamilton, and C.F. Aquadro. 1992.** Excess of non parental bands in offspring from know pedigrees assayed using RAPD PCR. *Nucl. Acids Res.* 20:918.
- Setiawan, A., G. Koch., S.R. Barnes, and C. Jung. 2000.** Mapping quantitative trait loci (QTLs) for resistance to *Cercospora* leaf spot disease (*Cercospora beticola* sacc.) in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Theor. Appl. Genet.* 100:1176-1182.
- Sharma, T.R. 2002.** Molecular tagging of plant disease resistance genes. Part of Manual ICAR Short-Term Training Course: Molecular Marker Application in Plant Breeding, Sept. 26-Oct. 5, 2002. Division of Genetics Indian Agricultural Research Institute, New Delhi.
- Shivanna, K.R. and Sawhney. 1997.** Pollen biology and pollen biotechnology: An introduction. *In* Shivanna and Saehney (Eds.). *Pollen Biotechnology for Crop Production and Improvement.* Cambridge University Press. UK.
- Smith, J.S.C. and O.S. Smith. 1992.** Fingerprinting crop varieties. *Adv. Agron.* 47:85-129.
- Stoskopf, N.C., D.T. Thomes, and B.R. Christie. 1993.** Plant breeding. Theory and Practice. Westview Press, Oxford.
- Stuber, C.W., S.E. Lincoln, S.W. Wolff, T. Helentjaris, and E.S. Lander. 1992.** Identification of genetic factors contributing to heterosis in a hybrid from two elite maize inbred lines using molecular markers. *Genetics* 132: 823-829.
- Stuber, C.W., M.D. Edwards, and J.F. Wendel. 1999.** Synergy of empirical breeding, marker-assisted selection, and genomics to increase yield potential. *Crop Sci.* 39:1571-1583.
- Subagyo, T. 2004.** Prospek dan kendala pemanfaatan bioteknologi untuk perlindungan tanaman di Indonesia. Makalah Presentasi Seminar Nasional Pemanfaatan Bioteknologi untuk Perlindungan Tanaman dan Hewan. 7 Agustus 2004. BBPP. Bogor.
- Suwarno, E. Lubis, H.R. Hifni, M. Bustaman, dan M. Yunus. 1999.** Perbaikan ketahanan varietas padi IR64 terhadap penyakit hawar daun bakteri. *Penelitian Pertanian* 18(1):1-5.
- Tanskley, S.D., H. Medina-Filho, and C.M. Rick. 1982.** Use of naturally-occurring enzyme variation to detect and map gene controlling quantitative traits in an interspecific backcross of tomato. *Heredity* 49:11-25.

- Tanskley, S.D. and J.C. Nelson. 1996.** Advanced backcross QTL analysis a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germ-plasm in to elite breeding lines. *Theor. Appl. Genet.* 92:191-203.
- Tanskley, S.D., S. Grandillo, T.M. Fulton, D. Zamir, Y. Eshed, V. Petiard, J. Lovez, and J.B. Bunn. 1996.** Advanced backcrossing QTL analysis in cross between an elite processing line of tomato and its wild relative. *Theor. Appl. Genet.* 92:213-224.
- Vasal, S.K. 2001.** High quality protein corn. *In* Hallauer, A.R. (Ed.). *Specialty Corns*. Second Ed. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida. p. 85-129.
- Vincent, J.M. 2001.** Marker assisted integrations of black mold resistance QTL alleles from wild *Lycopersicon cheesmanii* to cultivated tomato (*L. Esculentum*) and evaluation of QTL phenotypic effects. *Mol. Breed.* 8:217-233.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Vd. Lee, M. Horne, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and M. Zabeau. 1995.** AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 23:4407-4414.
- Welsh J. and M. McClelland. 1990.** Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.* 18:7213-7218.
- Wicaksana, N. 2004.** Analisis hubungan kekerabatan, transfer gen *opaque-2* dan heterosis beberapa karakter agronomis pada F1 hasil persilangan jagung DMR x QPM. Thesis Pascasarjana UNPAD. Tidak dipublikasi.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, and S.V. Tingey. 1990.** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18:6531-6535.
- Yang, W.P., Y. Zheng, S. Ni, and J. Wu. 2004.** Recessive allelic variations of three microsatellite sites within the *o-2* gene in maize. *Plant Mol. Biol. Rep.* 22:361-374.
- Young, N.D. and S.D. Tanskley. 1989.** RFLP analysis of the size of the chromosomal segments retained around the *tm-2* locus of tomato during backcross breeding. *Theor. Appl. Genet.* 77:353-359.
-