IDENTIFIKASI KANDIDAT INDIVIDU KELAPA SAWIT DENGAN TINGKAT HOMOZIGOSITAS TINGGI MELALUI ANALISIS SIDIK JARI DNA

Sri Wening, Rokhana Faizah, Hernawan Y. Rahmadi, Yurna Yenni, dan A. Razak Purba

Abstrak Tanaman kelapa sawit dengan tingkat homozigositas yang tinggi dapat digunakan sebagai material dalam beberapa pendekatan pemuliaan kelapa sawit. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi kandidat tanaman kelapa sawit dengan tingkat homozigositas tinggi pada koleksi plasma nutfah Pusat Penelitian Kelapa Sawit (PPKS) melalui sidik jari DNA, serta untuk mengkaji sistem sidik jari DNA yang digunakan. Sistem sidik jari DNA yang menggunakan 16 marka *Simple Sequence Repeat* (SSR) pada koleksi plasma nutfah PPKS mengidentifikasi satu tanaman yang homozigot pada semua lokus yang digunakan. Sistem tersebut masih dapat disempurnakan, dengan pemilihan marka SSR yang lebih memiliki kemampuan dalam melakukan penapisan serta dua tahap penapisan, dengan penggunaan delapan marka pada tiap tahap.

Kata kunci: kelapa sawit, homozigositas, plasma nutfah, *graphical genotyping*

Abstract *Highly homozygous oil palm can be used as a plant material for several oil palm breeding approaches. This research aims to identify candidates of highly homozygous individuals from oil palm germplasm collection of Indonesian Oil Palm Research Institute (IOPRI) by using DNA fingerprinting and to evaluate the system. The DNA fingerprinting system which used 16 Simple Sequence Repeats (SSRs) identified an individual which was homozygous for all loci analyzed. The system could be improved by usage of more powerful SSRs to screen, and two steps of screening by 8 SSRs in each step.*

Keywords: *oil palm, homozygosity, germplasm, graphical genotyping*

Penulis yang tidak disertai dengan catatan kaki instansi adalah peneliti pada Pusat Penelitian Kelapa Sawit

Sri Wening (✉)
Pusat Penelitian Kelapa Sawit
Jl. Brigjen Katamso No. 51 Medan, Indonesia
Email: sriwening.sw@gmail.com

PENDAHULUAN

Kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) adalah tanaman berumah satu, dengan bunga jantan dan betina muncul secara terpisah pada tanaman yang sama (Corley dan Tinker, 2003). Penyerbukan terjadi antar tanaman, sehingga menyebabkan adanya potensi variabilitas yang tinggi antar individu pada generasi berikutnya. Sementara itu, salah satu tujuan pemuliaan kelapa sawit adalah untuk mengkonstruksi bahan tanaman yang memiliki tingkat keseragaman yang tinggi, yang dapat diperoleh dari persilangan dua tetua yang masing-masing memiliki tingkat homozigositas yang tinggi. Selain hal tersebut, diharapkan terdapat efek heterosis, yaitu karakter yang lebih unggul yang muncul pada projeni hasil persilangan tersebut, jika dibandingkan dengan karakter tetuanya (Jones, 1917).

Salah satu pendekatan yang dilakukan oleh pemulia untuk mendapatkan tanaman yang memiliki tingkat homozigositas yang tinggi adalah dengan melakukan "silang dalam" hingga beberapa generasi (Morrison dan Evans, 1988). Pada kelapa sawit, diperlukan waktu setidaknya 15 hingga 35 tahun untuk melakukan hal tersebut, dan dilakukan secara paralel pada material dura dan pisifera, jika bertujuan untuk membentuk bahan tanaman tenera (Wening *et al.*,

Naskah masuk: 5 Maret 2013; Naskah diterima: 13 Juli 2013

2012a). Pendekatan lain yang bisa dilakukan adalah dengan mengkonstruksi individu *doubled haploid* (DH). Pada individu DH, seluruh konstituen genetiknya adalah homozigot, sehingga projeni hasil persilangan dua DH akan menghasilkan projeni yang seragam penuh. Individu DH dapat dikonstruksi melalui penggandaan kromosom individu haploid. Individu tersebut dapat diperoleh dengan menggunakan beberapa metode, yaitu di antaranya kultur *cvule* (Bhat dan Murthy, 2008) dan kultur mikrospora (Ferrie dan Caswell, 2011). Terdapat laporan penelitian kultur mikrospora pada kelapa sawit, tapi belum menunjukkan keberhasilan konstruksi individu haploid (Tirtoboma, 1998). Pada kelapa sawit, individu haploid telah ditemukan terjadi secara natural di alam, sehingga material tersebut bisa dieksploitasi untuk kepentingan pemuliaan (Nelson *et al.*, 2009). Di lain pihak, konstruksi individu DH melalui penggandaan kromosom individu haploid memerlukan usaha tersendiri (Mienanti *et al.*, 2009).

Terdapat kemungkinan adanya individu koleksi plasma nutfah kelapa sawit PPKS yang homozigot atau sudah memiliki tingkat homozigositas yang tinggi. Hal tersebut dapat terjadi secara alami atau karena proses silang dalam berulang pada program pemuliaan PPKS yang menggunakan metode *Reciprocal Recurrent Selection* (RRS). Sehingga, untuk mengidentifikasinya, diperlukan informasi tingkat homozigositas pada tiap individu koleksi plasma nutfah kelapa sawit PPKS. Untuk memperoleh informasi tersebut, dapat digunakan sidik jari DNA menggunakan marka SSR. Marka SSR telah digunakan secara luas dalam analisis sidik jari DNA di tanaman (Blair *et al.*, 2006; Franceschinelli *et al.*, 2006; Perera *et al.*, 2012; Wang dan Chuang, 2012) pada umumnya dan di kelapa sawit pada khususnya (Abdullah *et al.*, 2008; Ajambang *et al.*, 2012; Cochard *et al.*, 2009; Wening *et al.*, 2012b). Selain sifatnya yang mudah diaplikasikan, sangat polimorfik dan reliable, SSR bersifat kodominan sehingga memudahkan analisis tingkat homozigositas (Aranzana *et al.*, 2003; Koelling *et al.*, 2012; Mayer dan Kerth, 2005; Ottewell *et al.*, 2005; Rakoczy-Trojanowska dan Bolibok, 2004; Teulat *et al.*, 2000). Penggunaan SSR untuk analisis tingkat homozigositas pada tanaman telah dilakukan oleh beberapa peneliti (Murovec *et al.*, 2007; Perera *et al.*, 2008; Wening *et al.*, 2012a).

Sistem sidik jari DNA yang efektif sangat berguna dalam pencarian individu yang memiliki tingkat homozigositas tinggi. Pada tulisan ini, dilakukan kajian identifikasi kandidat individu kelapa sawit dengan tingkat homozigositas tinggi, sistem sidik jari DNA yang digunakan dan alternatif perbaikan sistem yang dapat dilakukan.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Enam puluh delapan tanaman kelapa sawit (*Elaeis guineensis*) digunakan sebagai sampel yang dianalisis dalam penelitian ini, yang terdiri dari populasi A program *Reciprocal Recurrent Selection* (RRS) (sampel nomor 1 hingga 19), populasi B *Reciprocal Recurrent Selection* (RRS) (sampel nomor 20 hingga 39), populasi tenera komersial (sampel nomor 40 hingga 47), populasi liar dari Kamerun (sampel nomor 48 hingga 58) dan populasi liar dari Angola (sampel nomor 59 hingga 68).

Metode

DNA diekstraksi dari jaringan daun yang muda dan sehat. Sebanyak 50 mg jaringan daun segar digunakan untuk protokol ekstraksi DNA menggunakan DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen).

Enam belas primer SSR (dengan motif $(GA)_{13}$ hingga $(GA)_{20}$) yang telah dipetakan, yang merupakan perwakilan tiap kromosom kelapa sawit (Billotte *et al.*, 2005) digunakan untuk melakukan karakterisasi genetik sampel tanaman yang dianalisis. Amplifikasi SSR mengacu pada protokol yang telah diuraikan oleh Wening dan Yenni (2013). Hasil amplifikasi beberapa primer dapat digabung menjadi satu sampel analisis fragmen, jika primer-primer tersebut memiliki panjang hasil amplifikasi atau jenis label fluoresen yang berbeda. Fragmen DNA hasil amplifikasi dianalisis menggunakan *capillary sequencer*, menggunakan jasa komersial yang disediakan oleh 1st BASE (Malaysia). Alel-alel SSR dibaca menggunakan bantuan *software* GeneMarker® version 1.97, *demo version* (SoftGenetics LLC®), untuk kemudian digunakan sebagai data dalam analisis.

Analisis Data

Variabilitas genetik tiap lokus yang dianalisis dihitung dengan parameter tingkat homozigositas, dimana tingkat homozigositas = *1 - (Ho)*; *Ho=observed heterozygosity* (Hartl, 1988). Korelasi tingkat homozigositas yang ditentukan oleh 8 marka SSR (dari *linkage group* 1 hingga 8) dengan tingkat homozigositas yang ditentukan oleh 16 marka SSR (dari *linkage group* 1 hingga 16) diperoleh dengan analisis regresi linier sederhana.

Graphical genotyping yang dikonstruksi dengan *software* Flapjack-1.13.03.19 (Milne *et al.*, 2010) digunakan untuk memudahkan pengamatan variabilitas genetik tiap lokus pada tiap sampel tanaman yang diamati. Pada grafik tersebut, variabilitas genetik tiap individu diwakili oleh tiap baris, sedangkan variabilitas genetik tiap lokus dari keenam belas lokus yang diamati diwakili oleh tiap kolom (Gambar 1). Lokus pada *linkage group* pertama pada kolom yang paling kiri, berturut-turut ke kanan hingga lokus pada *linkage group* keenam belas berada pada kolom paling kanan. Pada tiap kolom, setiap alel diwakili oleh suatu warna, jadi alel yang berbeda akan memiliki warna yang berbeda pula. Pada grafik, suatu individu memiliki genotipe yang homozigot pada suatu lokus jika hanya ada satu warna pada posisi tersebut, dan heterozigot jika terdapat dua warna berbeda pada posisi tersebut.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penggunaan Marka SSR

Karakterisasi genetik yang dilakukan menggunakan informasi dari 16 lokus SSR. Jumlah tersebut lebih banyak daripada jumlah lokus dalam analisis sidik jari DNA pada kelapa sawit yang telah dilakukan oleh Abdullah *et al.* (2011) dan Cochard *et al.* (2009), tetapi lebih sedikit jika dibandingkan pada kajian yang dilakukan oleh Wening *et al.* (2012b). Ajambang *et al.* (2012) menggunakan 16 lokus SSR untuk analisis keragaman genetik kelapa sawit, tetapi pemilihan lokus tersebut tidak berdasarkan perwakilan tiap kromosom kelapa sawit.

Penggunaan 16 marka SSR yang telah dipetakan (Billotte *et al.*, 2005) bertujuan untuk mengetahui informasi daerah genom tertentu (Brantestam *et al.*, 2004) pada sampel yang dianalisis. Setiap marka dari keenam belas marka SSR yang digunakan mewakili tiap kromosom kelapa sawit yang berbeda, untuk meyakinkan bahwa tidak ada pautan genetik antar lokus yang digunakan dalam analisis. Dilakukan pendekatan penggunaan marka SSR yang memiliki motif yang sama dan jumlah ulangan yang bervariasi rendah seperti yang pernah dilakukan oleh Wening *et al.* (2010), yang bertujuan untuk menghindari bias keragaman yang disebabkan oleh perbedaan tingkat mutasi marka SSR (Pardi *et al.*, 2005 dan Yu *et al.*, 2002).

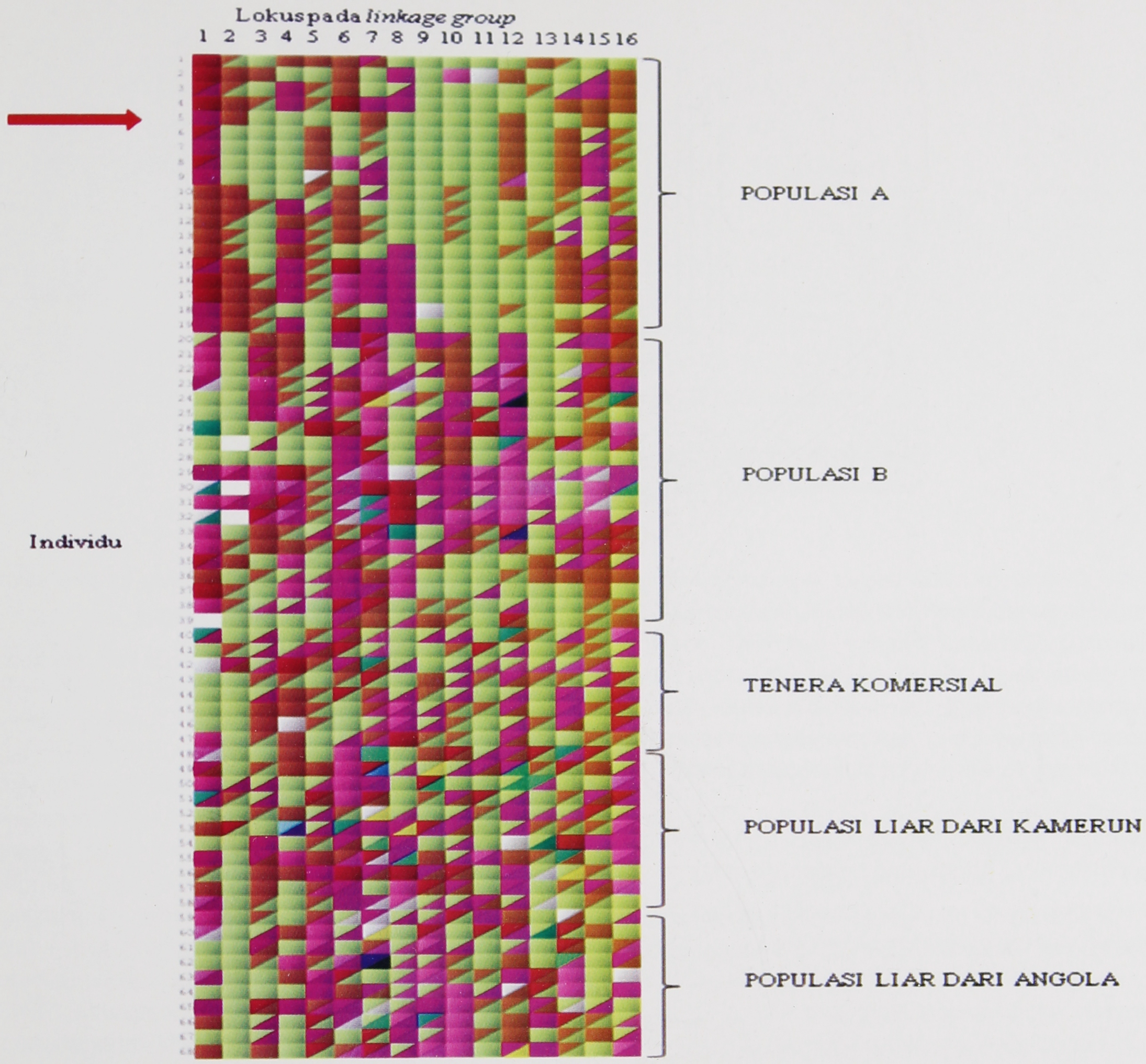
Analisis keragaman tiap lokus dan tiap individu/ populasi menggunakan *graphical genotyping*

Graphical genotyping memberikan ilustrasi variabilitas genetik sampel yang dianalisis secara cepat, baik secara umum (per populasi dan seluruh sampel) dan secara khusus (per individu). *Graphical genotyping* telah digunakan sebagai pendekatan dalam sidik jari DNA tanaman lain, yaitu kapas (Liu *et al.*, 2000) dan barley (Yun *et al.*, 2006).

Graphical genotyping yang dihasilkan pada kajian ini (Gambar 1) menunjukkan bahwa populasi liar dari Kamerun dan Angola memiliki keragaman genetik yang tinggi, sedangkan populasi A program RRS memiliki keragaman genetik yang terendah. Ditinjau dari variabilitas genetik antar lokus, lokus pada *linkage group* kedua (kolom kedua dari kiri, panah abu-abu) memiliki variabilitas sangat rendah pada populasi liar dari Kamerun dan Angola (populasi yang memiliki variabilitas genetik yang tertinggi dibandingkan populasi lain yang diamati). Terdapat tiga lokus (pada *linkage group* 4, 9 dan 11) yang homozigot pada semua sampel yang dianalisis pada populasi A program RRS. Dari semua individu yang dianalisis, terdapat satu individu (sampel nomor 5, populasi A program RRS-panah merah) yang homozigot pada keenam belas lokus yang diamati). Hasil pengamatan tersebut menunjukkan bahwa sidik jari DNA yang dilakukan pada plasma nutfah koleksi PPKS dapat menunjukkan tingkat homozigositas tiap individu, yang digunakan sebagai acuan pemilihan kandidat tanaman yang memiliki tingkat homozigositas yang tinggi.

Tingkat kemampuan marka SSR dalam penapisan kandidat individu yang memiliki homozigositas tinggi

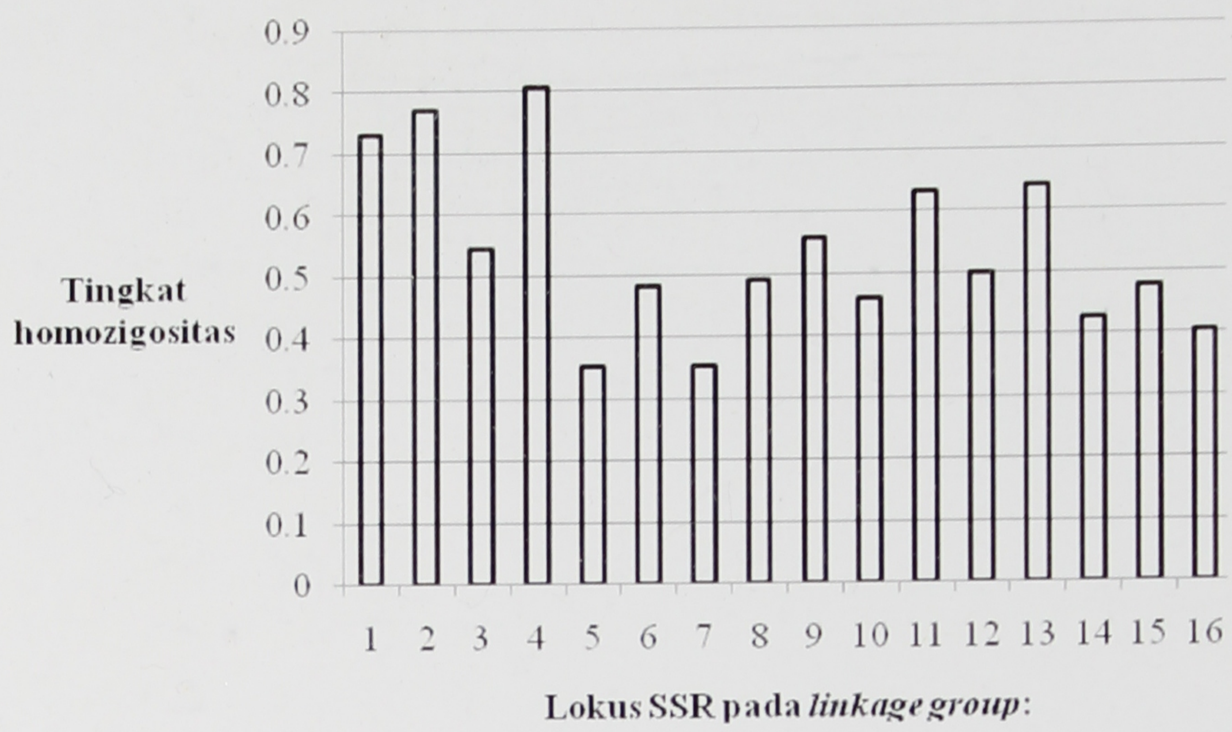
Pada hasil analisis semua sampel individu, terdapat variabilitas tingkat homozigositas pada tiap lokus yang dianalisis, seperti diilustrasikan oleh Gambar 2. Marka SSR yang digunakan pada *linkage*



Gambar 1. *Graphical genotyping* 68 individu koleksi plasma nutfah PPKS menggunakan 16 marka SSR.

group ke-5 memiliki tingkat homozigositas terendah sedangkan marka SSR yang digunakan pada *linkage group* ke-4 memiliki tingkat homozigositas tertinggi.

Lokus yang memiliki tingkat homozigositas yang terlalu tinggi tidak memiliki kekuatan untuk memberikan informasi perbedaan pada tiap sampel yang dianalisis, atau dalam penapisan. Hal tersebut dapat merupakan indikasi bahwa lokus SSR tersebut terpaut dengan daerah genom yang terkonservasi atau daerah genom yang mengalami seleksi (Burke *et al.*, 2005). Informasi tersebut berguna bagi pengetahuan genom kelapa sawit, tapi kurang berguna pada penapisan untuk mencari individu kelapa sawit yang memiliki homozigositas tinggi. Perlu dikaji lebih lanjut, apakah tingkat homozigositas yang tinggi tersebut hanya terjadi pada populasi tertentu, misalnya pada marka SSR yang digunakan pada *linkage group* kedua, karena homozigositas yang tinggi terdapat pada populasi kelapa sawit liar. Hal yang sama dijumpai pada marka di *linkage group* keempat, kesembilan dan kesebelas jika digunakan untuk menapis populasi A pada program RRS (Gambar 1). Sebaliknya, marka-marka tersebut akan memiliki kemampuan yang tinggi untuk menskrining



Gambar 2. Tingkat homozigositas tiap marka SSR yang digunakan pada analisis 68 individu koleksi plasma nutfah PPKS.

material yang memiliki tingkat heterozigositas yang tinggi. Hal tersebut menyarankan bahwa sistem sidik jari DNA pada plasma nutfah kelapa sawit PPKS atau sistem penapisan dalam identifikasi individu yang memiliki homozigositas tinggi dapat dirubah atau diperbaiki, sesuai informasi yang diperoleh sepanjang kegiatan karakterisasi genetik plasma nutfah kelapa sawit PPKS.

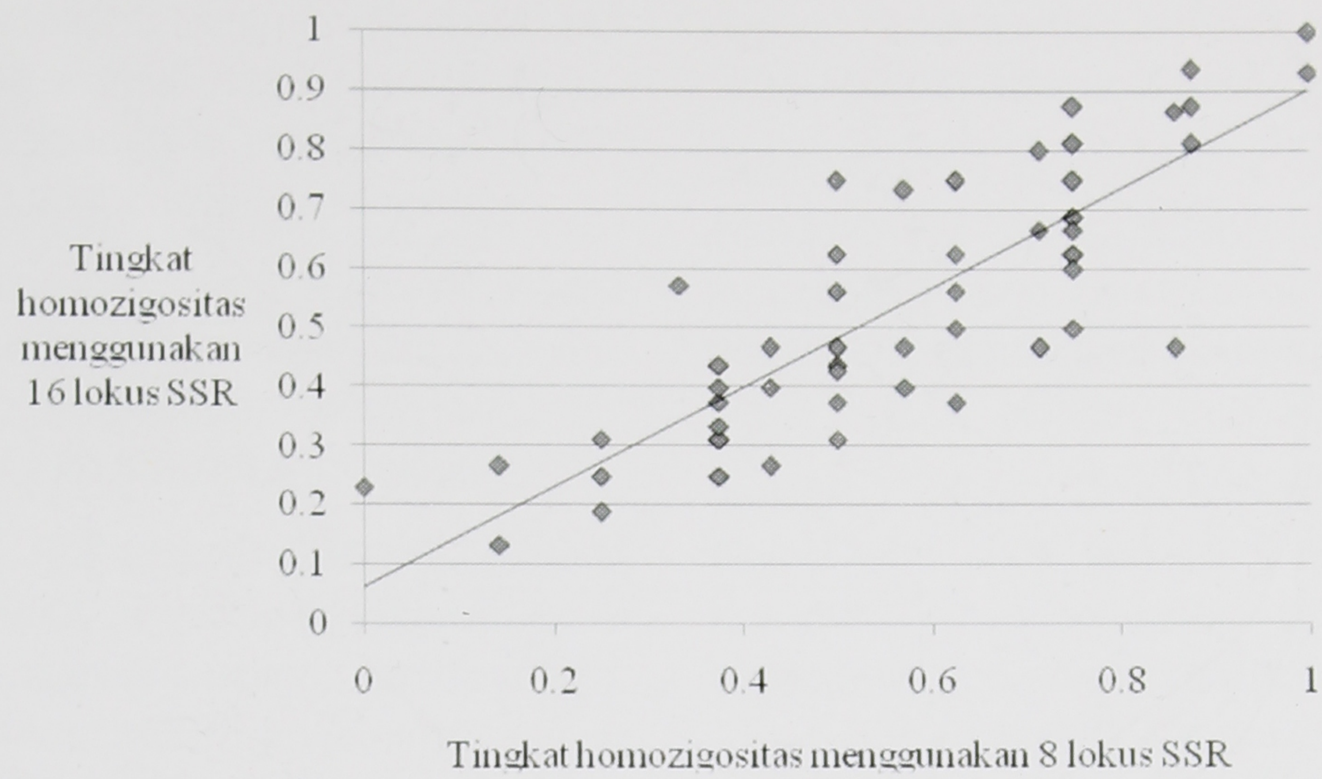
Kandidat individu kelapa sawit dengan tingkat homozigositas tinggi yang teridentifikasi

Individu nomor 5 yang telah teridentifikasi homozigot pada keenam belas lokus SSR yang digunakan (tingkat homozigositas=1), merupakan populasi Deli dura yang termasuk pada populasi A program RRS di PPKS, dan telah mengalami silang dalam selama 3 generasi. Untuk keefektifan penemuan individu-individu kelapa sawit lain yang memiliki tingkat homozigositas tinggi, dapat dilakukan penapisan pada populasi-populasi yang telah mengalami silang dalam selama beberapa generasi, atau hasil silang dalam dari individu yang telah dianalisis pada penelitian ini, yang juga telah memiliki tingkat homozigositas yang tinggi. Individu yang telah memiliki tingkat homozigositas yang tinggi, memerlukan jumlah silang dalam yang lebih sedikit dibandingkan dengan yang memiliki tingkat homozigositas yang lebih rendah, untuk kemudian disilangkan dengan individu dengan tingkat homozigositas tinggi yang lain, dalam usaha eksploitasi heterosis dan konstruksi projeni dengan keseragaman yang tinggi.

Sistem identifikasi kandidat individu kelapa sawit dengan tingkat homozigositas tinggi

Jika suatu individu homozigot pada keenam belas lokus yang dianalisis, belum tentu individu tersebut juga homozigot pada lokus yang belum dianalisis. Tetapi, ketersediaan sumber daya manusia, sarana dan prasarana menekankan pentingnya suatu sistem dengan strategi khusus sehingga tujuan identifikasi individu kelapa sawit yang memiliki tingkat homozigositas tinggi dapat dilakukan dengan pemakaian sumber daya yang seminimal mungkin. Setidaknya, hal tersebut akan mengurangi jumlah total material yang harus dianalisis. Pada prosedur standar analisis sidik jari DNA pada koleksi plasma nutfah PPKS, digunakan 16 marka SSR. Hal tersebut dapat sekaligus diterapkan untuk mengidentifikasi individu kelapa sawit yang memiliki tingkat homozigositas tinggi.

Alternatif pendekatan yang dapat dilakukan adalah dengan melakukan penapisan pada material yang dianalisis, dengan menggunakan sejumlah marka secara bertahap. Penelitian yang dilakukan oleh Wening *et al.* (2011) menyatakan bahwa individu kelapa sawit yang homozigot pada delapan lokus SSR dari *linkage group* yang berbeda, cenderung memiliki tingkat homozigositas yang tinggi jika analisisnya dilanjutkan dengan menambah delapan lokus SSR (dari delapan *linkage group* lainnya). Pada penelitian ini, diperoleh hasil bahwa tingkat homozigositas sampel yang dianalisis dengan delapan marka (dari *linkage group* 1 hingga 8) berkorelasi cukup kuat



Gambar 3. Korelasi antara tingkat homozigositas individu kelapa sawit yang ditentukan oleh 8 lokus SSR dengan 16 lokus SSR.

(r^2=0,7) dan signifikan (taraf 5%) dengan tingkat homozigositas yang diperoleh dengan menggunakan enam belas marka SSR (Gambar 3). Hal tersebut menunjukkan bahwa penapisan dapat dilakukan secara bertahap, dengan penggunaan 8 marka SSR pada tiap tahapnya.

KESIMPULAN

Sidik jari DNA pada koleksi plasma nutfah kelapa sawit PPKS yang menggunakan 16 marka SSR dapat digunakan sebagai sistem dalam identifikasi kandidat individu kelapa sawit yang memiliki tingkat homozigositas yang tinggi. Pada analisis 68 koleksi plasma nutfah PPKS, ditemukan satu individu yang homozigot pada keenam belas lokus yang digunakan. Sistem tersebut masih dapat disempurnakan, dengan pemilihan marka SSR yang lebih memiliki kemampuan dalam melakukan penapisan, serta dua tahap penapisan dengan penggunaan delapan marka pada tiap tahapnya.

DAFTAR PUSTAKA

Abdullah, N., M.R. Yusop, M. Ithnin, and G. Saleh. 2008. Genetic variation among oil palm parent genotypes and their progenies based on microsatellite markers. Journal of Oil Palm Research 20:533-541.

Abdullah, N., M.R. Yusop, M. Ithnin, G. Saleh, and M.A. Latif. 2011. Genetic variability of oil palm parental genotypes and performance of its'progenies as revealed by molecular markers and quantitative traits. Comptes Rendus Biologies 334:290-299.

Ajambang, W., Sudarsono, D. Asmono, dan N. Toruan. 2012. Microsatellite markers reveal Cameroon's wild oil palm population as a possible solution to broaden the genetic base in the Indonesia-Malaysia oil palm breeding programs African Journal of Biotechnology 11:13244-13249.

Aranzana, M.J., J. Carbó, and P. Arús. 2003. Microsatellite variability in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch): cultivar identification, marker mutation, pedigree inferences and population structure. Theoretical and Applied Genetics 106:1341-1352.

Bhat, J.G. and H.N. Murthy. 2008. Haploid plant regeneration from unpollinated ovule cultures of niger (*Guizotia abyssinica* (L.f.) Cass.). Russian Journal of Plant Physiology 55:241-245.

Billotte, N., N. Marseillac, A.M. Risterucci, B. Adon, P. Brottier, F.C. Baurens, R. Singh, A. Herrán, H. Asmady, C. Billot, P. Amblard, T. Durrand-Gasselin, B.Courtois, D. Asmono, S.C. Cheah, W. Rohde, E. Ritter, and A. Charrier. 2005. Microsatellite-based high density linkage map

in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Theoretical and Applied Genetics 110:754-765.

Blair, M.W., M.C. Giraldo, H.F. Buendia, E. Tovar, M.C. Duque dan S.E. Beebe. 2006. Microsatellite marker diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Theoretical and Applied Genetics 113:100-109.

Brantestam, A.K., R. Von Bothmer, C. Dayteg, I. Rashal, S. Tuvesson, and J. Weibull. 2004. Inter simple sequence repeat analysis of genetic diversity and relationships in cultivated barley of Nordic and Baltic origin. Hereditas 141:186-192.

Burke J.M., S.J. Knapp, and Rieseberg L.H. (2005) Genetic consequences of selection during the evolution of cultivated sunflower. Genetics 171:1933-1940.

Cochard, B., B. Adon, S. Rekima, N. Billotte, R.D. de Chenon, A. Koutou, B. Nouy, A. Omoré, A.R. Purba, Glazsmann J.-C. and Noyer J.-L. 2009. Geographic and genetic structure of African oil palm diversity suggests new approaches to breeding Tree Genetics & Genomes 5:493-504.

Corley, R.H.V. and P.B. Tinker. 2003. The oil palm. 4th edition ed. Blackwell Science Ltd, Oxford.

Ferrie, A.M.R. and K.L. Caswell. 2011. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production plant cell, tissue and organ culture (PCTOC) 104:301-309.

Franceschinelli, E.V., C.M. Jacobi, M.G. Dummond, and M.F.S. Resende. 2006. The genetic diversity of Two Brazilian Vellozia (*Velloziaceae*) with different patterns of spatial distribution and pollination biology. Annals of Botany 97:585-592.

Hartl, D.L. 1988. A primer of population genetics. 2nd edition ed. Sinauer Associates Inc., Sunderland.

Jones, D.F. 1917. Dominance of linked factors as a means of accounting for heterosis. Genetics 2:466-479.

Koelling, J., M.C. Coles, P.D. Matthews, and A. Schwekendiek. 2012. Development of new microsatellite markers (SSRs) for *Humulus lupulus*. Molecular Breeding 30:479–484.

Liu, S., R.G. Cantrell, J.C. McCarty Jr, and J. McD. Stewart. 2000. Simple Sequence Repeat-based assessment of genetic diversity in cotton race stock accessions. Crop Science 40:1459–1469

Mayer, F. and G. Kerth. 2005. Microsatellite evolution in the mitochondrial genome of Bechstein's bat (*Myotis bechsteinii*). Journal Molecular Evolution 61:408-416.

Mienanti, D., A.C. Sitorus, B.P. Forster, S.P.C. Nelson, and P.D.S. Caligari. 2009. Chromosome doubling of oil palm haploids, PIPOC International Conference, MPOB, Kuala Lumpur.

Milne, I., P. Shaw, G. Stephen, M. Bayer, L. Cardle, W.T.B. Thomas, A.J. Flavell, and D. Marshall. 2010. Flapjack-graphical genotype visualization. Bioinformatics 26(24):3133-3134.

Morrison, R.A. and D.A. Evans. 1988. Haploid plants from tissue culture: New plant varieties in a shortened time frame. Bio/Technology 6:684-690.

Murovec, J., N. Stajner, J. Jakse, and B. Javornik. 2007. Microsatellite marker for homozygosity testing of putative doubled haploids and characterization of *Mimulus* species derived by a cross-genera approach. Journal of American Society Horticultural Science 132:659–663.

Nelson, S.P.C., M.J. Wilkinson, J.M. Dunwell, B.P.Forster, S. Wening, A.C. Sitorus, A.E. Croxford, C.S. Ford, and P.D.S. Caligari. 2009. Breeding for high productivity lines via haploid technology, PIPOC International Conference, MPOB, Kuala Lumpur.

Ottewell, K.M., S.C. Donnellan, G.F. Moran, and D.C. Paton. 2005. Multiplexed microsatellite markers for the genetic analysis of *Eucalyptus leucoxylon* (Myrtaceae) and their utility for ecological and breeding studies in other *Eucalyptus* species. Journal of Heredity 96:445-451.

Pardi, F., R.M. Sibly, M.J. Wilkinson, and J.C. Whittaker. 2005. On the structural differences between markers and genomic AC microsatellites. Journal of Molecular Evolution 60:688-693.

Perera, M.F., M.E. Arias, D. Costilla, A.C. Luque, M.B. García, C.D. Romero, J. Racedo, S. Ostengo, M.P. Filippone, M.I. Cuenya, and A.P. Castagnaro. 2012. Genetic diversity assessment and

genotype identification in sugarcane based on DNA markers and morphological traits. Euphytica. 185:491-510.

Perera, P.I.P., L. Perera, V. Hocher, J.-L. Verdeil, D.M.D. Yakandawala, and L.K. Weerakoon. 2008. Use of SSR markers to determine the anther-derived homozygous lines in coconut. Plant Cell Report 27:1697-1703.

Rakoczy-Trojanowska, M. and H. Bolibok. 2004. Characteristics and a comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants. Cellular & Molecular Biology Letters 9:221-238.

Teulat, B., C. Aldam, R. Trehin, P. Lebrun, J.H.A. Barker, G.M. Arnold, A.Karp, L. Baudouin, and F. Rognon. 2000. An analysis of genetic diversity in coconut (*Cocos nucifera*) populations from across the geographic range using sequence-tagged microsatellites (SSRs) and AFLPs. Theoretical and Applied Genetics 100:764-771.

Tirtoboma. 1998. Culturability of oil palm microspore cells in relation to anther maturity. The BTIG Workshop on Oil Palm Improvement Through Biotechnology, Bogor. pp. 42-47.

Wang, J.-Y. and Chuang K.-C. (2012) Development of novel microsatellite markers for effective applications in Anthurium cultivar identication. Euphytica 189:421–431.

Wening, S. dan Y. Yenni. 2013. Optimasi analisa sidik jari DNA kelapa sawit. Pertemuan Teknis Kelapa Sawit 2013. Pusat Penelitian Kelapa Sawit. Jakarta.

Wening, S., M.J. Wilkinson, J. Djuhjana, B.P. Forster, S.P.C. Nelson, and P.D.S. Caligari. 2011. Genetic diversity of commercial oil palm seed production parents, PIPOC, MPOB, Kuala Lumpur.

Wening, S., H. Fillianti, J.H.H. Prasetyo B.P. Forster, S.P.C. Nelson, and P.D.S. Caligari. 2012a. Homozygosity of parental palms used in single seed descent programmes. Oil Palm Bulletin 65:1-5.

Wening, S., A.E. Croxford, C.S. Ford, W.T.B. Thomas, B.P. Forster, G. Okyere-Boateng, S.P.C. Nelson, P.D.S. Caligari, and M.J. Wilkinson. 2012b. Ranking the value of germplasm: New oil palm (*Elaeis guineensis*) breeding stocks as a case study. Annals of Applied Biology 160:145–156.

Wening, S., W.U. Ananda, A.E. Croxford, C.S. Ford, W.T.B. Thomas, B.P. Forster, G. Okyere-Boateng, S.P.C. Nelson, M.J. Wilkinson, and P.D.S. Caligari. 2010. Graphical genotyping of oil palm genetic diversity, International Oil Palm Conference, IOPRI, Yogyakarta.

Yu, J.-K., J. Mangor, L. Thompson, K.J. Edwards, M.B. Slabaugh, and S.J. Knapp. 2002. Allelic diversity of simple sequence repeats among elite inbred lines of cultivated sunflower. Genome 45:652-660.

Yun, S.J., L. Gyenis, E. Bossolini, P.M. Hayes, I. Matus, K.P. Smith, B.J. Steffenson, R. Tuberosa, and G.J. Muehlbauer. 2006. Validation of quantitative trait loci for multiple disease resistance in barley using advanced backcross lines developed with a wild barley. Crop Science 46:1179-1186.