

Evaluasi 18 primer SSR untuk pengembangan sidikjari DNA tanaman karet (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)

Evaluation of 18 SSR primers to develop DNA fingerprint of rubber tree (Hevea brasiliensis Muell. Arg.)

Asmini BUDIANI^{1*)}, Sekar WOELAN²⁾, Hayati MINARSIH¹⁾, NUHAIMI-HARIS¹⁾
& Riza Arief PUTRANTO¹⁾

¹⁾ Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Jln Taman Kencana No.1 Bogor 16182, Indonesia

²⁾ Pusat Penelitian Karet, Jl. Salak No. 1, Bogor 16182, Indonesia

Diterima tanggal 8 September 2014/disetujui tanggal 25 Nopember 2014

Abstract

Breeding program of rubber tree to produce elite clones is hampered by the length of selection cycles. On the other hand, attempts to increase production by extensification of the plantation area is also facing a problem from the availability of the rootstock, causing the occurrence of fake clones without any information of their origin. Therefore, the availability of molecular markers to be used as DNA fingerprint of rubber tree clones is needed. This will help the breeder to shorten the length of selection program and to identify the purity of the clone. This research was aimed to evaluate 18 SSR primer pairs that had been published to identify 17 rubber clones. Pure genomic DNAs were isolated from 17 clones, followed by experiment to optimize annealing temperature for each primer to obtain the best amplification product. Initially, the PCR product was run in both the agarose and polyacrylamide gels. However, the analysis of all PCR products were then conducted on SDS polyacrylamide gel, since this gel can separate DNA fragments with only a few bases differences. The results showed that 14 clones have been identified specifically using 11 primers. Four out of 18 primer pairs used could identify 12 rubber tree clones, which are PR 107, PR 261, SP 217, PB 330, PB 340, IRR 5, IRR 112, IRR 118, IRR 220, GT 1, BPM 101 and RRIM 712. Each clone can be distinguished from each other using only one primer pair. Identification of the other tree clones (PB 5/51, PB 260, and RRIC 110) has to be conducted by combining the several PCR products using different primer pairs. Although these results showed that SSR markers had high potential to be used as DNA fingerprint on rubber tree clones, the set of the primer pairs should be tested among other clones, as well as other SSR primers should be tested to identify the clones which could not be identified using the 18 primer pairs in this experiment.

[Keywords: Rubber clone, molecular marker, PCR-SSR, polymorphism]

*) Penulis korespondensi: asminib@yahoo.com

Abstrak

Pemuliaan tanaman karet untuk menghasilkan klon-klon unggul baru menghadapi masalah lamanya siklus seleksi. Di sisi lain, upaya peningkatan produksi melalui pembukaan lahan baru, juga terkendala oleh ketersediaan bibit, yang memicu beredarnya bibit palsu, yang umumnya tidak jelas asal usulnya. Oleh karena itu, diperlukan ketersediaan marka yang dapat digunakan sebagai sidikjari DNA bagi klon-klon tanaman karet yang ada, sehingga dapat membantu mempercepat proses seleksi dan mengetahui kemurnian bibit. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi 18 primer SSR yang telah dipublikasikan untuk mengidentifikasi 17 klon karet. DNA yang murni diisolasi dari 17 klon, kemudian dilakukan optimasi suhu *annealing* untuk setiap jenis primer agar diperoleh hasil amplifikasi terbaik. Pada awal percobaan hasil PCR dicek pada gel agarosa dan gel poliakrilamida, namun analisis untuk seluruh hasil PCR dilakukan pada gel SDS poliakrilamid, karena gel ini secara nyata dapat memisahkan fragmen DNA yang hanya berbeda beberapa basa. Hasil percobaan menunjukkan bahwa 14 klon dapat diidentifikasi secara spesifik menggunakan 11 primer. Empat dari 18 pasang primer yang diuji dapat mengidentifikasi 12 klon yang dianalisis, yaitu PR 107, PR 261, SP 217, PB 330, PB 340, IRR 5, IRR 112, IRR 118, IRR 220, GT 1, BPM 101 dan RRIM 712. Masing-masing klon tersebut dapat dibedakan dari klon lainnya hanya dengan menggunakan satu jenis primer. Sedangkan identifikasi tiga klon lainnya (PB 5/51, PB 260, dan RRIC110) harus dilakukan dengan menggabungkan hasil PCR menggunakan beberapa primer. Meskipun hasil percobaan ini menunjukkan bahwa marka SSR sangat berpotensi untuk digunakan sebagai sidikjari DNA klon-klon karet, namun primer yang sama perlu diuji untuk klon-klon lainnya. Demikian pula primer lain perlu diuji untuk mengidentifikasi klon-klon yang belum teridentifikasi menggunakan 18 primer dalam penelitian ini.

[Kata kunci: Klon karet, marka molekul, PCR-SSR, polimorfisme]

Pendahuluan

Karet (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) merupakan salah satu komoditas perkebunan penting penghasil devisa negara dari sektor non-migas. Sejalan dengan semakin berkembangnya areal perkebunan dan hutan tanaman industri karet, permintaan akan bibit karet terus meningkat. Meskipun sejumlah klon karet anjuran yang memiliki karakter unggul telah dihasilkan melalui program pemuliaan yang dilakukan oleh Pusat Penelitian Karet, PT Riset Perkebunan Nusantara (RPN), namun terbatasnya pasokan bibit, menyebabkan para pekebun seringkali harus membeli bibit dari berbagai sumber yang belum tentu dapat dijamin kemurniannya. Hal tersebut mengakibatkan produktivitas kebun tidak dapat dicapai secara maksimal.

Sebagian klon karet dapat dibedakan melalui karakter morfologi namun sebagian lainnya sulit dibedakan. Di sisi lain keragaman genetik yang semakin sempit dan lamanya siklus seleksi menghambat program pemuliaan dalam menghasilkan klon-klon unggul karet. Berkembangnya teknik-teknik molekuler yang sangat pesat beberapa dasawarsa terakhir telah melahirkan berbagai teknik yang dapat digunakan sebagai penanda untuk membedakan varietas, klon atau bahkan individu tanaman yang secara genetik mempunyai kekerabatan yang sangat dekat dan sulit dibedakan secara morfologi. Selain membantu para pemulia dalam kegiatannya untuk menghasilkan klon-klon baru dalam waktu yang lebih cepat dan mengevaluasi latar belakang genetik suatu individu tanaman yang baru ditemukan, ketersediaan penanda molekuler atau *DNA fingerprint* juga berguna untuk melindungi hak kekayaan intelektual. Para pemulia dapat melindungi varietas temuannya tidak hanya melalui identifikasi secara morfologi tetapi juga secara genetik. Suatu tanaman yang secara fisik/morfologi sama tetapi secara genetik berbeda tidak dapat diklaim sebagai individu yang sama, begitupun sebaliknya. Profil atau fingerprint DNA juga digunakan dalam program pemuliaan untuk memeriksa suatu turunan dari *spurious pollination* (Corley, 2005).

Penanda molekuler berbasis DNA telah banyak digunakan karena memiliki kelebihan dalam hal sensitivitas dan kecepatan mengidentifikasi spesies yang berbeda serta dapat membedakan individu yang mempunyai hubungan kekerabatan dekat (Ilbi, 2003). Penanda molekuler dapat diklasifikasikan ke dalam dua kelompok besar, yaitu penanda molekuler berbasis hibridisasi dan penanda molekuler berbasis PCR seperti RAPD, SSR atau microsatellites, AP-PCR and AFLPs (Semagn, 2006). Penanda molekuler berbasis PCR lebih banyak digunakan karena memerlukan DNA dengan konsentrasi yang rendah, mampu mengamplifikasi sekuen DNA genom dari jaringan yang telah disimpan (preserved tissue), metodenya cukup sederhana, serta relatif murah.

Riset terkait sidikjari DNA telah dikembangkan dan diaplikasikan pada berbagai tanaman. Salah satu penanda molekuler berbasis PCR yang sangat populer saat ini adalah *Simple sequence repeat* (SSR). Penanda ini telah digunakan untuk mempelajari keragaman genetik pada berbagai tanaman, seperti gandum (Liu et al., 2007; Hao et al., 2006), barley (Brantestam et al., 2007), cole (Hasan et al., 2006), jowar (Marco et al., 2007), winter triticale (Tams et al., 2004), dan kopi (Aggarwal et al., 2007). Selain relatif sederhana dan murah, teknik ini juga lebih reproduksibel, bersifat kodominan dan multi alelik, melingkupi daerah genom yang luas, serta pada umumnya bersifat polimorfik (Saha et al., 2005; Gouvêa et al., 2010).

Aplikasi teknik SSR pada tanaman karet juga telah dilaporkan (Feng et al., 2009; Yu et al., 2011; Pootakham et al., 2012). Dalam upayanya untuk mengembangkan marker mikrosatelit pada tanaman karet, Pootakham et al. (2012) menggunakan teknologi *pyrosequencing* 454 untuk mendapatkan *genomic shotgun sequences* dan mengidentifikasi lebih dari 24 000 *putative simple sequence repeats* (SSRs). Sebanyak 418 locus SSR potensial dipilih untuk validasi empiris, 224 pasangan primer menghasilkan produk amplifikasi, dan 90 marker SSR menunjukkan polimorfisme antar 18 aksesori tanaman karet. Dari penelitiannya tersebut, telah diidentifikasi lima marker SSR potensial yang dapat membedakan ke-18 tanaman karet yang dievaluasi. Garcia et al. (2011) melaporkan hasil penelitiannya dalam identifikasi 12 klon karet komersial di Kolombia secara *in silico* menggunakan marker SSR. Sebanyak 15 marker SSR dipilih dari 561 marker mikrosatelit hasil rancangan menggunakan sekuen yang terdeposit pada GenBank. Hasil penelitian menunjukkan bahwa empat marker SSR (SSRH103, SSRH134, SSRH510 dan SSRH516) dapat membedakan 10 dari 12 klon yang diuji. Hasil penelitian lain mengemukakan bahwa lima primer SSR, yaitu (EHB85, EHB109, EHB169, EHB177 and EHB178) dinyatakan sangat informatif dan dapat digunakan untuk membedakan 20 klon karet (Triwiyatakorn et al., 2011).

Atas dasar hasil-hasil penelitian yang telah dipublikasi tersebut, maka tujuan dari penelitian ini adalah mengevaluasi 18 primer yang telah direkomendasikan sebagai primer yang informatif oleh peneliti sebelumnya, untuk mengidentifikasi 17 klon penting koleksi Pusat Penelitian Karet, PT Riset Perkebunan Nusantara, Indonesia.

Bahan dan Metoda

Bahan tanam

Material genetik yang digunakan dalam penelitian ini adalah 17 klon karet yang merupakan koleksi Pusat Penelitian Karet sebagaimana disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Daftar klon karet yang digunakan untuk analisis DNA fingerprinting menggunakan metode SSR yang digunakan dalam penelitian.

Table 1. List of rubber tree clones used for DNA fingerprinting analysis using SSR markers in this research.

No	Klon	Tetua	Asal	Keterangan
1	GT 1	Klon primer	Indonesia	Penghasil lateks
2	IRR 220	PB 260 x IAN 873	Indonesia	Penghasil lateks
3	PR 261	TJIR 1 x PR 107	Indonesia	Penghasil lateks
4	IRR 112	IAN 873 x RRIC 110	Indonesia	Penghasil lateks
5	PB 5/51	PB 56 x PB 24	Malaysia	Penghasil lateks
6	IRR 118	LCB 1320 x FX 2784	Indonesia	Penghasil lateks
7	PR 107	Klon primer	Indonesia	Penghasil lateks kayu
8	IRR 104	BPM 101 x RRIC 110	Indonesia	Penghasil lateks
9	PB 260	PB 5/51 x PB 49	Malaysia	Penghasil lateks
10	IAN 873	PB 86 x F 1717	Brazil	Penghasil lateks kayu
11	IRR 5	PBIG seedling	Indonesia	Penghasil lateks kayu
12	BPM 101	Klon primer	Indonesia	Penghasil lateks kayu
13	RRIC 110	LCB 1320 x RRIC 7	Sri Lanka	Penghasil lateks kayu
14	PB 330	PB 5/51 x PB 32/36	Malaysia	Penghasil lateks
15	SP 217	Tidak diketahui	Indonesia	Penghasil lateks
16	PB 340	PB 235 x PR 107	Malaysia	Penghasil lateks
17	RRIM 712	RRIM 605 x RRIM 71	Malaysia	Penghasil lateks

Isolasi DNA total

Isolasi DNA dari daun karet dilakukan menggunakan prosedur yang dikembangkan berdasarkan metode Orozco-Castilo *et al* (1994). Sebanyak 1 g daun karet ditambah 0,1g PVPP (*Polyphenylpoly-pirolidone*), digerus dalam keadaan dingin hingga halus dengan penambahan N₂ cair. Serbuk halus yang dihasilkan dimasukkan ke dalam 5 mL bufer ekstraksi (CTAB 2 %, EDTA 020 mM pH 8,0, Tris-HCl 100 mM pH 8,0, NaCl 1,26 M) yang telah dipanaskan dan ditambah β -merkaptotanol 1%. Campuran divortex, kemudian dipanaskan selama 30 menit pada suhu 65 °C. Setelah disentrifus (10 menit, 11.000 rpm), supernatant dipisahkan, ditambah 1 x volume kloroform : isoamilalkohol (24 : 1), divortex dan disentrifus (10 menit, 11.000 rpm). Lapisan atas dipindahkan ke tabung baru dan diekstrak kembali dengan 1xV larutan kloroform : isoamilalkohol (24:1). Ke dalam supernatan hasil sentrifugasi ditambahkan 1 x volume isopropanol dingin, dikocok perlahan hingga homogen kemudian disimpan pada suhu 4 °C dalam kulkas selama 30 menit, kemudian disentrifus (10 menit, 11.000 rpm). Supernatan dibuang dan pelet DNA dilarutkan dalam 1 mL bufer TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM), ditambah 1/10 x volume CH₃COONa 3M pH 5.2 dan 2,5 mL etanol absolut, dikocok hingga homogen dan simpan pada suhu -20 °C selama 30 menit atau semalam. Setelah disentrifus selama 10 menit 12.000 rpm pada suhu 4 °C, supernatan dibuang, pelet DNA dicuci dengan etanol 70%, kemudian dikeringkan dalam *DNA speed vacuum*. Pelet DNA yang sudah kering dilarutkan dalam 500 μ L bufer TE atau ddH₂O,

ditambah RNase 25 μ g/mL, diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit, kemudian disimpan dalam freezer. Kuantitas dan kualitas DNA diuji dengan mengukur absorbansinya pada panjang gelombang 260 nm (λ 260), dan 280 nm (λ 280), serta dengan elektroforesis pada gel agarosa. Konsentrasi DNA dihitung berdasarkan nilai absorbansi pada λ 260, sedangkan kemurniannya terhadap protein dihitung berdasarkan nisbah λ 260/ λ 280.

Primer SSR dan amplifikasi PCR

Untuk amplifikasi fragmen DNA yang mempunyai motif SSR, primer spesifik yang digunakan adalah primer yang telah dipilih dari beberapa publikasi mengenai SSR pada tanaman karet. Nama dan susunan nukleotida dari primer yang digunakan ditunjukkan pada Tabel 2. PCR dilakukan dalam 25 μ L campuran reaksi yang mengandung DNA genomik 25 ng, primer 0.4 μ M, MgCl₂ 1.5 mM, dNTP 200 mM dan Taq polymerase satu unit. Proses amplifikasi dilakukan menggunakan mesin PCR Applied Biosystem Veriti, dengan program PCR sebagai berikut : pra denaturasi 94 °C selama tiga menit, dilanjutkan 35 siklus meliputi denaturasi 94 °C selama 45 detik, *annealing* 52-59 °C tergantung masing-masing primer (Tabel 1) selama 45 detik, *extention* 72 °C selama satu menit, dan terakhir *post extention* 72 °C selama lima menit. Pada awal percobaan, hasil PCR dianalisis dengan elektroforesis pada gel agarosa (3%) dan SDS-poliakrilamida. Tetapi setelah dipastikan bahwa gel agarosa tidak diskriminatif, maka selanjutnya analisis dilakukan pada gel SDS-poliakrilamida.

Tabel 2. Daftar primer yang digunakan dalam penelitian beserta susunan nukleotida dan perkiraan panjang amplicon yang dihasilkan.

Table 2. List of primers used in this research along with nucleotide sequences and amplicon length.

No	Kode	TM	Primers (5'--- 3')	SSR motif/ Ukuran (pb)	Referensi
1	SSRH103_F	64.7	TCCTCTCCTCGTCAACATCC	(CT) 21 / 251	Garcia et al., 2011
	SSRH103_R	62.4	TGTCATTGAACTCCGTCAA		
2	SSRH403_F	63.5	TGCCATCCTGCAGTTATCAG (F)	(GA)16 / 242	Garcia et al., 2011
	SSRH403_R	63.7	GCACATATG AGGAAGCCACA (R)		
3	SSRH358_F	64.9	TCCGCTCTAGTCTTCTCCTG (F)	(GA)20 / 226	Garcia et al., 2011
	SSRH358_R	63.9	GCCGCATAAGAGTGAACGA (R)		
4	SSRH548_F	64.8	TGAGCAACGGAGGAGAGAA (F)	(GA)4CA(GA)7 / 250	Garcia et al., 2011
	SSRH548_R	63.1	CCAAACACCCAAACCCAATTC		
5	gSSR165_F	60.8	CAAGCATGTCATGTGTTTGG	(AAT)19 / 230-270	Pootakham et. al., 2012
	gSSR165_R	65.2	GGGAGGATGATTGGCTACCT		
6	gSSR194_F	61.7	GGGCCTCATTGTTCGTTTTA	(ATA)21 / 470-530	Pootakham et. al., 2012
	gSSR194_R	64.6	GTAGGGTGCCATAAAGCAC		
7	gSSR212_F	63.0	CCTTCCCCACTGATTCTTCA	(ATT)6 / 250-260	Pootakham et. al., 2012
	gSSR212_R	66.3	CTCTGCCTGGTCTACTTGC		
8	gSSR213_F	62.9	CAACGGTGCATAGAGAAAGGA	(ATT)6 / 480-520	Pootakham et. al., 2012
	gSSR213_R	60.0	TCATGTTGGGTCAGATTTTACA		
9	gSSR268_F	58.6	TGGCATGATCGTTTAAAGAAAAA	(TAA)13 / 230-280	Pootakham et. al., 2012
	gSSR268_R	64.0	CGGTTTCTACCTCAGCTTG		
10	EHB085_F	62.2	CGATTAGGTACGTGATCCCA	(TCATGC)5 / 110-120	Triwiyatakorn et al., 2011
	EHB085_R	61.7	AAGTTGTTGAGGAATGATCAGGA		
11	EHB109_F	64.0	GAAaGCTAACGGTGGACTCG	(ATC)10 / 252-254	Triwiyatakorn et al., 2011
	EHB109_R	63.1	ACGAATCGGACTTTGGTGTT		
12	EHB169_F	63.3	TCACTTTTCAACCCACCA	(TCT)11 / 200-225	Triwiyatakorn et al., 2011
	EHB169_R	62.3	GGCAAACCAGGAAATCAACA		
13	EHB177_F	60.7	CGCTTTCTCCATATAGAGTTTCA	(GAA)7(TTC)8	Triwiyatakorn et al., 2011
	EHB177_R	62.3	CAGCAAGAAATCCCTCAACC		
14	EHB178_F	61.6	TCGTGACCCAACAGAATAAAGA	(ATTA)8 / 209-212	Triwiyatakorn et al., 2011
	EHB178_R	64.4	GGAAATTCTGCTGGCACTGT		
15	HBE280_F	61.8	GGACACCTGGAGCAAAATAG	(GAAA)4 / tdk terinformasi	Feng et al., 2012
	HBE280_R	58.8	TATGCTTCGATGTATATTCACGT		
16	HBE301_F	53.1	GGCATAACAAGAAAAAATTT	(CAGCAA)5 / tidak terinformasi	Feng et al., 2012
	HBE301_R	60.7	TAAGGATTGACGGCTACG		
17	HBE316_F	61.8	CGACAACCAGGAACCTTACC	(TCTGT)4 / tidak terinformasi	Feng et al., 2012
	HBE316_R	61.4	AAACAACCTGCGGAGGATT		
18	HBE329_F	58.1	CCAAAACAAGGGAAATCAC	(AGA)9 / tidak terinformasi	Feng et al., 2012
	HBE329_R	61.7	GACCGAGACGCTTAGTTC		

Elektroforesis pada gel SDS-poliakrilamid dilakukan dengan metode yang diacu dari Diputra (2013). Gel akrilamid 6 % dibuat dengan menghomogenkan terlebih dahulu urea, *aquabidest* steril, buffer TBE 10x dan *acrylamide/bis* 40 % (19:1). . Amonium persulfat (APS) 10 % dan TEMED ditambahkan ke dalam larutan yang sudah tercampur merata kemudian dimasukkan ke dalam *chamber* dan ditunggu hingga mengeras selama 30 menit. Produk

PCR ditambah 20 µL *loading dye* formamide, kemudian didenaturasi pada suhu 94 °C di mesin PCR selama tiga menit. Gel yang sudah mengeras dipanaskan terlebih dahulu dengan melakukan *pre-run* pada 75 W selama satu jam. Selanjutnya sebanyak 6 µL produk PCR yang telah didenaturasi dimasukkan ke dalam sumur gel, kemudian elektroforesis dijalankan pada 65 W selama lebih kurang satu jam atau sampai warna hijau dari *xylene cyanol* berada pada 2/3 dari

ujung gel. Setelah selesai elektroforesis, dilakukan visualisasi pita DNA pada gel dengan pewarnaan menggunakan perak nitrat.

Gel dimasukkan ke dalam *tray* pewarnaan yang berisi larutan fiksasi (asam asetat 10 %) dan dibiarkan selama 20 menit di atas *shaker*, kemudian dicuci dua kali dengan *aquadest* masing-masing selama dua menit. Selanjutnya ditambahkan larutan pewarna (1 g AgNO₃ dan 1.5 mL formaldehida dilarutkan dengan aquades hingga volume 1 L) dan ditempatkan kembali dalam *shaker* selama 30 menit. Larutan pewarna kemudian dibuang, dan gel dicuci kembali dengan aquades. Setelah itu gel direndam dengan larutan *developer* (30 g serbuk Na₂CO₃, 1.5 mL formaldehida 37 %, dan 200 µL larutan Natriumtiosulfat 10 mg mL⁻¹ dilarutkan dengan aquades hingga volume 1 L) sambil *dishaker* hingga pita-pita DNA muncul. Proses pewarnaan dihentikan setelah semua pita DNA muncul dengan menambahkan larutan fiksasi, kemudian gel dicuci kembali dengan aquades dan dikeringkan.

Analisis data dan evaluasi marka SSR

Analisis data hasil elektroforesis pada gel akrilamid dilakukan dengan melakukan skoring atau penilaian muncul tidaknya setiap pita/fragmen DNA. Ukuran pita DNA ditentukan dengan *software Photo-CapMw*. Setiap pita DNA pada marka SSR yang teramplifikasi merepresentasikan posisi alel pada lokus. Satu marka SSR dianggap sebagai satu lokus (Mulsanti, 2011). Nilai (+) diberikan untuk amplifikasi positif yang menggambarkan alel yang teramati, sedangkan nilai (-) diberikan untuk amplifikasi negatif yang menggambarkan tidak adanya alel terdeteksi. Data ditampilkan dalam bentuk kode warna dimana warna hitam merepresentasikan skor positif dan warna abu-abu merepresentasikan skor negatif. Data tidak terdeteksi ditampilkan dalam warna putih. Otomatisasi menggunakan *Microsoft Excel* dilakukan untuk membentuk kluster hierarki untuk tiap alel dari marka SSR terhadap klon-klon karet yang diuji.

Analisis tingkat polimorfisme

Tingkat polimorfisme (*Polymorphic Information Content/PIC*) dihitung untuk masing-masing marka mikrosatelit. Nilai PIC diukur dengan menggunakan *software* yang dapat diakses secara *online* (www.genomics.liv.ac.uk/animal/Pic.html) (Mulsanti 2011). Nilai PIC juga dapat diukur dengan rumus :

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^l P_i^2 - \sum_{i=1}^{l-1} \sum_{j=i+1}^l 2P_i^2 P_j^2$$

$i = 1, 2, 3, \dots, n$, dimana P_i dan P_j frekuensi populasi alel ke- i dan ke- j (Nagy, 2012)

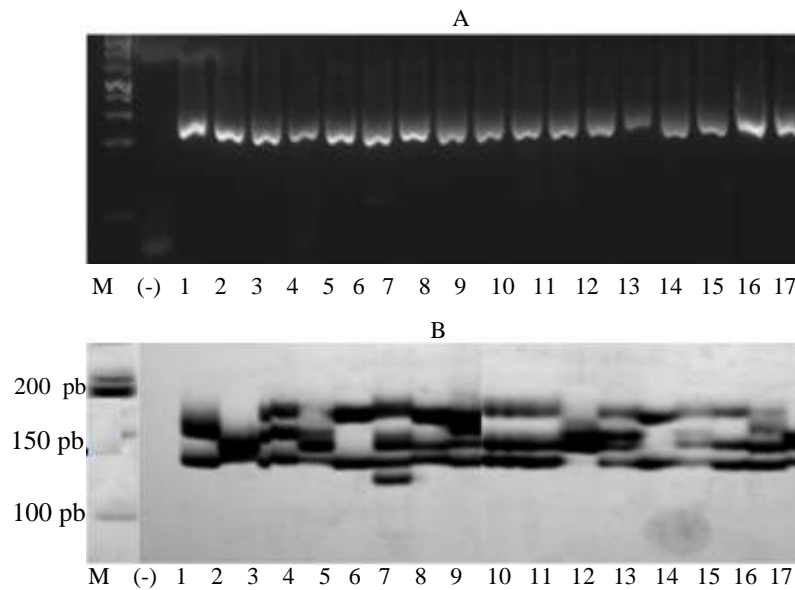
Hasil dan Pembahasan

Elektroforegram hasil PCR- SSR

Gambar 1 menunjukkan perbedaan pemisahan DNA hasil PCR yang sangat signifikan antara gel SDS-poliakrilamid dibandingkan dengan pada gel agarosa. Elektroforesis pada gel agarosa hasil PCR menggunakan primer SSRH403 hanya memberikan satu pita DNA untuk masing-masing klon yang dianalisis sehingga pola antar klon tidak dapat dibedakan. Sebaliknya, dengan elektroforesis pada gel SDS-poliakrilamid dihasilkan 5 pita DNA, dimana 4 pita di antaranya bersifat polimorfik. Oleh karena itu, analisis untuk 17 primer lainnya dilakukan pada gel SDS-poliakrilamid. Hasil elektroforesis menggunakan gel poliakrilamid 6% mampu memisahkan DNA lebih sempurna dibandingkan dengan gel agarosa 3%. Hal ini disebabkan gel poliakrilamid memiliki pori-pori yang lebih kecil daripada gel agarosa sehingga molekul DNA untai pendek dapat terpisah lebih baik (Diputra, 2013).

Hasil elektroforesis pada gel SDS-Poliakrilamida dari produk PCR-SSR ke 17 klon karet yang dianalisis disajikan pada Gambar 2. sampai dengan Gambar 5. Gambar 2. menunjukkan hasil elektroforesis produk PCR menggunakan primer seri SSRH (SSRH 103, SSRH 358, SSRH403 dan SSRH 548). Dapat dilihat bahwa SSRH103 menghasilkan total lima pita DNA, SSRH403 menghasilkan lima pita DNA, dan SSRH 548 menghasilkan dua pita DNA. Sedangkan SSRH358 menghasilkan elektroforegram yang kurang jelas pemisahannya sehingga tidak diikutsertakan untuk analisis klon.

Pada Gambar 3. dapat dilihat bahwa dari lima primer seri gSS, yaitu gSS165, gSS194, gSS212, gSS213, dan gSS268, satu primer tidak menghasilkan pola DNA yang jelas, sehingga tidak digunakan dalam analisis lebih lanjut. Primer gSS165 menghasilkan tiga pita DNA dengan dua pita polimorfik, primer gSS194 menghasilkan enam pita DNA, lima pita di antaranya bersifat polimorfik, gSS213 menghasilkan tiga pita DNA polimorfik, gSS268 menghasilkan lima pita yang semuanya juga bersifat polimorfik. Sedangkan primer lainnya, yaitu gSS212 tidak menghasilkan pola DNA yang diskrit untuk setiap klon sehingga tidak digunakan dalam analisis klon. Pola elektroforegram hasil PCR menggunakan lima primer EHB menghasilkan 17 pita DNA total, 14 pita DNA di antaranya bersifat polimorfik, sedangkan empat primer HBE yang digunakan menghasilkan total 11 pita DNA, dengan tujuh pita DNA yang polimorfik (Gambar 4 dan 5). Secara rinci, jumlah pita DNA yang dihasilkan oleh setiap primer yang digunakan disajikan pada Tabel 3. Polimorfisme pita per primer bervariasi mulai dari 1-5 dengan jumlah pita polimorfis sebanyak 46. Primer gSS268 dan

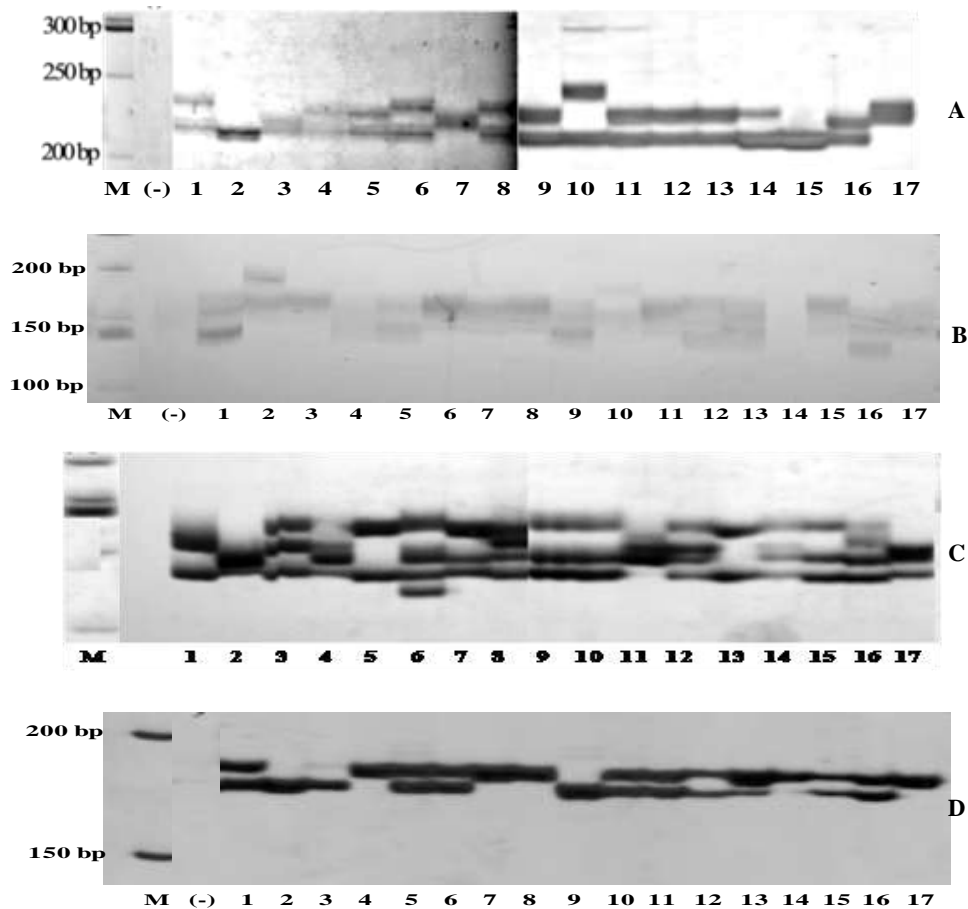


Gambar 1. Pola elektroforegram hasil amplifikasi DNA daun karet menggunakan primer SSRH403 pada (A) gel agarosa dan (B) gel SDS-poliakrilamida. (M= Marker 1 kb DNA ladder, (-)=kontrol negatif, 1= GT 1, 2= IRR 220, 3= PR 261, 4= IRR 112, 5= PB 5/51, 6= IRR 118, 7= PR 107, 8= IRR 104, 9= PB 260, 10= IAN 873, 11= IRR 5, 12= BPM 101, 13= RRIC 110, 14= PB 330, 15= PB 217, 16= PB 340, dan 17= RRIM 712).

Figure 1. Electrophoretic profile of amplification product of rubber leaf DNA using primer SSRH403 on (A) agarose gel and (B) SDS-polyacrylamide gel (M= 1 kb DNA ladder marker, (-)=negative control, 1= GT 1, 2= IRR 220, 3= PR 261, 4= IRR 112, 5= PB 5/51, 6= IRR 118, 7= PR 107, 8= IRR 104, 9= PB 260, 10= IAN 873, 11= IRR 5, 12= BPM 101, 13= RRIC 110, 14= PB 330, 15= PB 217, 16= PB 340, and 17= RRIM 712).

Tabel 3. Jumlah pita DNA yang dihasilkan oleh setiap primer dan nilai PIC yang dihasilkan.
Table 3. Number of DNA band produced by each primer and its PIC value.

Primer	Jumlah pita DNA		PIC
	Total	Polimorfis	
SSRH103	5	4	0.5802
SSRH358	-	-	-
SSRH403	5	4	0.7069
SSRH548	2	2	0.3719
gSSR165	3	2	0.5818
gSSR194	6	5	0.7183
gSSR212	-	-	-
gSSR213	3	3	0.5916
gSSR268	5	5	0.5066
EHB085	3	2	0.5229
EHB109	3	2	0.5307
EHB169	5	5	0.6559
EHB177	3	2	0.4563
EHB178	3	3	0.5112
HBE301	2	0	-
HBE316	3	2	0.5666
HBE329	5	4	0.6361
HBE280	1	1	0.0000
Total	57	46	-



Gambar 2. Profil elektroforesis hasil amplifikasi DNA karet menggunakan primer SSRH103 (A), SSRH358 (B), SSRH403 (C) dan SSRH 548 (D) (M= Marker 1 kb DNA ladder, (-)=kontrol negatif, 1= GT 1, 2= IRR 220, 3= PR 261, 4= IRR 112, 5= PB 5/51, 6= IRR 118, 7= PR 107, 8= IRR 104, 9= PB 260, 10= IAN 873, 11= IRR 5, 12= BPM 101, 13= RRIC 110, 14= PB 330, 15= PB 217, 16= PB 340, dan 17= RRIM 712)

Figure 2 *Electrophoretic profile of amplification product of Rubber DNA using primer SSRH103 (A), SSRH358 (B), SSRH403 (C) and SSRH 548 (D) (M= 1 kb DNA ladder marker, (-)=negative controlf, 1= GT 1, 2= IRR 220, 3= PR 261, 4= IRR 112, 5= PB 5/51, 6= IRR 118, 7= PR 107, 8= IRR 104, 9= PB 260, 10= IAN 873, 11= IRR 5, 12= BPM 101, 13= RRIC 110, 14= PB 330, 15= PB 217, 16= PB 340, and 17= RRIM 712)*

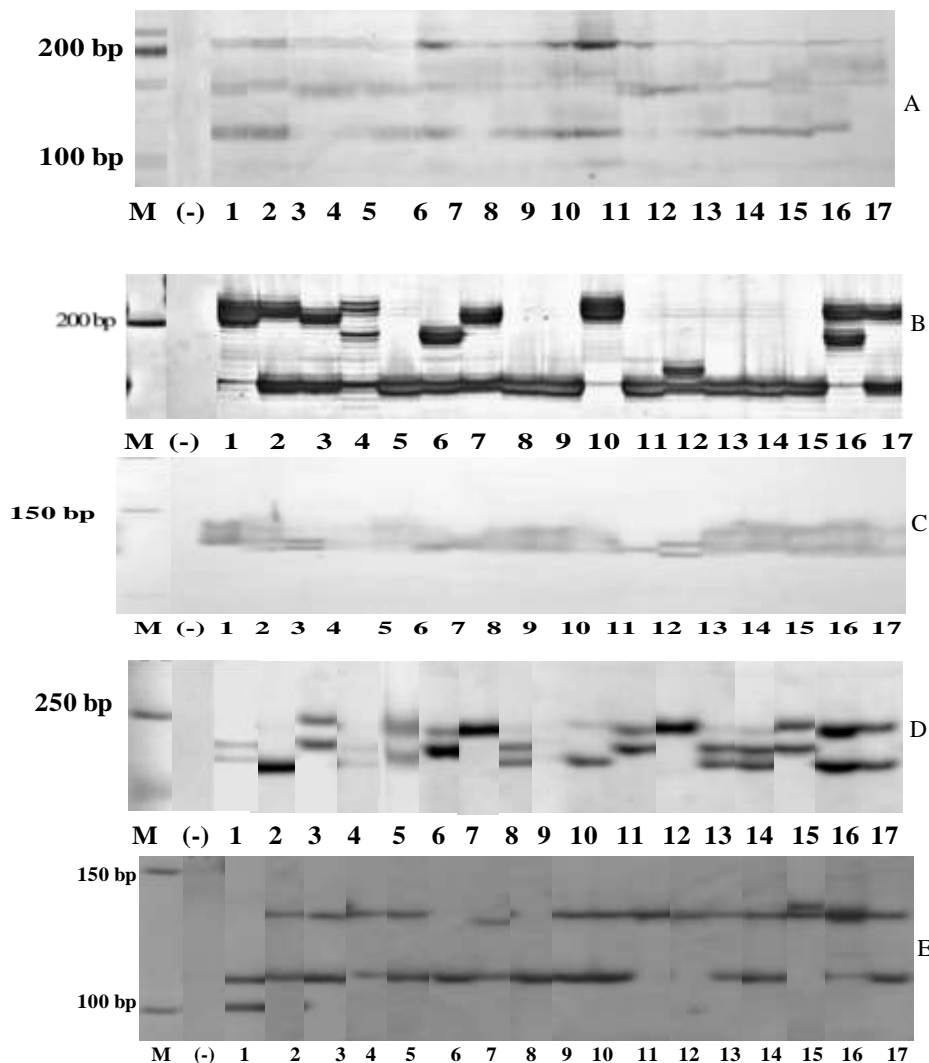
EHB169 merupakan primer yang menghasilkan pita polimorfis terbanyak yaitu lima pita. Primer HBE280 merupakan primer dengan jumlah pita polimorfis terendah yaitu satu pita (Tabel 3). Primer yang baik untuk membedakan klon adalah primer yang menghasilkan pita polimorfis. Optimasi konsentrasi gel dan besarnya tegangan diperlukan untuk menghasilkan pita yang jelas dan terpisah dengan sempurna.

Polymorphic Information Content (PIC)

Hasil perhitungan nilai PIC menunjukkan bahwa dari 16 primer yang digunakan dalam analisis pola DNANYa, satu primer yaitu HBE280 mempunyai nilai PIC=0 karena hanya menghasilkan satu pita DNA, sedangkan 15 primer lainnya mempunyai nilai PIC

antara 0.3719 sampai dengan 0.7183 (Tabel 3). Primer gSSR194 merupakan primer dengan nilai PIC paling tinggi yaitu 0.7183, sedangkan primer HBE280 merupakan primer dengan nilai PIC terendah yaitu 0. Nilai PIC dari primer SSRH358 dan primer gSSR212 tidak dapat dihitung karena hasil amplifikasi yang tidak terlihat dengan jelas.

Nilai PIC mencerminkan kemampuan marka dalam menghasilkan alel polimorfis (Hidayatun *et al.*, 2011), sehingga nilai tersebut diperlukan untuk memilih marka yang dapat membedakan antar klon yang digunakan (Mulsanti, 2011). De Vicente & Fulton (2003) mengemukakan bahwa nilai polimorfisme ditentukan oleh frekuensi kemunculan pita DNA atau alelnya. Oleh karena itu marka yang menghasilkan alel lebih sedikit memiliki kemampuan yang lebih



Gambar 3. Profil elektroforesis hasil amplifikasi DNA karet menggunakan primer gSS165 (A), gSS194 (B), gSS212 (C), gSS213 (D) dan gSS268 (E). M= Marker 1 kb DNA ladder, (-) = kontrol negatif, 1= GT 1, 2= IRR 220, 3= PR 261, 4= IRR 112, 5= PB 5/51, 6= IRR 118, 7= PR 107, 8= IRR 104, 9= PB 260, 10= IAN 873, 11= IRR 5, 12= BPM 101, 13= RRIC 110, 14= PB 330, 15= PB 217, 16= PB 340, dan 17= RRIM 712)

Figure 3. Electrophoretic profile of amplification product of rubber DNA using primer gSS165 (A), gSS194 (B), gSS212 (C), gSS213 (D) dan gSS268 (E). M= 1 kb DNA ladder marker, (-) = negative control, 1= GT 1, 2= IRR 220, 3= PR 261, 4= IRR 112, 5= PB 5/51, 6= IRR 118, 7= PR 107, 8= IRR 104, 9= PB 260, 10= IAN 873, 11= IRR 5, 12= BPM 101, 13= RRIC 110, 14= PB 330, 15= PB 217, 16= PB 340, dan 17= RRIM 712)

kecil untuk membedakan sampel yang diuji. Nilai PIC yang tinggi ditunjukkan pada marka yang menghasilkan banyak alel. Sejalan dengan itu, Emrani *et al.* (2011) menyatakan bahwa nilai PIC merupakan standar yang baik untuk mengevaluasi marka genetik.

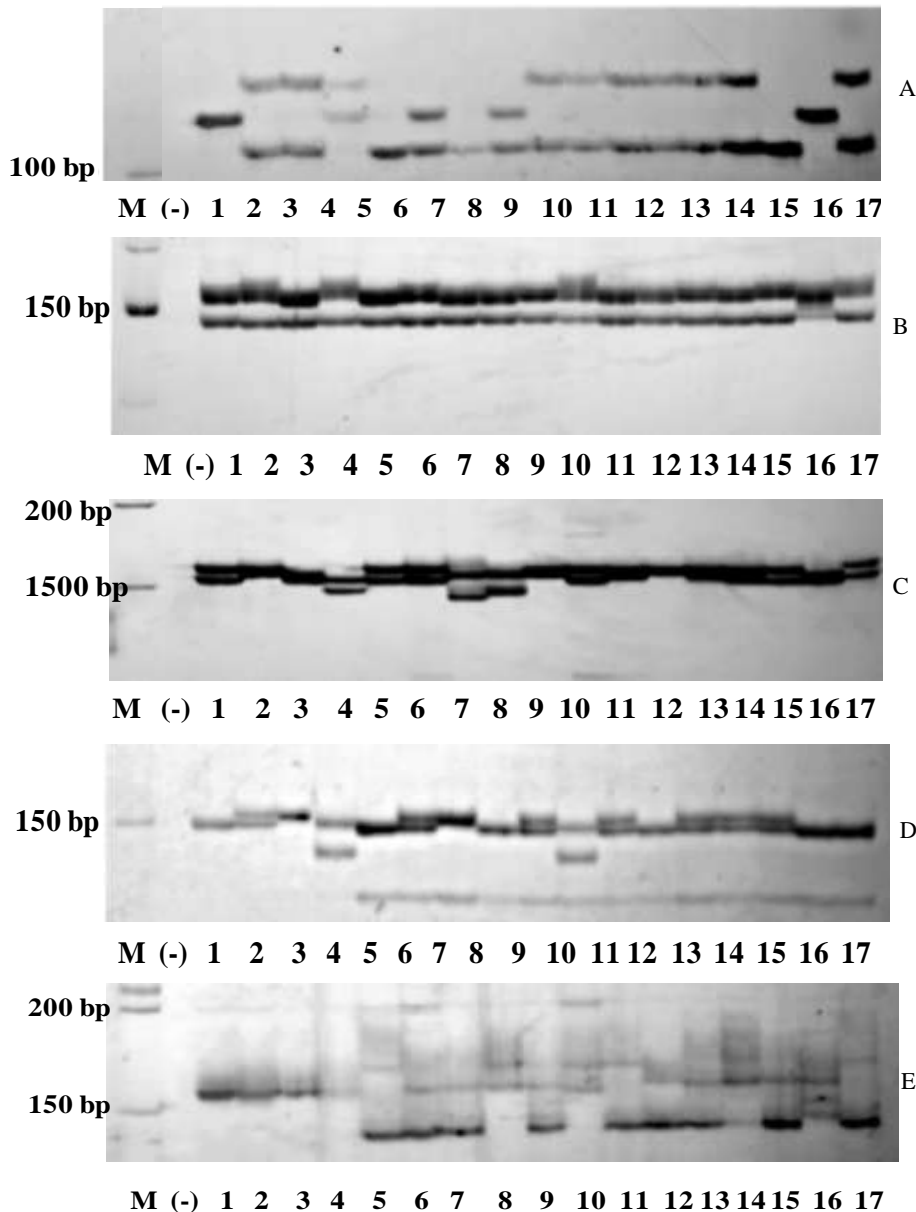
Skoring dan identifikasi marka spesifik

Identifikasi keragaman genetik klon-klon tanaman karet secara sederhana dapat dilakukan menggunakan analisis molekuler dengan skoring terhadap hasil

amplifikasi DNA marka SSR. Analisis tersebut disajikan pada Gambar 6 yang menunjukkan profil klon-klon tanaman karet yang dibedakan oleh 17 marka SSR yang diuji. Dibandingkan tampilan menggunakan tabel (+) dan (-), profil hierarki dengan kode warna memberikan gambaran umum terhadap tingkat polimorfisme yang lebih jelas antar klon tanaman karet yang diuji. Dari hasil skoring, total diperoleh 61 alel dari 17 marka SSR yang digunakan. Empat puluh dua

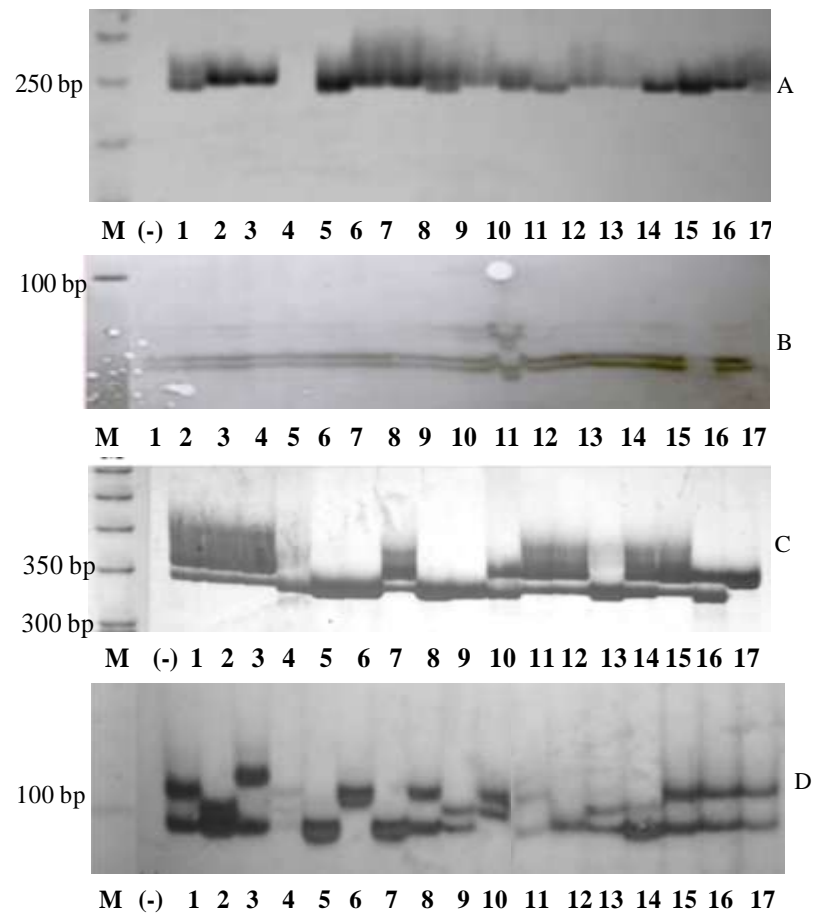
alel dari marka-marka SSR tersebut seperti gSSR165.1, HBE316.3, EHB109.3, HBE301.1, HBE301.2, SSRH548.1, gSSR268.4, SSRH403.4, SSRH103.4, gSSR165.2, HBE280.1, HBE329.4, EHB178.2, HBE316.2, HBE316.1, EHB177.2, EHB109.1, gSSR165.3, EHB169.1, gSSR213.3, EHB169.3, SSRH403.2, gSSR213.2, gSSR194.2, SSRH103.2, EHB085.2, HBE329.2, gSSR194.5, gSSR268.2, EHB085.1, EHB085.3, SSRH548.2,

EHB177.1, gSSR212.2, SSRH403.3, HBE329.3, EHB169.2, SSRH403.1, gSSR213.1, EHB109.2, gSSR194.6, EHB178.3 memperlihatkan amplifikasi positif pada 5 hingga 17 klon tanaman karet. Marka SSR tipe demikian dapat dikategorikan sebagai marka konstitutif. Hasil tersebut masih terhitung sedikit dibandingkan 501 alel pada total genom yang dibutuhkan untuk membedakan 34 varietas gandum (Zhang *et al*, 2002). Meskipun demikian, efektivitas



Gambar 4. Profil elektroforesis hasil amplifikasi DNA karet menggunakan primer EHB085 (A), EHB109 (B), EHB169 (C), EHB177 dan EHB178 (E). M= Marker 1 kb DNA ladder, (-)=kontrol negatif, 1= GT 1, 2= IRR 220, 3= PR 261, 4= IRR 112, 5= PB 5/51, 6= IRR 118, 7= PR 107, 8= IRR 104, 9= PB 260, 10= IAN 873, 11= IRR 5, 12= BPM 101, 13= RRIC 110, 14= PB 330, 15= PB 217, 16= PB 340, dan 17= RRIM 712).

Figure 4. Electrophoretic profile of amplification product of rubber DNA using primer EHB085 (A), EHB109 (B), EHB169 (C), EHB177 dan EHB178 (E). (M= 1 kb DNA ladder marker, (-)=negative control, 1= GT 1, 2= IRR 220, 3= PR 261, 4= IRR 112, 5= PB 5/51, 6= IRR 118, 7= PR 107, 8= IRR 104, 9= PB 260, 10= IAN 873, 11= IRR 5, 12= BPM 101, 13= RRIC 110, 14= PB 330, 15= PB 217, 16= PB 340, dan 17= RRIM 712).



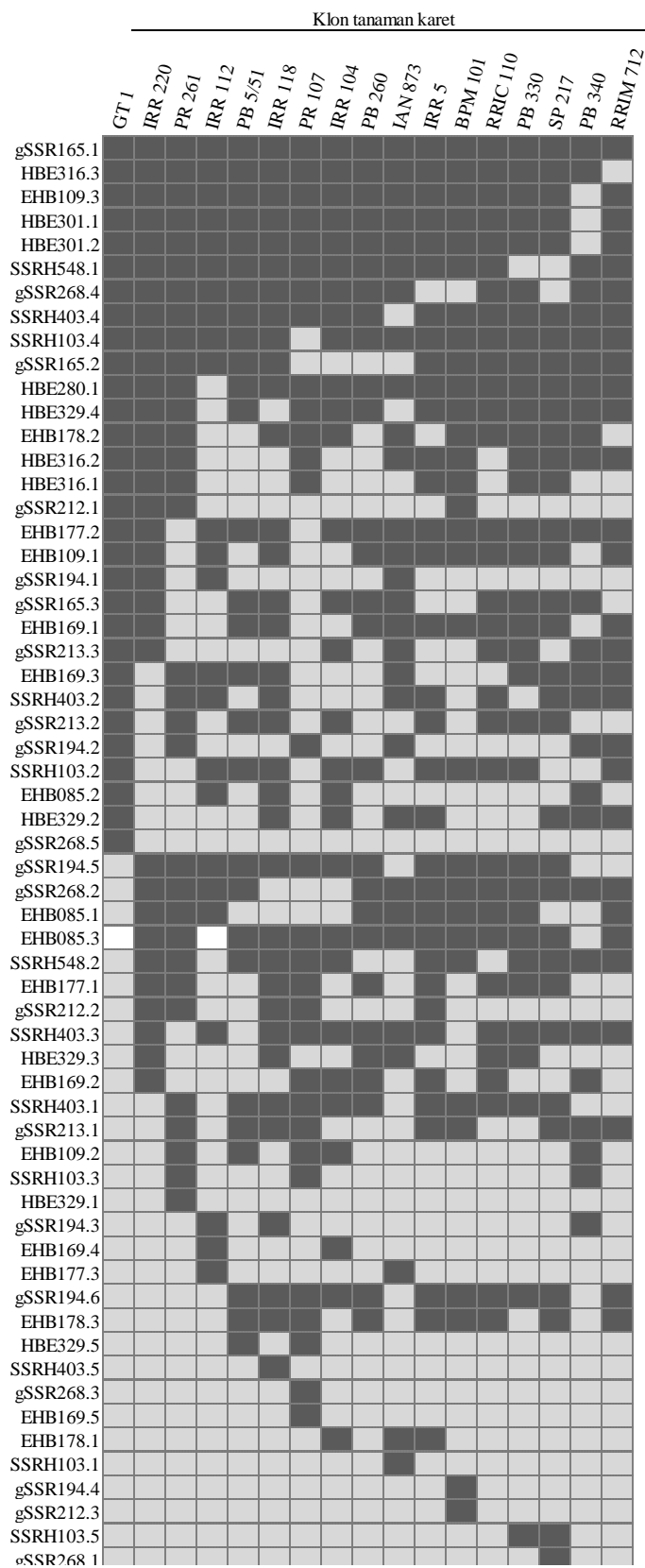
Gambar 5. Profil elektroforesis hasil amplifikasi DNA karet menggunakan primer HBE280 (A), HBE301 (B), HBE316 (C), dan EHB329 (D). M= Marker 1 kb DNA ladder, (-)=kontrol negatif, 1= GT 1, 2= IRR 220, 3= PR 261, 4= IRR 112, 5= PB 5/51, 6= IRR 118, 7= PR 107, 8= IRR 104, 9= PB 260, 10= IAN 873, 11= IRR 5, 12= BPM 101, 13= RRIC 110, 14= PB 330, 15= PB 217, 16= PB 340, dan 17= RRIM 712).

Figure 5 Electrophoretic profile of amplification product of rubber DNA using primer HBE280 (A), HBE301 (B), HBE316 (C), and EHB329 (D). (M= 1 kb DNA ladder Marker, (-)=negative control, 1= GT 1, 2= IRR 220, 3= PR 261, 4= IRR 112, 5= PB 5/51, 6= IRR 118, 7= PR 107, 8= IRR 104, 9= PB 260, 10= IAN 873, 11= IRR 5, 12= BPM 101, 13= RRIC 110, 14= PB 330, 15= PB 217, 16= PB 340, dan 17= RRIM 712.

dan efisiensi marka SSR yang digunakan dalam penelitian ini telah teruji. Di sisi lain, 11 marka SSR (SSRH 103, SSRH403, gSSR165, gSSR194, gSSR268, EHB 085, EHB109, EHB169, EHB 178, HBE 316, HBE 329) hanya muncul pada 1 klon karet saja. Marka tipe ini dapat dikategorikan sebagai marka spesifik dan dapat digunakan sebagai penanda dari klon bersangkutan.

Data skoring Gambar 6 tersebut kemudian dijabarkan dan diseleksi marka yang spesifik untuk klon tertentu (Tabel 4). Dari Tabel tersebut, dapat dilihat bahwa marka SSRH 103.3 spesifik untuk klon PR 107, SSRH 103.4 spesifik untuk klon IRR 220, SSRH 103.1 dengan SSRH 103.4 spesifik untuk klon IAN 875 dan seterusnya. Dari Tabel 4 juga dapat diidentifikasi marka SSR spesifik untuk masing-masing

klon. Sebagai contoh, klon PR 107 dapat diidentifikasi dengan menggunakan marka SSRH 103.3, gSSR 165.1, gSSR194.2 + 5 + 6, gSSR268.3 + 4, dan EHB169.2 + 6. Klon GT1 dapat diidentifikasi menggunakan marka SSRH403.2 + 4 dan gSSR268.4 + 5. Demikian seterusnya dengan cara yang sama dapat diidentifikasi marka SSR lain untuk identifikasi klon klon lainnya. Dari Tabel tersebut juga dapat dilihat bahwa dari 17 klon yang dianalisis, 4 dari 18 primer (SSRH 103, SSRH403, gSSR194, EHB169) yang diuji dapat mengidentifikasi 12 klon yang dianalisis, yaitu PR 107, PR 261, SP 217, PB 330, PB 340, IRR 5, IRR 112, IRR 118, IRR 220, GT 1, BPM 101 dan RRIM 712. Masing-masing klon tersebut dapat dibedakan dari klon lainnya hanya dengan menggunakan satu jenis primer.



Gambar 6. Profil skoring marka SSR pada 17 klon tanaman karet. Warna hitam menunjukkan hasil amplifikasi positif; warna abu-abu menunjukkan hasil negatif. Data tidak teridentifikasi ditampilkan dalam warna putih. Angka setelah titik pada marka SSR, menunjukkan nomor pita.

Figure 6. Scoring profile of SSR markers in 17 rubber tree clones. Black colour showed positive amplification as opposed to gray colour for negative amplification. Non determined data were shown in white. Band number was shown after point in SSR marker name.

Tabel 4. Marka SSR hasil amplifikasi yang memberikan pola spesifik klon-klon tanaman karet.
 Table 4. SSR markers resulted from PCR amplification which give specific pattern of rubber tree clones.

Primer	No. alel				Klon	
SSRH 103					3	PR 107
					4	IRR 220
			1	4		IAN 873
			4	5		SP 217
			2	4	5	PB 330
SSRH403			1	2	4	PR 261
			2	4		GT 1
			2	3		IAN 873
			3	4		IRR 220
	1	2	3	4	5	IRR 118
gSSR165					1	PR 107
gSSR194			1	5		IRR 220
			2	5		PR 261
	1	3	5			IRR 112
	3	5	6			IRR 118
	2	5	6			PR 107
	4	5	6			BPM 101
	2	3				PB 340
gSSR268			2	6		RRIM 712
			1	2		SP 217
			3	4		PR 107
EHB 085			4	5		GT 1
EHB109			1	2		IRR 112
EHB169			2			PB 340
			1			BPM 101
			3			PR 261
			2	3		PB 340
			3	4		IRR 112
			2	4		IRR 104
EHB 178			2	5		PR 107
HBE 316			1	3		IRR 5
HBE 329			2			RRIM 712
			1	4		PR 261
			4			BPM 101

Dari Tabel 4 juga menunjukkan bahwa dengan menggunakan 11 primer (SSRH 101, SSRH 403, gSSR165, gSSR194, gSSR268, EHB 085, EHB109, EHB169, EHB 178, HBE 316, dan HBE 329, sebanyak 14 klon dapat diidentifikasi. Atau dengan kata lain, sidik jari DNA dari 14 klon yang diuji telah diperoleh. Sedangkan identifikasi tiga klon lainnya,

yaitu PB 5/51, PB 260, dan RRIC 110 harus dilakukan dengan menggabungkan hasil PCR menggunakan beberapa primer. Sebagai contoh identifikasi PB 5/51, harus dilakukan dengan menggunakan gabungan paling tidak dua primer SSR (SSRH403 dan HBE329), dan marka identitasnya adalah SSRH403.1 + 4 bersama dengan HBE329.4 + 5.

Szewe-McFadden *et al.* (1996) menyatakan bahwa penggunaan primer SSR sebanyak 10-20 memungkinkan untuk membedakan sejumlah genotip yang berkerabat dekat karena kemampuan menghasilkan polimorfisme yang tinggi. Namun Zhang *et al.* (2002) mendemonstrasikan tidak adanya jumlah pasti dari marka SSR yang digunakan. Untuk spesies tanaman karet yang memiliki panjang genom ~ 2 GB, semakin banyak marka SSR akan semakin baik untuk membedakan keragaman genetik dari klon-klon tanaman karet (Li *et al.*, 2012). Oleh karena itu, meskipun hasil percobaan ini menunjukkan bahwa marka SSR yang digunakan sangat berpotensi sebagai sidikjari DNA klon-klon karet, namun primer yang sama perlu diuji untuk klon-klon lainnya yang belum diuji pada penelitian ini. Demikian pula primer lain perlu dicoba untuk mengidentifikasi klon-klon yang belum teridentifikasi menggunakan 18 primer dalam penelitian ini.

Kesimpulan

Sidikjari DNA berbasis marka SSR untuk 14 klon karet, yaitu PR 107, PR 261, SP 217, PB 330, PB 340, IRR 5, IRR 112, IRR 118, IRR 220, GT 1, BPM 101, RRIM 712, IRR 104 dan IAN 873 telah diperoleh. Empat primer SSR, yaitu SSRH 103, SSRH403, gSSR194, EHB169, cukup untuk mengidentifikasi 12 klon karet yang dianalisis, yaitu PR 107, PR 261, SP 217, PB 330, PB 340, IRR 5, IRR 112, IRR 118, IRR 220, GT 1, BPM 101 dan RRIM 712.

Daftar Pustaka

- Aggarwal RK, PS Hendre, RK Varshney, PR Bhat, V Krishnakumar & L Singh (2007). Identification, characterization and utilization of EST-derived genic microsatellite markers for genome analyses of coffee and related species. *Theor Appl Genet* 114, 359-72.
- Anonim (2010). *Statistik Perkebunan Indonesia 2009-2011: Karet*. Jakarta, Sekretariat Direktorat Jenderal Perkebunan. 46p.
- Brantestam AK, RV Bothmer, C Dayteg, I Rashal, S Tuveesson & J Weibull (2007). Genetic diversity changes and relationships in spring barley (*Hordeum vulgare* L.) germplasm of Nordic and Baltic areas as shown by SSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54, 749-58.
- Corley RHV (2005). Illegitimacy in oil palm breeding - a review. *J Oil Palm Res* 17, 64-9.
- Diputra IM (2013). Keragaman genetik *Pinus merkusii* Jungh. et Ed Vriese strain Tapanuli berdasarkan penanda mikrosatelit *Skripsi*. Bogor, Institut Pertanian Bogor.
- Elshire RJ, JC Glaubitz & Q Sun Q (2011). A robust, simple genotyping-by-sequencing (gbs) approach for high diversity species. *PLoS ONE* 6, e19379.
- Feng SP, WG Li, HS Huang, JY Wang & YT Wu (2009) Development, application and cross-species/genera transferability of EST-SSR makers for rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Mol Breed* 23 (1), 85-97.
- García IR, SSM González, DC Montoya & F Aristizabal (2011). Identification in silico of SSR markers for genotyping *Hevea* sp. clone gardens in Colombia. *Agr Colombiana* 29, 359-366.
- Gouvêa LRL, LB Rubiano, AF Chioratto, A Fernando, MI Zucchi & Paulo DSG (2010). Genetic divergence of rubber tree estimated by multivariate techniques and microsatellite markers. *Genet and Mol Biol* 33, 308-18.
- Gupta PK & RK Varshney (2000). The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica* 113, 163-85.
- Hao CY, XY Zhang, LF Wang, YS Dong, XW Shang & JZ Jia (2006). Genetic diversity and core collection evaluations in common wheat germplasm from the Northwestern spring wheat region in China. *Mol Breed* 17, 69-77.
- Hasan M, F Seyis, AG Badani, J Pons-Kuhnemann, W Friedt, W Luhs & RJ Snowdon (2006) Analysis of genetic diversity in the *Brassica napus* L. gene pool using SSR markers. *Genet Res and Crop Evolution*, 53 (4), 793- 802.
- Ilbi H (2003). RAPD markers assisted varietal identification and genetic purity test in pepper, *Capsicum annum*. *Sci Hort* 97, 211-21.
- Li D, Z Deng, B Qin, X Liu & Z Men (2012) De novo assembly and characterization of bark transcriptome using Illumina sequencing and development of EST-SSR markers in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). *BMC Genom*, 13, 192.
- Liu JC, L Liu, N Hou, A Zhang & CG Liu (2007) Genetic diversity of wheat gene pool of recurrent selection assessed by microsatellite markers and morphological traits. *Euphytica* 155 (1-2), 249-258.
- Marco M, PI Luca, LSB Nadia & V Vincenzo (2007) Genetic diversity assessment in Somali sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) accessions using microsatellite markers. *Biodivers Conser* 16 (6), 1715-1730.
- Mulsanti IW (2011). Identifikasi dan evaluasi kemurnian genetik benih padi hibrida menggunakan marka mikrosatelit. *Tesis*. Bogor, Institut Pertanian Bogor.
- Nagy S, P Pocza, I Cernak, AM Gorji, G Hegedus & J Taller (2012). PICcalc: an online program to calculate polymorphic information content for molecular genetic studies. *Biochem Genet* 50, 670-672.
- Orozco-Castillo C, KJ Chalmers, R Waugh & W Powell (1994). Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. *Theor Appl Genet* 87, 934-40.

- Pootakham W, J Chanprasert, N Jomchai, D Sangsrakru, T Yoocha, S Tragoonrung & S Tangphatsornruang. (2012). Development of genomic-derived simple sequence repeat markers in *Hevea brasiliensis* from 454 genome shotgun sequences. *Plant Breed* 131, 555–562.
- Prince JP, VK Lackney, C Angeles, JR Blauth & MM Kyle. (1995). A survey of DNA polymorphism within the genus *Capsicum* and the fingerprinting of pepper cultivars. *Genome* 38, 224-231.
- Saha T, CB Roy & MA Nazeer (2005) Microsatellite variability and its use in the characterization of cultivated clones of *Hevea brasiliensis*. *Plant Breed* 124 (1), 86-92.
- Semagn K, A Bjornstad & MN Ndjiondjop (2006). An overview of molecular marker methods for plants. *African J Biotechnol* 5(25), 2540-2568.
- Struss D & J Plieske (1998) The use of microsatellite markers for detection of genetic diversity in barley populations. *Theor Appl Genet* 97, 308-315.
- Szewc-McFadden AK, S Kresovich, SM Bliet, SE Mitchell & JR McFerson (1996) Identification of polymorphic, conserved simple sequence repeats (SSRs) in cultivated *Brassica* species. *Theor Appl Genet* 93, 534-538.
- Tams SH, E Bauer, G Oettler & AE Melchinger (2004) Genetic diversity in European winter triticale determined with SSR markers and coancestry coefficient. *Theor Appl Genet*, 108(7), 1385–1391.
- Triwitayakorn K,P Chatkulkawin & S Kanjanawattanawong (2011). Transcriptome sequencing of *Hevea brasiliensis* for development of microsatellite markers and construction of a genetic linkage map. *DNA Res* 18, 471-82.
- Yu F, BH Wang, SP Feng, JY Wang, WG Li & YT Wu (2011) Development, characterization, and cross-species/genera transferability of SSR markers for rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Plant Cell Rep.* 30(3), 335– 344.
- Zhang X, C Li, L Wang, H Wang, G You & Y Dong (2002) An estimation of the minimum number of SSR alleles needed to reveal genetic relationships in wheat varieties. I. Information from large-scale planted varieties and cornerstone breeding parents in Chinese wheat improvement and production. *Theor Appl Genet* 106, 112-117.