

PENANDA KODOMINAN B11 BERDASARKAN CAPS SEBAGAI ALAT SELEKSI TOLERANSI TANAMAN PADI TERHADAP CEKAMAN ALUMINIUM^{*)}

(CAPS Based Codominant Marker Of B11 as Selective Tool for Rice Aluminum Tolerance Trait)

Dewi Indriyani Roslim¹, Miftahudin²

¹Jurusan Biologi FMIPA Universitas Riau, Kampus Binawidya Km 12.5 Panam, Pekanbaru 28293, Riau

²Departemen Biologi FMIPA Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga Bogor 16680, e-mail: miftahudinm@yahoo.com

Abstrak

Toleransi tanaman padi terhadap cekaman aluminium (Al) merupakan sifat kuantitatif yang dikendalikan oleh banyak gen. Salah satu gen yang diinduksi oleh Al, yaitu gen *B11*, telah diisolasi dari tanaman padi genotipe toleran Al (Hawara Bunar). Ekspresinya pada Hawara Bunar lebih tinggi daripada IR64 yang sensitif Al dan telah terbukti dapat meningkatkan toleransi tanaman tembakau transgenik terhadap cekaman Al. Akan tetapi fragmen gen *B11* genomik pada tetua padi toleran Al (Hawara Bunar) dan sensitif Al (IR64), hasil amplifikasi menggunakan primer turunan B11, tidak menunjukkan polimorfisme. Penelitian ini bertujuan mengembangkan penanda molekuler B11 yang dapat digunakan sebagai alat seleksi pada MAS dan mempelajari pola pewarisannya pada populasi padi F2 hasil persilangan IR64 (varietas padi sensitif Al) dan Hawara Bunar (genotipe padi toleran Al). Bahan tanaman yang digunakan adalah genotipe padi toleran Al (Hawara Bunar dan Grogol) dan sensitif Al (IR64 dan Krowal). Pengembangan penanda molekuler B11-CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*) dilakukan melalui analisis urutan nukleotida pada fragmen DNA B11 dari IR64 dan Hawara Bunar, analisis situs enzim restriksi, dan desain primer B11 berdasarkan situs enzim restriksi yang memberikan polimorfisme pada kedua tetua padi. Fragmen B11 pada kedua tetua padi mengandung 8 polimorfisme nukleotida tunggal (SNPs). Salah satu SNPs menyebabkan polimorfisme berdasarkan situs enzim restriksi *AluI* dan ini menjadi dasar untuk mengembangkan penanda molekuler kodominan B11-CAPS. Penanda molekuler B11-CAPS bersegregasi untuk homozigot toleran:heterozigot:homozigot sensitif dengan rasio diasumsikan 1:2:1 pada populasi padi F2. Genotipe padi Grogol memiliki pola pita seperti Hawara Bunar yang sama-sama toleran Al dan genotipe padi Krowal memiliki pola pita seperti IR64 yang sama-sama sensitif Al. Penanda molekuler B11-CAPS berpotensi sebagai alat seleksi pada program pemuliaan tanaman padi untuk mendapatkan galur atau varietas padi yang toleran Al.

Kata kunci: Aluminium, *AluI*, *cleaved amplified polymorphic sequence*, padi, pewarisan gen.

^{*)}Makalah disampaikan pada Seminar Bersama PERAGI-PERHORTI-PERIPI-HIGI, 1-2 Mei 2012, Bogor, Indonesia

Pendahuluan

Gen *B11* merupakan gen toleran aluminium (Al) yang telah diisolasi dari tanaman padi karena ekspresinya di tanaman padi diinduksi oleh Al serta terbukti dapat meningkatkan toleransi cekaman Al pada tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) transgenik. Gen *B11* diturunkan dari penanda molekuler B11 yang terletak pada daerah kromosom 3 padi yang memiliki hubungan sintenik dengan lokus gen toleran Al pada rye, yaitu lokus *Alt3*. Penanda molekuler yang sangat terpaut dengan gen atau QTL tertentu akan sangat berguna sebagai alat seleksi pada MAS (*Marker Assisted Selection*) (Collard & Mackill 2008).

Marker Assisted Selection adalah seleksi menggunakan penanda molekuler yang sangat terkait dengan lokus gen tertentu untuk membantu menyeleksi fenotipe sesuai gen tersebut. Suatu penanda molekuler berpeluang dijadikan MAS apabila penanda tersebut dapat membedakan genotipe homozigot dan heterozigot, diekspresikan pada tahap awal perkembangan tanaman, tidak mempengaruhi morfologi, dan interaksi antar penanda rendah atau tidak ada (Arus & Moreno-Gonzalez 1993). Penanda molekuler untuk MAS dapat diperoleh dengan cara mengeksplorasi polimorfisme nukleotida tunggal (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*) berdasarkan situs enzim restriksi lalu mengaplikasikannya pada bulk tetua dan komponennya dari populasi F₆ RIL dan juga populasi segregasi seperti F₂. Penanda molekuler yang demikian itu disebut penanda kodominan berdasarkan situs enzim restriksi atau CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*) (Semagn *et al.* 2006). Miftahudin *et al.* (2004) dengan cara tersebut berhasil mendapatkan penanda kodominan B4-CAPS yang terkait karakter *Root Re-Growth* (RRG) sebagai parameter toleransi cekaman Al pada tanaman rye (*Secale cereale* L.). Penanda molekuler B4-CAPS tersebut dapat digunakan sebagai alat seleksi pada MAS pada tanaman rye dan gandum untuk mendapatkan genotipe yang toleran Al.

Penelitian ini bertujuan mengembangkan penanda molekuler B11 yang dapat digunakan sebagai alat seleksi pada MAS dan mengidentifikasi pola pewarisannya pada populasi padi F₂ hasil persilangan IR64 dan Hawara Bunar.

*)Makalah disampaikan pada Seminar Bersama PERAGI-PERHORTI-PERIPI-HIGI, 1-2 Mei 2012, Bogor, Indonesia

Bahan dan Metode

Bahan Tanaman. Bahan tanaman yang digunakan adalah varietas padi IR64 (sensitif Al) dan genotipe padi Hawara Bunar (toleran Al) serta populasi padi F2 hasil persilangan IR64 x Hawara Bunar. Benih padi diperoleh dari Kebun Percobaan Muara, Balai Besar Penelitian Tanaman Padi, Bogor, Jawa Barat.

Pembuatan Populasi Padi F2. Varietas padi IR64 yang sensitif Al sebagai tetua betina disilangkan dengan genotipe padi Hawara Bunar yang toleran Al untuk menghasilkan biji padi generasi F1. Teknik persilangan dilakukan mengikuti prosedur Supartopo (2006). Biji hasil persilangan ditanam di tanah sawah dan dibiarkan menyerbuk sendiri untuk mendapatkan biji padi F2.

Analisis RRG pada Populasi Padi F2. Analisis RRG pada populasi padi F2 bertujuan untuk mengidentifikasi pola pewarisan sifat toleransi tanaman padi terhadap cekaman Al. Tanaman padi F2 yang dianalisis berjumlah 110 tanaman. Perlakuan Al diberikan pada konsentrasi 15 ppm, pH 4.00 ± 0.02 selama 72 jam dan pemulihan selama 48 jam. Panjang akar diukur setelah akhir perlakuan Al dan pemulihan, lalu dihitung nilai RRG dari setiap tanaman padi F2. Tanaman padi yang toleran Al memiliki nilai RRG lebih besar dari 2.1 cm.

Verifikasi Populasi Padi F1 dan F2. Verifikasi dilakukan pada biji padi hasil persilangan untuk menentukan mana yang benar-benar F1 serta pada biji padi F2 yang dihasilkan. Verifikasi dilakukan dengan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) menggunakan primer SSR RM526, yakni: *forward* 5'-CCC AAGCAATACGTCCCTAG-3' dan *reverse* 5'-ACCTGGTCATGACAAGG AGG-3', yang sudah diketahui polimorfik di antara kedua tetua padi. Tanaman padi F1 menampilkan pita heterozigot, sebaliknya tanaman padi yang bukan F1 akan menunjukkan pita yang mengikuti salah satu tetua padi. Verifikasi pada 50 biji padi F2 akan menampilkan 3 macam pola pita, yaitu ada yang seperti IR64, Hawara Bunar, dan F1 atau heterozigot.

Isolasi DNA Genom. Daun muda dari tanaman padi diisolasi menggunakan teknik isolasi DNA secara cepat (Miftahudin *et al.* 2004). DNA yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk PCR.

Polymerase Chain Reaction (PCR). Untuk tujuan verifikasi populasi padi, DNA genom dari tanaman padi tetua, F1, dan F2 diamplifikasi menggunakan

*)Makalah disampaikan pada Seminar Bersama PERAGI-PERHORTI-PERIPI-HIGI, 1-2 Mei 2012, Bogor, Indonesia

primer RM526, dengan suhu *annealing* 55°C. Untuk tujuan analisis pola pewarisan penanda B11-CAPS, DNA genom dari tanaman padi F2 dan tetua padi diamplifikasi menggunakan primer B11-CAPS, yakni *forward* 5'-TGGTCTTAG GGGTATGCTTG-3' dan *reverse* 5'-CTGCTGAGGCAATGAGATGAAG-3' dengan suhu *annealing* 65°C. Komposisi PCR adalah sebagai berikut: 100 ng DNA padi digunakan dalam 20 µl reaksi PCR yang mengandung 1x buffer PCR (+Mg²⁺), 0.2 mM dNTPs, 0.4 µM setiap primer, dan 1 Unit *Taq* DNA Polymerase. Kondisi PCR sebagai berikut: 94°C selama 5 menit, dilanjutkan 35 siklus, dan diakhiri dengan 72°C selama 10 menit. Setiap siklus PCR terdiri dari 3 tahapan, yakni 94°C selama 45 detik, penempelan primer (bergantung primernya) selama 45 detik, dan 72°C selama 1 menit 30 detik. Amplifikasi dilakukan pada mesin PCR *SwiftTM Maxi Thermal Cycler* (Esco).

Analisis Situs Enzim Restriksi. Produk PCR dari DNA genom tetua padi yang toleran Al, sensitif Al, dan F1 yang diamplifikasi dengan penanda B11 menghasilkan pita monomorfik. Produk PCR dari kedua tetua padi diurutkan nukleotidnya lalu dibandingkan dan diidentifikasi situs enzim restriksinya menggunakan perangkat lunak NEB *cutter* (New England Biolabs, USA; <http://www.neb.com/NEBcutter/index.php3>) (Vincze *et al.* 2003) dan BioEdit v. 7.0 (Hall 1999). Satu situs enzim restriksi yang polimorfik di antara kedua tetua padi berhasil diidentifikasi, yakni *AluI*. Produk PCR dari kedua tetua padi lalu direstriksi menggunakan enzim restriksi *AluI* dengan komposisi reaksi sebagai berikut: 17 µl produk PCR, 1X buffer *Tango*, 1 unit enzim restriksi *AluI* dan dH₂O steril hingga volume reaksi 20 µl. Campuran reaksi diinkubasi pada suhu 37°C selama 16-18 jam. Hasil restriksi dimigrasikan pada 1.5% gel agarose dengan buffer 1x TBE (Tris Borate EDTA, pH 8.0) pada 65 volt selama 1.5 jam.

Analisis Pola Pewarisan Penanda Molekuler B11-CAPS. Analisis pola pewarisan penanda molekuler B11-CAPS dilakukan dengan mengamplifikasi DNA genom dari 110 tanaman padi F2 menggunakan penanda molekuler B11-CAPS. Produk amplifikasi didigesti menggunakan enzim restriksi *AluI* dan dielektroforesis.

Analisis Data. Data pola pita hasil digesti menggunakan enzim restriksi *AluI* pada populasi padi F2 diberi skor sebagai berikut: 1 = jika pola pita sama

*)Makalah disampaikan pada Seminar Bersama PERAGI-PERHORTI-PERIPI-HIGI, 1-2 Mei 2012, Bogor, Indonesia

dengan pola pita tetua padi yang sensitif Al; 2 = jika pola pita sama dengan pola pita tetua padi yang toleran Al; dan 3 = jika pola pita mengandung pola pita kedua tetua padi. Berdasarkan hasil skor tersebut lalu dilakukan Uji Khi-Kuadrat pada $\alpha = 0.05$ untuk mengidentifikasi pola pewarisan penanda B11-CAPS.

Hasil dan Pembahasan

Situs Enzim Restriksi dari Fragmen DNA B11

Penanda molekuler B11 merupakan primer yang digunakan untuk mengisolasi gen toleran Al dari tanaman padi, yakni gen *B11*. Analisis urutan nukleotida fragmen DNA B11 dari IR64 dan Hawara Bunar yang berukuran 2021 pb menunjukkan adanya 8 polimorfisme nukleotida tunggal (SNPs) yang terletak di antara basa ke-1 sampai 1380. Salah satu SNPs pada posisi nukleotida ke-668 di daerah intron 1 merupakan situs enzim restriksi *AluI* (5'-AG'CT-3') yang ada pada Hawara Bunar tetapi tidak ada pada IR64 (Gambar 22).

	365	375	385	395	405	415
IR64	TGCCTGGAGA	GTAGAAAGGT	ATTATGACCT	ATGGAATAAT	GGAAATGTC	TAACGGTGGGA
Hawara Bunar	TGCCTGGAGA	GTAGAAAGGT	ATTATGACCT	ATGGAATAAT	GGAAATGTC	TAACGGTGGGA

	665	675	685	695	705	715
IR64	CTAAAAA ACT	CTTTAATTGT	AGAGTGTATA	CTGAAAGATG	TTGCCAAGAC	TAGTGGTAAG
Hawara Bunar	CTAAAAA AGCT	CTTTAATTGT	AGAGTGTATA	CTGAAAGATG	TTGCCAAGAC	TAGTGGTAAG

	785	795	805	815	825	835
IR64	AGATGAGTCA	ATACATGTGT	AACTCATCAT	C ATGATATGC	AAATGTGATA	ACTCAGGAAA
Hawara Bunar	AGATGAGTCA	ATACATGTGT	AACTCATCAT	G ATGATATGC	AAATGTGATA	ACTCAGGAAA

Gambar 22. Polimorfisme nukleotida tunggal (SNP) pada intron 1 fragmen DNA B11 di antara genotipe padi Hawara Bunar dan IR64. Nukleotida di dalam kotak merupakan polimorfisme yang terdeteksi berdasarkan situs enzim restriksi *AluI*. •: lokasi SNP.

Polimorfisme karena situs enzim restriksi *AluI* tersebut kemudian menjadi dasar untuk membuat penanda molekuler B11-CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*). Enzim restriksi *AluI* digunakan untuk analisis segregasi karena memberikan polimorfisme pada kedua tetua padi dan harganya relatif murah. Harga enzim restriksi yang murah sangat penting karena dapat menurunkan biaya ketika menggunakan penanda molekuler CAPS sebagai alat

*)Makalah disampaikan pada Seminar Bersama PERAGI-PERHORTI-PERIPI-HIGI, 1-2 Mei 2012, Bogor, Indonesia

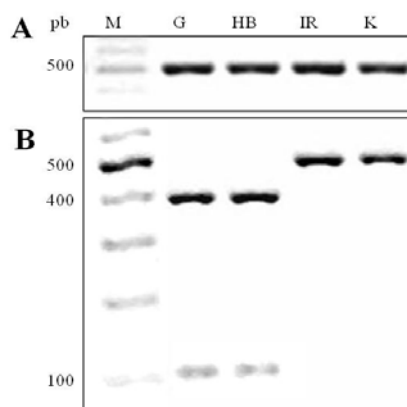
seleksi pada MAS atau menyeleksi populasi segregasi berukuran besar (Miftahudin *et al.* 2004).

Penanda Kodominan B11-CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*)

Penanda molekuler B11-CAPS yang kodominan berdasarkan polimorfisme situs enzim restriksi *AluI* telah dikembangkan dari urutan nukleotida gen *B11* pada posisi nukleotida 544-563 untuk *forward* dan 1042-1063 untuk *reverse*. Posisi *forward* dan *reverse* mengapit SNP pada nukleotida ke-668 dan satu situs enzim restriksi *AluI* lain yang terdapat di intron 1 dari fragmen B11 IR64 maupun Hawara Bunar. Amplifikasi menggunakan penanda molekuler B11-CAPS tersebut dengan cetakan berupa DNA genom Hawara Bunar, IR64, dan F1-IRH2 menghasilkan fragmen B11 yang monomorfik dan berukuran 520 pb. Fragmen DNA B11 kemudian didigesti menggunakan enzim restriksi *AluI*. Digesti fragmen DNA B11 dari Hawara Bunar menghasilkan 3 fragmen yang masing-masing berukuran 26, 99, dan 395 pb, sedangkan pada IR64 menghasilkan 2 fragmen berukuran 26 dan 494 pb. Digesti fragmen B11 dari F1-IRH2 menghasilkan 4 fragmen yang berukuran 26, 99, 395, dan 494 pb. Pada waktu elektroforesis, fragmen berukuran 26 pb tidak dapat terlihat karena ukurannya terlalu kecil. Hasil digesti fragmen DNA B11 menunjukkan bahwa penanda molekuler B11-CAPS yang dikembangkan dapat memberikan polimorfisme pada kedua tetua padi dan merupakan penanda kodominan. Penanda molekuler B11-CAPS memang sudah memenuhi syarat polimorfisme tetapi harus diaplikasikan pada bulk tetua padi dan komponennya untuk menentukan apakah penanda tersebut terkait sifat toleransi cekaman Al dan dapat digunakan sebagai alat seleksi pada MAS. Akan tetapi karena ketiadaan bahan baku, maka untuk sementara analisis dilakukan pada genotipe padi Grogol dan Krowal yang telah digunakan sebelumnya pada Bab Karakter *Root Re-Growth* sebagai Parameter Toleransi Cekaman Aluminium pada Tanaman Padi. Grogol dan Krowal merupakan genotipe padi yang sudah teruji secara lapang sebagai genotipe padi yang toleran Al dan sensitif Al secara berturut-turut (Asfarudin 1997; Farid 1997; Syakhril 1997).

*)Makalah disampaikan pada Seminar Bersama PERAGI-PERHORTI-PERIPI-HIGI, 1-2 Mei 2012, Bogor, Indonesia

DNA total dari tanaman padi Grogol dan Krowal diamplifikasi menggunakan penanda molekuler B11-CAPS kemudian produk PCR-nya didigesti menggunakan enzim restriksi *AluI*. Hasil digesti menunjukkan bahwa pola pita pada Grogol mengikuti pola pita Hawara Bunar yang sama-sama merupakan genotipe padi toleran Al dan pola pita pada Krowal mengikuti pola pita IR64 yang sama-sama sebagai genotipe padi sensitif Al (Gambar 23). Hasil ini menimbulkan dugaan bahwa kemungkinan penanda molekuler B11-CAPS berpeluang sebagai alat seleksi pada MAS, walaupun konfirmasi lebih lanjut masih diperlukan.



Gambar 23. Pola pita fragmen DNA B11-CAPS pada empat genotipe padi. Produk PCR sebelum (A) dan sesudah (B) didigesti dengan enzim restriksi *AluI*. M: 100 pb DNA *Ladder*, G: Grogol, HB: Hawara Bunar, IR: IR64, K: Krowal.

Segregasi Penanda Molekuler B11-CAPS pada Populasi Padi F2

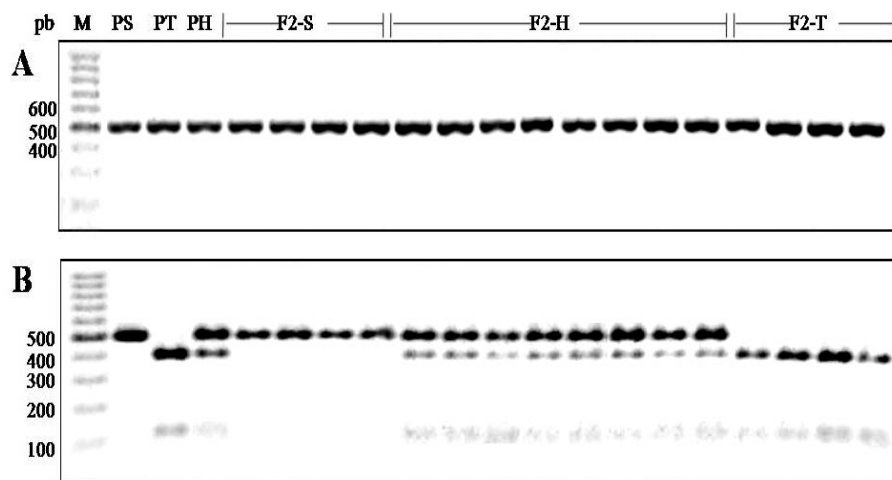
Sebanyak 110 tanaman padi dari populasi padi F2 diambil secara acak untuk analisis segregasi sifat toleransinya terhadap cekaman Al dan segregasi penanda molekuler B11-CAPS. Analisis toleransi cekaman Al berdasarkan karakter RRG telah dilakukan pada cekaman 15 ppm Al selama 72 jam diikuti pemulihan selama 48 jam. Hasil analisis menunjukkan bahwa 98 kecambah padi menampilkan nilai RRG seperti IR64 dan 12 kecambah lainnya seperti Hawara Bunar. Hasil uji Khi-Kuadrat menunjukkan bahwa segregasi sifat toleransi cekaman Al yang diukur menggunakan karakter RRG pada populasi padi F2 tidak mengikuti pola segregasi satu atau dua gen {3:1 ($\chi^2_{3:1} = 11.648$; $\chi^2_{3:1 \text{ tabel}} = 3.841$; db = 1; $\alpha = 0.05$), 9:7 ($\chi^2_{9:7} = 48.208$; $\chi^2_{9:7 \text{ tabel}} = 3.841$; db = 1; $\alpha = 0.05$), 13:3 ($\chi^2_{13:3} = 4.439$; $\chi^2_{13:3 \text{ tabel}}$

*)Makalah disampaikan pada Seminar Bersama PERAGI-PERHORTI-PERIPI-HIGI, 1-2 Mei 2012, Bogor, Indonesia

= 3.841; db = 1; $\alpha = 0.05$) dan 15:1 ($\chi^2_{15:1} = 4.075$; $\chi^2_{15:1 \text{ tabel}} = 3.841$; db = 1; $\alpha = 0.05$)). Berbeda dengan tanaman rye, karakter RRG pada tanaman padi dikendalikan oleh beberapa gen atau poligenik (Nguyen *et al.* 2003).

Hasil serupa dengan padi dijumpai pada tanaman triticale. Sifat toleransi cekaman Al yang juga diukur menggunakan karakter RRG merupakan sistem poligenik karena data tidak menunjukkan pola segregasi satu atau dua gen. Efek setiap gen pada karakter RRG bersifat aditif. Oleh karena itu seleksi hasil persilangan menggunakan tanaman yang memiliki kemampuan akar tumbuh lebih panjang setelah cekaman Al sebagai tetua diharapkan dapat meningkatkan toleransi cekaman Al (Zhang *et al.* 1999).

Analisis segregasi penanda molekuler B11-CAPS selanjutnya dilakukan dengan mengamplifikasi DNA total dari ke-110 tanaman padi F2, lalu mendigesti produk PCR-nya menggunakan enzim restriksi *AluI*. Hasil digesti kemudian dimigrasikan pada 1.5% gel agarose untuk mengidentifikasi pola pita pada setiap tanaman padi F2 (Gambar 24).



Gambar 24. Pola pita fragmen DNA B11-CAPS pada populasi padi F2. Produk PCR sebelum (A) dan sesudah (B) didigesti dengan enzim restriksi *AluI*. PS: tetua padi yang sensitif Al, PT: tetua padi yang toleran Al, PH: F1 heterozigot, F2-S: tanaman padi F2 (IR64 x Hawara Bunar) yang sensitif Al, F2-H: tanaman padi F2 seperti F1, F2-T: tanaman padi F2 yang toleran Al.

Berdasarkan pola pita dari tetua padi lalu dibuat skor terhadap pola pita pada setiap tanaman padi F2. Tigapuluh enam tanaman padi F2 memiliki pola pita

*)Makalah disampaikan pada Seminar Bersama PERAGI-PERHORTI-PERIPI-HIGI, 1-2 Mei 2012, Bogor, Indonesia

seperti IR64, 20 tanaman seperti Hawara Bunar, dan 54 tanaman seperti F1 atau heterozigot. Hasil perhitungan Khi-Kuadrat menunjukkan bahwa nilai Khi-Kuadrat hitung_(1:2:1) sebesar 4.691, lebih kecil dari nilai Khi-Kuadrat tabel_(1:2:1) yakni 5.99 ($db = 2, \alpha = 0.05$), sehingga diasumsikan bahwa segregasi penanda molekuler B11-CAPS mengikuti pola pewarisan 1 gen, yaitu 1:2:1. Hasil analisis segregasi fenotipik dan penanda molekuler menimbulkan spekulasi bahwa toleransi tanaman padi terhadap cekaman Al dikendalikan oleh lebih dari satu gen dan merupakan karakter kuantitatif (QTL). Gen *B11* merupakan salah satu gen yang turut berperan memberikan pengaruh dalam menentukan toleransi tanaman padi terhadap cekaman Al.

Simpulan

Fragmen B11 pada kedua tetua padi mengandung 8 polimorfisme nukleotida tunggal (SNPs). Penanda molekuler B11-CAPS yang kodominan telah dikembangkan berdasarkan polimorfisme berdasarkan situs enzim restriksi *AluI* pada salah satu SNP. Segregasi penanda molekuler B11-CAPS pada populasi padi F2 mengikuti pewarisan gen tunggal. Penanda molekuler B11-CAPS berpotensi sebagai alat seleksi pada program pemuliaan tanaman padi untuk mendapatkan genotipe padi yang toleran Al.

Daftar Pustaka

- Ahmad. 2009. Analisis marka molekuler terpaut karakter fisiologi dari sifat toleransi aluminium pada padi. [Tesis]. Bogor: Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Aitken A, Cohen P, Santikarn S, Williams DH, Graham A, Calder, Smith A, Kleet CB. 1982. Identification of the NHZ-terminal blocking group of calcineurin B as myristic acid. *Febs Lett* 150(2):314-318.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389-3402.
- Asfaruddin. 1997. Evaluasi ketenggangan varietas-varietas padi gogo terhadap keracunan aluminium dan efisiensinya dalam penggunaan kalium. [Tesis]. Bogor: Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Collard BCY, Mackill DJ. 2008. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Phil Trans R Soc B* 363:557–572. doi:10.1098/rstb.2007.2170.
- Farid N. 1997. Pengujian plasma nutfah padi gogo untuk ketenggangan terhadap tanah masam dan ketahanan terhadap penyakit blas. [Tesis]. Bogor: Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.

*)Makalah disampaikan pada Seminar Bersama PERAGI-PERHORTI-PERIPI-HIGI, 1-2 Mei 2012, Bogor, Indonesia

- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41:95-98.
- Miftahudin, Scoles GJ, Gustafson JP. 2004. Development of PCR-based co-dominant markers flanking the *Alt3* gene in rye. *Genome* 47:231-238.
- Nguyen BD, Brar DS, Bui BC, Nguyen TV, Pham LN, Nguyen HT. 2003. Identification and mapping of the QTL for aluminum tolerance introgressed from the new source, *Oryza rufipogon* Griff., into indica rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* 106:583-593.
- Semagn K, Bjornstad A, Ndjiondjop MN. 2006. An overview of molecular marker methods for plants. *Afr J Biotechnol* 5(25):2540-2568.
- Supartopo. 2006. Teknik persilangan padi (*Oryza sativa* L.) untuk perakitan varietas unggul baru. *Bul Tek Pertan* 11(2):76-80.
- Syakhriil. 1997. Evaluasi reaksi varietas-varietas padi gogo terhadap cekaman aluminium dan kekurangan nitrogen. [Tesis]. Bogor: Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Vincze T, Posfai J, Roberts RJ. 2003. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res* 31: 3688-3691.
- Zhang X, Jessop RS, Ellison F. 1999. Inheritance of root regrowth as indicator of apparent aluminium tolerance in triticale. *Euphytica* 108:97-103.

*)Makalah disampaikan pada Seminar Bersama PERAGI-PERHORTI-PERIPI-HIGI, 1-2 Mei 2012, Bogor, Indonesia

