

Dosen:
Prof Dr Ir Rudy C Tarumingkeng, M F (Penanggung Jawab)
Prof. Dr. Ir. Zahrial Coto, M.Sc
Dr. Ir. Hardjanto, M.S

PEMANFAATAN MARKA MOLEKULER UNTUK IDENTIFIKASI VARIETAS TANAMAN DALAM BIDANG PEMULIAAN TANAMAN

Oleh

Marcia Bunga Pabendon

A361040111/AGR

marciapabendon@hotmail.com

Pendahuluan

Telah banyak varietas unggul yang dilepas dari berbagai komoditas tanaman. Varietas unggul yang dihasilkan dari kegiatan pemuliaan tanaman berdampak pada peningkatan produksi, dan peningkatan kualitas dari suatu komoditas tanaman. Pada era sebelumnya arah pelepasan varietas lebih diprioritaskan pada peningkatan produksi tanaman. Namun ke depan, dengan semakin ketatnya persaingan utamanya untuk mengantisipasi era globalisasi, maka bukan hanya kuantitas dari produksi tetapi kualitas dan preferensi konsumen yang akan sangat menentukan untuk pelepasan suatu produk tanaman .

Pada umumnya para pemulia selalu berusaha untuk mendapatkan dan mengembangkan varietas yang mempunyai keunikan atau kelebihan-kelebihan tertentu yang dapat ditawarkan dan mempunyai nilai kompetitif yang tinggi. Penggunaan varietas unggul seperti varietas hibrida merupakan salah satu teknologi yang digunakan untuk memperoleh produksi tinggi. Untuk itu diperlukan teknik untuk mengidentifikasi dan memverifikasi kemurnian suatu benih sehingga kualitasnya dapat terjaga. Secara

konvensional, biasanya suatu varietas tertentu diidentifikasi dan diverifikasi kemurniannya berdasarkan sifat-sifat morfologinya. Namun yang menjadi permasalahan adalah varietas-varietas yang berasal dari galur berkerabat dekat seringkali memperlihatkan karakteristik yang sama, bahkan pada kondisi yang spesifik pun kadang-kadang penampilannya sama. Masalah lain yang sering dihadapi para pemulia tanaman adalah sering dijumpai varietas-varietas di tempat lain dengan nama yang sama tetapi mungkin berbeda dan bahkan tidak berkerabat tetapi secara fenotipik sukar untuk dibedakan. Korzun, (2003) menyatakan bahwa integrasi pemuliaan konvensional dengan perkembangan teknik molekuler dalam aplikasinya di lapangan masih kurang.

Tipe materi genetik

Genetik material dari tanaman terletak dalam DNA, suatu rantai ganda yang merupakan nukleotida yang link di dalam inti pada setiap sel. Sekuens tiga nukleotida membentuk suatu triplet, dan seri-seri spesifik dari triplet membentuk gen. Gen-gen ini secara fisik merupakan unit-unit fungsional dari hereditas. Posisi gen pada kromosom disebut lokus dan setiap bentuk yang berbeda dari lokus spesifik disebut alil (Griffiths *et al.*, 1993). Selain coding region dari kromosom masih ada sejumlah besar DNA yang sejauh ini diketahui tidak terekspresi.

Kombinasi gen dari suatu individu adalah genotipe. Secara individu pada kondisi pertumbuhan dan lingkungan yang spesifik, tidak semua gen dapat terekspresi. Ekspresi genotipe disebut fenotipe dan dapat dipertimbangkan sebagai hasil dari interaksi antara genotipe dan lingkungan dimana individu berkembang. Sebagai contoh perbedaan genotipe antara tanaman dan resistensi penyakit hanya akan terekspresi jika ada tekanan infeksi untuk penyakit, genotipe toleran kekeringan, hanya dapat terekspresi pada stress kekeringan.

Tanaman umumnya berada dalam grup, yang disebut populasi. Populasi dapat terdiri dari berbagai macam genotipe yang berbeda. Mempertahankan heterogenitas merupakan strategi umum dari sejumlah populasi untuk bertahan pada berbagai kondisi. Hal tersebut tidak hanya diaplikasikan pada populasi liar tapi juga pada *landraces*. *Landraces* juga biasa disebut sebagai varietas petani yang pada umumnya populasi

tanamannya adalah heterogenus yang ditanam oleh petani-petani tradisional. Heterogenitas di antara landraces merupakan buffer untuk perbedaan kondisi pertumbuhan di areal petani dan di antara musim tanam. Pada beberapa kondisi sejumlah tanaman dapat tumbuh subur sementara pada kondisi lain tumbuh kerdil atau mati. Sebagai akibatnya bahwa populasi ini tidak stabil. Komposisinya bervariasi berdasarkan musim dan kondisi petani.

Varietas komersial merupakan hasil dari pemuliaan tanaman modern dimana pada umumnya populasinya homogenus secara genetik, adaptasinya tinggi terhadap keseragaman yang dapat dikontrol oleh manusia pada kondisi pertumbuhan. Homogenitas ini bukan hanya merupakan hasil seleksi secara ekstrim dari genotipe yang paling bagus, tetapi juga melalui rekrutmen untuk mendapatkan '*Plant Breeder Right*'. Selanjutnya para pemulia harus meyakinkan bahwa varietas mereka homogenus. Hal tersebut dilakukan melalui beberapa cara antara lain :

- Melalui seleksi genotipe homozigous, misalnya genotipe yang mempunyai hanya 1 alil per lokus dan diperbanyak. Varietas homosigous sudah umum misalnya untuk tanaman sereal seperti gandum dan barley,
- Melalui seleksi dan propagasi vegetatif suatu genotipe. Varietas yang merupakan hasil propagasi secara vegetatif seperti kentang, tanaman pohon dan tanaman-tanaman hias. Varietas homosigous dan propagasi vegetatif merupakan populasi yang stabil, misalnya turunannya secara genetik identik terhadap tetuanya.

Langkah alternatif untuk menghasilkan varietas homogenus adalah:

- Dengan menghasilkan hibrida. Hibrida adalah merupakan produk pertama hasil persilangan genotipe homosigous, yang selalu mempunyai satu alil per lokus dari masing-masing tetua. Varietas hibrida sudah umum untuk jagung dan sayur-sayuran. Jika alil dari turunan generatif dari varietas hibrida bersegregasi, maka varietas ini menjadi tidak stabil dan perlu untuk di reproduksi kembali dari galur-galur inbrida asalnya.

Ada juga varietas hibrida yang tidak 100% homogenus misalnya varietas dari hasil persilangan tanaman menyerbuk silang dan tanaman menyerbuk sendiri misalnya *rye grass*. Untuk registrasi varietas-varietas tanaman ini, mana yang

tercampur dari genotipe inbriding, level minimum dari homogenitas untuk karakter yang bagus, harus disempurnakan.

Teknik klasik dan modern untuk identifikasi tanaman

Penentuan karakteristik merupakan hal yang krusial dalam deskripsi tanaman. Karakteristik yang paling tua dan paling umum digunakan adalah sifat morfologi dan fisiologi seperti bentuk batang dan daun, ada atau tidak ada bulu, waktu berbunga, ketahanan penyakit dan lain-lain. Sifat-sifat ini sekarang digunakan untuk registrasi varietas. Kerugian menggunakan tipe ini adalah ekspresinya sangat bervariasi terhadap kondisi lingkungan. Pengaruh ini dapat dihindari jika hanya menggunakan karakter morfologi kualitatif yang monogenik (seperti yang dilakukan Mendel pada awal percobaannya pada *pea*). Sifat-sifat ini langsung menunjukkan genotipe tanaman, tetapi kelemahannya adalah hanya beberapa dari karakter tersebut yang tersedia.

Marka biokimia seperti *isozyme* dan *storage protein*, dapat memperpanjang daftar marka kualitatif. Selain kurang dipengaruhi oleh kondisi pertumbuhan tanaman seperti karakter kuantitatif, kelebihan lain dari marka ini adalah pelaksanaannya relatif murah dan cepat dan materi yang dapat digunakan seperti biji, bulb atau umbi, yang menyebabkan lebih cocok untuk identifikasi varietas. Namun kadang-kadang marka biokimia kadang-kadang tidak menunjukkan perbedaan yang nyata di antara genotipe-genotipe yang diuji. Dalam kasus ini maka marka molekuler dapat digunakan.

Marka molekuler ditentukan secara langsung pada materi genetik yaitu DNA itu sendiri. Dengan demikian hasil yang diperoleh dari teknik marka molekuler secara total independen dari pengaruh lingkungan dimana materi tersebut ditanam. Pada akhir dua dekade ini beberapa teknik marka molekuler telah dikembangkan yang mampu mengkarakterisasi materi genetik, menghasilkan variasi yang luas dari marka-marka baru yang menunjukkan keragaman pada berbagai level perbedaan. Teknik baru yang mempunyai kemampuan tinggi ini perlu untuk dikaji lebih banyak. Tekniknya dapat dibagi dalam:

- kelompok yang hanya menggambarkan genotipe tanpa melihat sifat lain

- kelompok yang hanya menjelaskan bagian spesifik dari genom, biasanya berdasarkan marka-marka yang mendeteksi DNA yang linked dengan sifat yang diinginkan tetapi tidak mendeteksi DNA yang menyandi sifat itu sendiri
- Kelompok yang mengkarakterisasi gen yang diinginkan itu sendiri.

Teknik-teknik ini didasarkan pada tiga prinsip deteksi yaitu: (1) hibridisasi *Southern*; (2) *polymerase chain reaction* (PCR); dan (3) DNA sekuensing. Semua metode ini mempunyai kelebihan dan kekurangan yang spesifik.

Beberapa hasil penelitian yang berkaitan dengan identifikasi varietas tanaman

Akhir-akhir ini marka berbasis DNA yang secara langsung membandingkan materi genetik antar individu tanaman cukup intensif dilakukan. Sistem ini telah merevolusi bidang pemetaan genetik yang antara lain dapat digunakan untuk menjawab pertanyaan-pertanyaan yang berhubungan dengan keragaman genetik, klasifikasi dan filogeni yang berhubungan dengan pengelolaan plasma nutfah, dan sebagai alat bantu dalam pemuliaan dan seleksi melalui penandaan gen. Mikrosatelit dan minisatelit misalnya, telah digunakan dalam sidik jari DNA untuk mendeteksi variasi genetik, identifikasi varietas dan *genotyping*. Mikrosatelit adalah salah satu marka molekuler berbasis DNA yang mempunyai sekuen DNA sederhana, terdiri dari 2-6 pasang basa yang berulang sehingga sering disebut juga dengan *Simple Sequence Repeats* (SSRs) (Jacob *et al.*, 1991). Mikrosatelit ini banyak dijumpai pada genom eukaryotik dan umumnya terdistribusi secara merata pada genom organisme tertentu. Urutan berulang-ulang tersebut membentuk motif yang unik pada suatu jenis organisme. Marka ini bersifat kodominan dan dapat mendeteksi keragaman alel pada level tinggi serta mudah dan relatif ekonomis dalam aplikasinya karena menggunakan teknik PCR.

Marka mikrosatelit dapat digunakan untuk mengidentifikasi dan memverifikasi suatu varietas tanaman (Nunome *et al.*, 2003; Vosman *et al.*, 2001). Informasi ini berguna untuk kuantifikasi keragaman genetik, karakterisasi aksesori pada koleksi plasma nutfah tanaman, dan studi taksonomik. Aplikasi mikrosatelit yang pertama pada tanaman berupa identifikasi varietas seperti pada jagung (Chin *et al.*, 1996; Senior *et al.*, 1996; Senior *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1997), pada padi (Garland *et al.*, 1999). Hal ini penting dilakukan

khususnya untuk proteksi hak pemilikan plasma nutfah. Hal serupa juga untuk pemanfaatan marka mikrosatelit dalam analisis pedigree.

Marka DNA telah digunakan secara ekstensif dalam sidik jari genotipe. Peta-pola pita merupakan metode yang sangat tepat dan jelas dalam menjelaskan sidik jari DNA secara individual. Dari satu peta dapat diperoleh frekuensi pola pita dan di pihak lain informasi mengenai dengan jumlah pita. Peta-pola pita secara jelas mengilustrasikan frekuensi produk secara aktual dan kejadian yang sama dalam studi aksesori yang lain. Metode ini yang memfasilitasi identifikasi marka spesifik pada suatu kelompok atau taksa tertentu (Powel *et al.*, 1991). Sidik jari DNA dalam aplikasinya juga bermanfaat dalam penentuan kemurnian benih, dalam resolusi mengenai ketidakjelasan tetua, untuk proteksi secara legal dari varietas yang telah maju, dan di dalam uji genetik (Weising *et al.*, 1998; Caetano-Anolles *et al.*, 1991). Keragaman genetik yang menggunakan marka molekular juga telah banyak diaplikasikan di dalam studi biodiversitas, identifikasi varietal, dan analisis filogenetik (Rogstad, 1996; Pecchioni *et al.*, 1996; Waugh, 1992).

Zawko (2003), melakukan identifikasi varietas gandum berbasis protein (MALDI-TOF) dan DNA (mikrosatelit) yang bertujuan mengembangkan metode pengujian secara rutin untuk idendifikasi varietas dan mencari metode yang cepat untuk varietas yang bersegregasi dalam mengetahui kualitas dan kemurniannya. Dari hasil tersebut disimpulkan bahwa varietas yang dilepas tidak 100% seragam secara genetik. Dikemukakan juga bahwa sidik jari menggunakan mikrosatelit membutuhkan waktu lebih banyak tetapi hasil yang diperoleh akurasinya lebih tinggi dibandingkan marka yang berbasis protein. Yashitola *et al.* (2002) mendeteksi kemurnian padi hibrida menggunakan marka mikrosatelit dan STS (*Secuence Tagged Site*) dan mereka memperoleh hasil bahwa tingkat heterosigositas di antara galur-galur tetua dari padi hibrida dapat ditentukan dan marka mikrosatelit adalah marka yang lebih tepat untuk mengetahui tingkat kemurnian benih hibrida. Liu *et al.* (2003) mengamati struktur genetik dan keragaman 260 galur inbrida yang merupakan galur-galur esensial untuk pemuliaan di daerah *temperate*, tropik dan sub-tropik menggunakan 94 lokus mikrosatelit. Hasil analisis klaster menghasilkan empat klaster sesuai dengan asal koleksi dan satu kelompok terdiri dari campuran galur-galur asli (*mixed origin*). Konstruksi diagram

pohon filogenetik untuk penentuan struktur genetik galur-galur inbrida menunjukkan kesesuaian yang baik antara informasi pedigree dan hasil analisis klaster.

Aspek kepemilikan legal

Sejak awal pertanian, petani telah berperan utama di dalam domestikasi dan pengembangan varietas, yang umumnya diarahkan sebagai '*landraces*', melalui proses alami dan seleksi manusia. Hal tersebut yang menyebabkan tanaman-tanaman *landraces* mampu beradaptasi pada lingkungan yang luas dan bervariasi serta jauh dari tempat distribusi awal, dalam hal ini menyangkut ekosistem, lingkungan dan geografi. *Landraces* telah umum digunakan sebagai salah satu sumber plasma nutfah dan pada umumnya bebas untuk ditukarkan di antara petani atau kelompok petani sebagai tanaman yang diintroduksi ke suatu daerah baru yang selanjutnya berkembang. Di sebagian besar dunia sistem ini masih beroperasi dan berlanjut di dalam suatu proses pengaturan, pemeliharaan dan pengembangan keragaman genetik sebagai bagian dari sistem pertanian praktis dan pengetahuan yang indigenous.

Pengetahuan tentang genetik memberikan dukungan *scientific* pada pemuliaan tanaman di awal abad ini. Hal ini berlanjut secara lebih simultan dibandingkan produksi industri pupuk yang kemudian menyusul kontrol kimia untuk hama dan penyakit. Perkembangan ini secara fundamental mengubah peranan dan pemanfaatan keragaman genetik di dalam sistem produksi pertanian. Pada pertanian tradisional, *landraces* diadaptasikan pada lingkungan lokal yang berbeda. Tujuan utama lebih mengarah pada keamanan hasil dan keberlanjutan dari pada memaksimalkan produksi. Keragaman genetik di dalam dan di antara tanaman merupakan pemanfaatan utama untuk sistem seperti ini yang akhirnya mengarah kepada adaptasi variasi lingkungan terhadap waktu dan lokasi. Oleh sebab itu suatu sistem seperti keragaman genetik yang ditangani secara alami merupakan komponen yang esensial. Pada pertanian modern, lingkungan produksi menjadi perhatian utama yang diadaptasikan terhadap kebutuhan tanaman melalui input eksternal (pemupukan, irigasi, proteksi kimia tanaman) untuk memastikan keamanan hasil. Menurunnya kebutuhan terhadap adaptasi dan kondisi lingkungan lokal dan selanjutnya mengarah pada keragaman genetik di antara varietas. Oleh karena pemulia tanaman dapat berkonsentrasi pada peningkatan potensi hasil secara genetik utamanya dalam mengembangkan varietas yang seragam menyebabkan input eksternal lebih baik

dalam menghasilkan produk panen. Dalam proses ini pertanian modern menjadi bagian integral dari industri yang kompleks.

Komersialisasi pemuliaan tanaman pada beberapa negara industri, membutuhkan modal swasta dan pemilikan legal hasil pemuliaan tanaman yang menjadi isu. Hal tersebut yang menyebabkan berkembangnya undang-undang '*Plant Breeder Right*' (PBR). Jumlah negara yang mengadopsi sejumlah model PBR meningkat secara gradual di akhir abad ke-20 dan masih menjadi pertimbangan oleh yang lainnya sebagai pasar untuk peningkatan varietas modern. Namun demikian pada negara-negara dimana sebagian besar terdiri dari komunitas petani termasuk Indonesia masih melanjutkan ketergantungan kepada *landraces* lokal baik untuk sosial ekonomi maupun untuk lingkungan, dimana ketepatan yang efektif harus diperhitungkan untuk memproteksi peranan dan aturan inovasi lokal. Hal ini utamanya penting pada saat *landraces* lokal merupakan sumber penting untuk adaptasi keragaman genetik juga untuk pemuliaan modern.

Bagaimana posisi Indonesia dalam pengembangan marka molekuler untuk identifikasi varietas tanaman

Dengan pertambahan penduduk yang terus berlangsung dan semakin terbatasnya lahan pertanian maka diperlukan peningkatan produktivitas pertanian baik dalam kuantitas maupun dalam kualitas yang tinggi dengan penggunaan input yang lebih efisien. Hal tersebut menjadi alarm bagi keamanan pangan dan usaha yang telah dimulai untuk mengintegrasikan alat bantu bioteknologi modern di dalam pemuliaan konvensional untuk perbaikan tanaman-tanaman penting dan bernilai ekonomi tinggi harus lebih diintensifkan.

Penelitian dalam bidang bioteknologi khususnya dalam marka molekuler masih tergolong baru di Indonesia. Di beberapa institusi seperti di lingkungan swasta, perguruan tinggi atau di lembaga-lembaga penelitian pemerintah aktivitas ini sudah mulai berjalan. Sebagai contoh di Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB-Biogen) di Bogor, aktivitas penelitian dalam bidang marka molekuler yang sementara berjalan seperti analisis keragaman genetik dan sidik jari pada padi, jagung, dan beberapa tanaman hortikultura. Termasuk dalam kegiatan ini mengenai cek kemurnian berbagai macam varietas (hibrida) dengan galur-galur pembentuknya yang

bertujuan untuk verifikasi atau untuk melihat persentase *outcrossing*, sesuai dengan permintaan konsumen. Aktivitas lain adalah pemetaan genetik penyakit blast, toleran kekeringan, toleran aluminium pada tanaman padi, pemetaan genetik untuk resistensi penyakit bulai pada jagung, dan masih ada sejumlah kegiatan penelitian yang berkaitan dengan marka molekuler. Namun demikian, sebagian besar hasil-hasil penelitian masih sebatas laporan-laporan atau artikel saja. Adapun artikel-artikel yang bisa diterbitkan secara internasional bisa dihitungkan dengan jari. Untuk menghadapi persaingan dalam era globalisasi, suka atau tidak suka, kita harus mengejar ketertinggalan kita. Secara selektif kita sudah harus mulai berani untuk mengaplikasikan pemanfaatan marka molekuler sebagai alat bantu yang efektif di lapangan berdasarkan hasil-hasil penelitian yang telah diperoleh selama ini.

Telah diketahui bahwa Indonesia dengan ekosistem yang sangat beragam memunculkan sumberdaya genetik yang beragam pula. Dengan demikian akan memicu munculnya berbagai varietas-varietas yang spesifik pada lingkungan yang spesifik yang perlu dilindungi. Pusat Perlindungan Varietas Tanaman (PVT) mempunyai hak dalam perlindungan varietas yaitu berupa perlindungan khusus yang diberikan oleh negara terhadap varietas tanaman yang dihasilkan oleh pemulia. Adapun syarat dari PVT adalah yang dikenal dengan BUSS (Baru, Unik, Seragam dan Stabil). Sampai saat ini uji BUSS untuk registrasi varietas masih terbatas pada sifat morfologis. Pengujian secara morfologis mempunyai keterbatasan karena sangat dipengaruhi oleh lingkungan dan marka pembedanya sangat terbatas. Oleh sebab itu penggunaan marka biokimia atau marka molekuler sudah sepatutnya untuk segera diaplikasikan sebagai alat pendukung marka morfologis.

Penutup

Walaupun bioteknologi dalam bidang pertanian terjadi peningkatan, kenyataan bahwa sebagian besar dari produktivitas pertanian di dunia dicapai melalui pemuliaan konvensional tidak dapat dipungkiri. Namun demikian, walaupun marka DNA tidak dapat menggantikan pemuliaan tanaman, dengan tersedianya alat bantu yang baru tersebut diyakinkan akan mampu meningkatkan kinerja para pemulia.

Identifikasi varietas untuk keamanan produk-produk pertanian yang bernilai ekonomi tinggi perlu mendapat dukungan penuh baik dari pemerintah maupun masyarakat dimana varietas tersebut berasal. Oleh karena itu perlu dikembangkan metode yang dibutuhkan untuk pengujian secara rutin identitas varietas pada level DNA.

Pengujian dan evaluasi perlu dilakukan untuk menganalisis pedigree atau asal-usul tetua suatu varietas yang akan dilepas dan mengidentifikasi kemungkinan yang paling mendekati asal atau daerah yang asli dari materi tetua potensial tersebut berasal. Informasi ini penting di dalam perencanaan strategi pemuliaan masa depan untuk sustainabilitas tanaman potensial.

Daftar Pustaka

- Caetano-Anolles, G., B.J. Bassam, P.M. Gresshoff. 1991. DNA fingerprinting: A strategy for genome analysis. *Plant Mol Biol Rep.* 9:294-307.
- Chin, E.C.L., M.L. Senior, H. Shu, and J.S.C. Smith. 1996. Maize simple repetitive DNA sequences; abundance and allele variation. *Genome* 39: 866 – 873.
- Garland, S.H.L., L. Lewin, M. Abedinia, R. Henry and A. Blakeney. 1999. The use of microsatellite polymorphisms for the identification of Australian breeding lines of rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica* 108: 53-63.
- Griffiths, A.J.F., J.H. Miller, D.T. Suzuki, R.C. Lewonty, and W.M. Gelbart. 1993. An introduction to genetic analysis
- Jacob, H.J., K. Lintpaintner, K. Lincodpaintner, S.E. Lincoln, K. Kusumi, R.K. Bunker, Y.P. Mao, D. Ganten, V.J. Dzau, and E.S. Lander. 1991. Genetic mapping of gene causing hypertension in the strokeprone spontaneously hypertensive rat. *Cell* 67:213-224.
- Korzun, V. 2003. Molecular Markers and Their Applications in Cereal.
- Liu, K., M. Goodman, S. Muse, J. S. Smith, E. Buckler, and J. Doebley. 2003. Genetic structure and diversity among maize inbred lines as inferred from DNA microsatellites. *Genetics* 165: 2117-2128.
- Nunome, T., K. Suwabe, H. Iketani, and M. Hirai. 2003. Identification and characterization of microsatellites in eggplant. *Plant Breeding* 122:256-262.
- Pecchioni, N., P. Paccioli, A. Monetti, A.M. Stanca, V. Terzi. 1996. Molecular markers for genotype identification in small grain cereals. *J. Genet Breed* 50(3):503-519.
- Powell, W., M.S. Phillips, J.W. McNicol, R. Waugh. 1991. The use of DNA markers to estimate the extent and nature of genetic variability in *Solanum tuberosum* cultivars. *Ann Appl Biol.* 118:423-432.

- Rogstad, S.H. 1996. Assessing genetic diversity in plants with synthetic tandem repetitive DNA probes. *Stadler Genet Symp Ser.* 21:1-14.
- Senior, M. L., E.C.L. Chin, J.S.C. Smith, and C.W. Stuber. 1996. Simple sequence repeats markers developed from maize sequences found in the Genebank database: Map construction. *Crop Sci.* 36: 1676-1683.
- Senior, M.L., J.P. Murphy, M.M. Goodman, and C.W. Stuber. 1998. Utility of SSRs for determining genetic similarities and relationships in maize using an agarose gel system. *Crop Sci.* 38: 1088 -1098.
- Waugh, R. and W. Powell. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. 1992. *Trends Biotechnol.* 10:186-191. Fifth edition. Freeman and Company, New York. 840p.
- Weising, K., P. Winter, B. Huttel, G. Kahl. 1998. Microsatellite marker for molecular breeding. *J. Crop Prod.* 11:113-143.
- Yashitola, J., T. Thirumurugan, R.M. Sundaram, M.K. Naseerullah, M.S. Rhamesa, N.P. Sarma, and R.V. Sonti. 2002. Assessment of purity of rice hybrids using microsatellite and STS marker. *Crop Sci.* 42:1369-1373.
- Zawko, Grace. 2003. Protein and DNA methods for varietal identification. *Agribusiness Crops Updates.*