

Pemetaan, Karakterisasi, dan Pengembangan Primer-primer Locus *Pup1* (*P uptake 1*) pada Padi untuk Peningkatan Toleransi terhadap Defisiensi Fosfor

Joko Prasetyono* dan Tasliah

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111
Telp. (0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820; *E-mail: jokoprasetyono@yahoo.com

Diajukan: 14 Juni 2012; Diterima: 26 September 2102

ABSTRACT

Mapping, Characterization, and Development *Pup1* (*P uptake 1*) Locus on Rice for Increasing Tolerancy to Phosphorus Deficiency. Joko Prasetyono and Tasliah.

Phosphorus (P) is the second most important nutrient for plants after nitrogen, but is available in very low amount. P deficiency in rice would reduce the number of tillers and grain production. There are numerous publications on exploration of genes that are associated with P. Many researches on P that are directed to breeding program and involving many countries/institutions focus on *Pup1* research. *Pup1* (*P uptake 1*) is associated with *P uptake* has been well mapped on chromosome 12 at a distance of 15.31 to 15.47 Mb and microsatellite markers between RM28073 and RM28102 can be used as a selection tool in the MAB (*Marker Assisted Backcrossing*) program. Indonesia is very concerned with this research because of P-deficient problem. This review aims to provide current information of research that explore the genes in *Pup1* locus. This review outlines the history of *Pup1* mapping, to explain sequence and expression analysis of *Pup1*, and to inform of *Pup1* specific primers. The latest information is expected to be useful for rice breeders in Indonesia, especially for those who are interested to P deficiency research. Study of genes within *Pup1* locus is still ongoing, and found that some genes do not contribute directly to *P uptake*. This may indicate that *Pup1* locus use other mechanisms in the *P uptake*. This may indicate that some genes (*dirigent-like*, *fatty acid α -dioxxygenase*, *aspartic proteinases*) play a role in the increasing level of lignin in P deficient condition. Increasing level of lignin would increase the volume of roots and thus increasing *P uptake* and resistance to biotic and abiotic stresses. Specific markers to detect the genes in the *Pup1* locus have been successfully developed, and can be used for breeding and exploration activities on Indonesian rice germplasm.

Keywords: Rice, phosphorus, *Pup1* locus, specific markers.

ABSTRAK

Pemetaan, Karakterisasi, dan Pengembangan Primer-primer Locus *Pup1* (*P uptake 1*) pada Padi untuk Peningkatan Toleransi terhadap Defisiensi Fosfor. Joko Prasetyono dan Tasliah. P merupakan unsur hara kedua

terpenting bagi tanaman setelah nitrogen, tetapi jumlah tersedia sangat sedikit. Pada tanaman padi kekurangan P akan mengurangi jumlah anakan dan produksi bulir padi. Terdapat sejumlah publikasi yang melaporkan eksplorasi gen-gen yang terkait dengan P. Banyak penelitian tentang P yang diarahkan untuk program pemuliaan dan melibatkan banyak lembaga/negara fokus pada penelitian *Pup1*. *Pup1* (*P uptake 1*) yang terkait dengan penangkapan P telah dipetakan dengan baik pada kromosom 12 pada jarak 15,31-15,47 Mb dan beberapa marka mikrosatelit di antara RM28073 dan RM28102 dapat digunakan sebagai alat seleksi dalam program MAB (*Marker Assisted Backcrossing*). Indonesia sangat berkepentingan dengan penelitian ini karena memiliki masalah defisiensi P. Ulasan ini bertujuan untuk memberikan informasi terkini penelitian yang mengeksplorasi gen-gen yang berada di dalam lokus *Pup1*. Ulasan ini menguraikan sejarah dari pemetaan *Pup1*, analisis sekuen dan ekspresi *Pup1*, dan primer-primer spesifik *Pup1*. Informasi terbaru ini diharapkan bisa bermanfaat bagi pemulia padi di Indonesia yang terlibat di dalam penelitian defisiensi P. Studi gen-gen yang berada di dalam lokus *Pup1* sedang berlangsung, dan didapatkan beberapa gen berperan tidak secara langsung dengan penangkapan P. Locus *Pup1* diduga menggunakan mekanisme lain dalam penangkapan P. Beberapa gen (*dirigent-like*, *fatty acid α -dioxxygenase*, *aspartic proteinase*) berperan di dalam meningkatkan kadar lignin pada kondisi kurang P. Peningkatan kadar lignin ini akan meningkatkan volume akar yang kemudian meningkatkan penangkapan P dan ketahanan terhadap cekaman biotik dan abiotik. Marka-marka spesifik untuk mendeteksi gen-gen di dalam lokus *Pup1* juga telah berhasil dibuat, dan bisa dimanfaatkan untuk kegiatan pemuliaan dan untuk kegiatan eksplorasi plasma nutfah padi Indonesia.

Kata kunci: Padi, fosfor, lokus *Pup1*, marka spesifik.

PENDAHULUAN

Keracunan dan defisiensi mineral merupakan masalah utama yang menghambat produksi padi di dunia, di mana di Asia sekitar 50% lahan padi mengalami kekurangan fosfor (P) (Ismail *et al.*, 2007). Di Indonesia luas lahan kering masam yang mengalami defisiensi P mencapai 60% dari total lahan kering yang ada, atau 25% dari total luas daratan Indonesia. Menurut statistik Indonesia pada tahun 2007 luas daratan Indonesia sekitar 191.093.132 ha (BPS, 2008), sehingga

luas lahan kering masam Indonesia diperkirakan sekitar 47.773.283 ha.

Indonesia merupakan salah satu negara yang memiliki masalah defisiensi P. Masalah defisiensi P bisa terjadi pada hampir semua jenis tanah di Indonesia, termasuk tanah lahan kering (gogo) atau lahan sawah. Umumnya lahan kering di Indonesia didominasi oleh tanah Podsolik Merah Kuning (Ultisol), di mana masalah utama yang dihadapi adalah kelebihan unsur Al yang akan mengikat P. Sebagian lahan kering termasuk lahan berkapur memiliki kelebihan Ca yang akan mengikat P sehingga tidak tersedia. Pada lahan masam berupa sawah yang tergenang air unsur Fe yang dominan mengikat P. Pada beberapa percobaan pemupukan P di lapang pada tanah Ultisol menunjukkan efisiensi pemupukan P sangat rendah, hanya sekitar 10% (Prasetyo dan Suriadikarta, 2006).

Selain faktor tanah, masalah P adalah langkanya sumber-sumber untuk pupuk P. Sumber pupuk P yang biasa digunakan adalah P alam yang bisa langsung digunakan (*slow release*) atau batuan P alam (*apatit*) yang diperlakukan dengan asam (asam sulfat atau asam fosfat) sehingga kadar P tersedia (P_2O_5) menjadi lebih tinggi. Namun, karena menggunakan batuan P alam maka lama kelamaan sumber P juga akan berkurang, sehingga di masa depan dikhawatirkan harga pupuk P menjadi sangat mahal, di mana petani yang bermalas-malasan tidak bisa lagi membeli pupuk P buatan pabrik. Diperkirakan batuan fosfat ini akan habis pada masa 50-100 tahun mendatang. Puncak produksi P dari batuan fosfat akan terjadi pada tahun 2030, setelah itu akan terjadi penurunan dan akan habis sama sekali (Cordell *et al.*, 2009).

Sejak ditemukannya marka-marka molekuler pada padi, beberapa peneliti mulai melakukan kegiatan pemetaan genetik untuk sifat toleransi terhadap defisiensi P yang bisa digunakan untuk kegiatan pemuliaan tanaman. Tanaman padi yang toleran terhadap defisiensi P akan dapat mengurangi konsumsi pupuk P dan sangat bermanfaat untuk menghadapi kelangkaan pupuk P di akhir abad ke-21 nanti. Lembaga donor seperti *Generation Challenge Programme* (GCP) juga sangat menaruh perhatian terhadap penelitian P dengan memberikan pembiayaan dari tahun 1995 sampai dengan 2014, di mana Indonesia (BB Biogen) juga terlibat di dalam kegiatan tersebut.

Ulasan ini dibuat untuk memaparkan perkembangan terkini pemetaan salah satu lokus yang mengatur toleransi terhadap defisiensi P, yakni lokus *Pup1*. Lokus *Pup1* merupakan salah satu lokus yang sedang diteliti secara intensif karena diduga mengandung gen-gen yang secara tidak langsung mengatur mekanisme toleransi terhadap defisiensi P.

FUNGSI P PADA TANAMAN

Fosfor (P) merupakan unsur hara yang sangat dibutuhkan oleh tanaman tetapi jumlahnya tidak berlimpah dalam tanah sebagaimana N dan K. P total dalam permukaan tanah bervariasi antara 0,005-0,15%. Ketersediaan P bagi tanaman tergantung pada mineral tanah (ikatan Fe/Al/Ca terhadap P), pH tanah, efek kation, efek anion, kelimpahan P, bahan organik, waktu dan temperatur, dan genangan (Havlin *et al.*, 1999).

Fungsi P pada tanaman menurut Marschner (1995) dan Havlin *et al.* (1999) antara lain (i) sebagai penyusun struktur makromolekul dalam asam nukleat (DNA dan RNA), nukleotida, fosfoprotein, fosfolipid, dan fosfat gula, (ii) sebagai salah satu unsur penyusun biomembran, (iii) sebagai sumber penyimpanan dan transfer energi dalam bentuk ATP, ADP, dan AMP, (iv) mengontrol beberapa reaksi enzim kunci, dan (v) untuk pembentukan akar, biji, dan buah.

Unsur P mobil dalam tanaman, sehingga ketika defisiensi terjadi, unsur tersebut dapat berpindah dari jaringan yang lebih tua ke jaringan yang lebih muda. Kekurangan P pada tanaman padi menyebabkan berkurangnya jumlah anakan, pertumbuhan kerdil, dan menurunnya jumlah butir gabah dalam malai. Tanaman padi yang kekurangan P biasanya berwarna hijau tua, daunnya lebih panjang daripada tanaman normal. Pada beberapa varietas, daun-daun tuanya berubah warna menjadi oranye atau keungu-unguan. P lebih tersedia di lahan tergenang daripada di lahan kering (Untung *et al.*, 1991).

Secara umum adaptasi tanaman pada kondisi defisiensi P dilakukan melalui mekanisme peningkatan penyerapan dan efisiensi penggunaan P dalam tanaman. Peningkatan penyerapan P dari tanah dilakukan tanaman dengan membuat sejumlah perubahan morfologi, fisiologi, biokimia, dan molekuler dalam merespon pertumbuhan di bawah kondisi defisiensi P. Hal ini meliputi perubahan morfologi dan arsitektur akar, akumulasi pigmen *antosianin*, sekresi *fosfomonoesterase* dan asam organik ke dalam rizosfir, perubahan efisiensi penangkapan P, dan perubahan metabolisme dalam sel tanaman (Vance *et al.*, 2002).

Penelitian terkini menyebutkan toleransi terhadap defisiensi P berbanding lurus dengan aktivitas *P transporter* yang membawa P ke dalam sel tanaman, seperti yang dibuktikan pada sel tanaman *alfafa* (Abu Qamar *et al.*, 2005). *Fosfat transporter* ini jenisnya bisa berbeda-beda untuk setiap jenis tanaman. Selain itu peningkatan aktivitas pompa proton juga dapat diamati pada tanaman yang toleran defisiensi P (Smith, 2002). Sekresi asam organik untuk mengkelat mineral-

mineral yang mengikat P, seperti sitrat, malat, dan fenolik. Alternatif lain adalah tanaman berasosiasi dengan jamur mikoriza (Rausch dan Bucher, 2002).

Mekanisme untuk meningkatkan efisiensi penggunaan unsur hara dalam kondisi defisiensi P menurut Marschner (1995) dapat dilakukan pada tingkat seluler dengan melakukan kompartemensi di dalam vakuola, mengikat unsur tersebut dengan unsur-unsur lain, retranslokasi/remobilisasi unsur P, dan unsur tersebut disimpan dalam biji sebagai cadangan hara. Remobilisasi atau retranslokasi P dalam tanaman merupakan salah satu mekanisme yang penting bagi kelangsungan hidup tanaman. Daun-daun tua bisa mengirimkan P kembali kepada daun-daun muda bila tanaman dalam kondisi kurang P. Kompartemensi P juga mempengaruhi efisiensi penggunaan P tanaman. P yang disimpan dalam vakuola bisa dimanfaatkan sewaktu-waktu oleh tanaman. Persediaan P untuk tanaman kira-kira 85-95% berada di dalam vakuola. Proses-proses ini ditujukan untuk menjaga agar sel tetap bisa hidup. Vance *et al.* (2002) menyebutkan modifikasi internal lainnya adalah melakukan modifikasi metabolisme karbon, yakni dengan melewati tahap saat P dibutuhkan dan membuat jalur respirasi alternatif. Gen-gen yang terlibat dalam respon terhadap defisiensi P telah diidentifikasi berjumlah lebih dari 100 gen. Masing-masing tanaman bisa menggunakan beberapa gen dalam merespon lingkungan yang mengalami defisiensi P. Morcuende *et al.* (2007) melaporkan pada Arabidopsis lebih dari 1.000 gen akan terpengaruh dengan pengurangan P. Pada padi sendiri telah banyak diidentifikasi gen-gen yang mengatur terlibat pada penangkapan P (seperti *Pup1*), transportasi P, penyimpanan P, dan efisiensi penggunaan P (Ismail *et al.*, 2007). Masing-masing mekanisme tersebut melibatkan banyak gen yang harus dipilah masing-masing gen. Gen-gen tersebut juga tidak bisa bekerja sendiri di dalam menghadapi lingkungan yang defisien P, namun memerlukan bantuan gen lain, misalnya gen yang terlibat dalam toleransi terhadap keracunan aluminium (*Alt genes*), keracunan besi, keracunan garam.

PEMETAAN *PUP1* (*P UPTAKE 1*)

Pup1 merupakan salah satu lokus di dalam kromosom padi yang diduga terlibat dalam salah satu mekanisme toleransi terhadap defisiensi P. Eksplorasi *Pup1* ini telah berlangsung sejak tahun 90-an dengan pembuatan materi pemetaan, di mana Kasalath dipilih sebagai tetua donor karena Kasalath memiliki ekspresi fenotipik (*P uptake*) lebih baik pada saat ditanam di tanah yang kurang P dibandingkan genotipe yang lain. Nipponbare termasuk tanaman yang peka

terhadap defisiensi P, sehingga untuk keperluan pemetaan QTL digunakan persilangan Kasalath dan Nipponbare.

Kasalath merupakan padi subspecies *indica* (beberapa peneliti telah memasukkan Kasalath ke dalam padi subspecies *aus*) dan termasuk *landrace* (padi lokal), berasal dari India dan dikenal sebagai padi lahan kering. Kasalath memiliki bentuk morfologi yang tinggi, berakar banyak, dan dalam. Kasalath ternyata sangat sensitif terhadap keracunan Al, walaupun mengeluarkan asam organik (sitrat) tapi jumlahnya sangat sedikit, sehingga tidak bisa membantu pelepasan ikatan P dengan Al (Ma *et al.*, 2002). Namun, apabila Kasalath ditanam dalam media yang memiliki faktor pengikat P yang kecil, ternyata Kasalath memiliki kemampuan menyerap P yang lebih tinggi.

Selain memiliki daya penangkapan P (*P uptake*) sebelum masuk ke dalam tanaman, ternyata Kasalath juga efisien dalam menggunakan P. Hal ini dibuktikan dengan penelitian introduksi gen *OsPTF1* (*Oryza sativa* L. *phosphate transcription factor*), yang diklon dari Kasalath. Introduksi gen ini ke dalam padi yang sensitif defisiensi P (Nipponbare) dengan menggunakan media *Agrobacterium tumefaciens* telah meningkatkan jumlah anakan, bobot kering akar, dan tajuk sebesar 30% pada larutan hara dan 20% pada media tanah (Yi *et al.*, 2005). Hal ini membuktikan Kasalath memiliki dua mekanisme sekaligus dalam menghadapi kondisi defisien P, yakni mekanisme eksternal dan internal. Penggunaan Kasalath sebagai tetua persilangan dengan Nipponbare telah menyebabkan peningkatan penangkapan P (*P uptake*) sebesar 28-55% lebih tinggi dibandingkan dengan Nipponbare (Wissuwa dan Ae, 2000).

Publikasi pertama yang melaporkan marka-marka yang terpaut dengan sifat defisiensi P pada padi dilaporkan oleh Wissuwa *et al.* (1998) yang menggunakan 98 populasi *Backcross Inbred Line* (BILs), yakni BC₁F₇ sebagai materi pemetaan genetik yang berasal dari persilangan Nipponbare (*japonica*, sensitif) dan Kasalath (*indica/aus*, toleran). Hasilnya didapatkan sebuah QTL utama (*major QTL*) pada kromosom 12 untuk penangkapan P (*P uptake*), penggunaan P yang efisien (*P use efficiency*), bobot kering (*dry weight*), dan jumlah anakan (*tiller number*). Marka yang digunakan adalah 245 marka RFLP, di mana marka C443 terpaut erat (*tightly linked*) dengan keempat sifat tersebut. Pada kromosom 12 di daerah sekitar lokus C443 ini memberikan sumbangan variasi fenotipik sebesar 27,9% untuk *P uptake*, 19,1% untuk *P use efficiency*, 26,5% untuk bobot kering dan 20,6% untuk jumlah anakan. Sumbangan untuk fenotipik yang lebih dari 50% menjadikan lokus C443 ini diang-

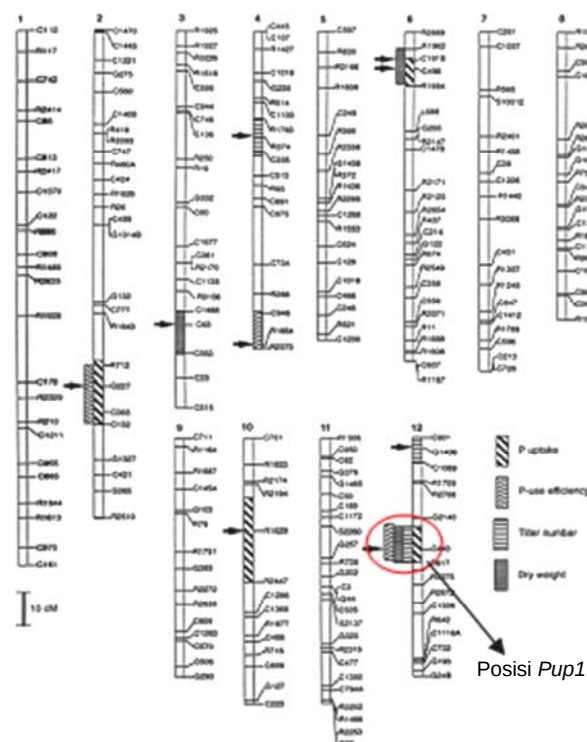
gap sebagai QTL mayor (utama), di mana lokus ini bisa dipakai sebagai alat deteksi yang akurat. Lokus inilah yang kemudian dinamakan dengan *Pup1* (*P uptake 1*). Peta QTL pertama yang dilaporkan Wissuwa *et al.* (1998) disajikan dalam Gambar 1.

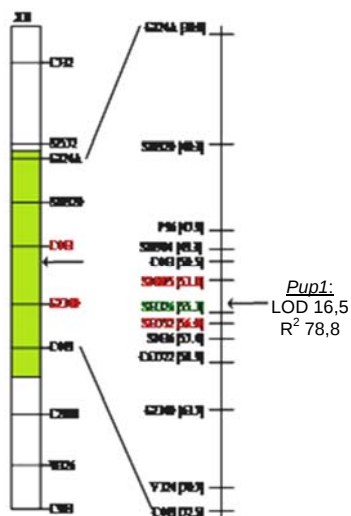
Wissuwa dan Ae (2001) melaporkan telah membuat populasi NIL (*Near Isogenic Lines*) dari persilangan Kasalath dan Nipponbare. Kasalath digunakan sebagai tetua donor dan Nipponbare sebagai tetua pemulih (*recurrent parent*) Marka RFLP C498 (kromosom 6) dan C443 (kromosom 12) digunakan untuk melakukan seleksi. Pada akhirnya didapatkan populasi NIL-C498 yang secara genetik mengandung 96% Nipponbare, sedangkan NIL-C443 mengandung 91% Nipponbare. Wissuwa *et al.* (2002) melanjutkan penelitian sebelumnya (Wissuwa *et al.*, 1998) dengan mempertajam peta QTL yang sudah dibuat sebelumnya dengan memfokuskan pada lokus *Pup1* (*P uptake 1*), dan telah memetakannya secara lebih akurat pada kromosom 12 dengan jarak 3 cM di antara marka S14025 dan S13126 seperti disajikan dalam Gambar 2.

Marka-marka RFLP tersebut kemudian dikonversi ke dalam marka mikrosatelit yang lebih mudah penggunaannya, seperti disajikan dalam Gambar 3. Posisi *Pup1* pada akhirnya dapat dipetakan dengan lebih baik pada posisi 14,95 Mbp-15,91 Mbp dan beberapa marka spesifik berhasil dibuat untuk dapat di-

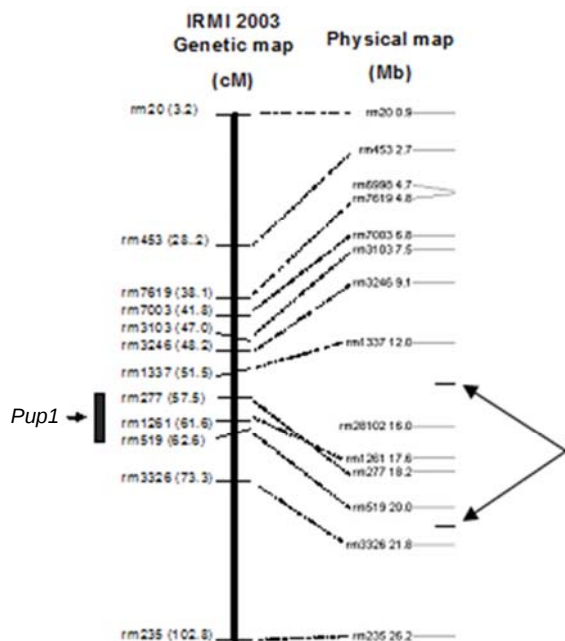
pakai sebagai alat seleksi seperti yang disajikan dalam Gambar 4. Marka RM28073 dan RM28102 sebenarnya sudah cukup untuk dipakai pada kegiatan pemuliaan tanaman padi dengan menggunakan tetua Kasalath atau turunannya (misal NIL-C443, NIL-C498). Kedua marka ini berjarak 0,96 Mbp atau sekitar 3,84 cM, sudah cukup baik dipakai untuk kegiatan MAB (*Marker Assisted Backcrossing*).

Pembuatan peta genetik *Pup1* ini melibatkan dua lembaga, yakni Jepang (JIRCAS) yang dipimpin oleh Dr. Matthias Wissuwa dan di IRRI yang dipimpin oleh Dr. Abdelbagi M. Ismail. Penelitian pemetaan *Pup1* juga berlangsung 1998 sampai sekitar tahun 2006. Perubahan dari marka RLFP ke dalam marka mikrosatelit/SSR tidak memerlukan waktu yang lama karena telah terfokus pada daerah QTL di kromosom 12. *Fine mapping* yang dilakukan juga tidak memerlukan waktu lama karena telah tersedia sekuen pada daerah QTL *Pup1* di dalam database padi. Marka-marka ini sudah bisa dipakai untuk kegiatan seleksi (MAS). Namun, untuk mengidentifikasi gen-gen yang berada di daerah QTL *Pup1* tersebut diperlukan kajian sekuen dan ekspresi dari sekuen-sekuen DNA kandidat gen-gen yang di dalam lokus *Pup1*. Oleh karena itu penelitian studi ekspresi daerah *Pup1* ini kini masih berlangsung di IRRI dengan tim peneliti yang dipimpin oleh Dr. Sigrid Heuer.





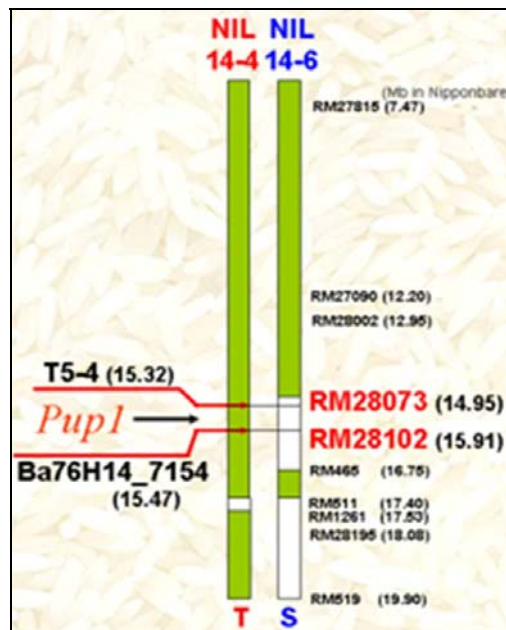
Gambar 2. Peta lokasi *Pup1* pada kromosom 12 Kasalath berdasarkan marka RFLP (Wissuwa *et al.*, 2002).



Gambar 3. Konversi marka RFLP ke dalam marka mikrosatelit (Collard *et al.*, 2006).

ANALISIS SEKUEN DAN EKSPRESI *PUP1*

Daerah *Pup1* yang telah diketahui posisinya secara baik pada daerah di antara T5-4 dan 76H_7154 (145 kbp, dengan posisi 15.321.347 dan 15.466.417 pada TIGRS kromosom 12 dilakukan analisis sekuen, dengan membandingkan sekuen pada Kasalath dengan database Nipponbare, dan didapatkan ada beberapa sekuen di Kasalath yang unik, hanya dimiliki oleh Kasalath, dan tidak dimiliki oleh Nipponbare (Gambar 5). Gen-gen yang berada dalam lokus *Pup1* juga mulai

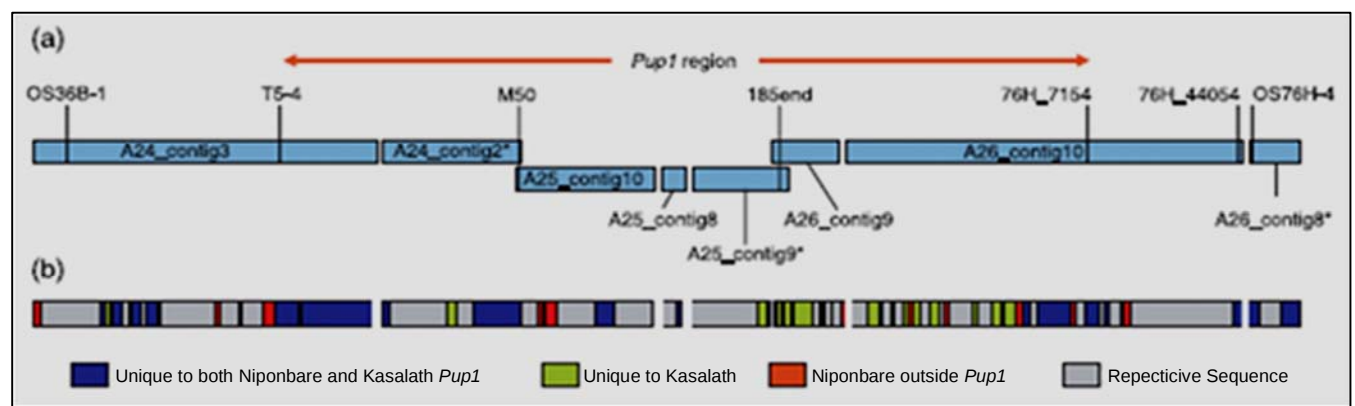


Gambar 4. Peta terbaru yang menunjukkan posisi *Pup1* (Chin *et al.*, 2007).

diidentifikasi dan didapatkan sekitar lebih dari 60 gen yang berada dalam lokus tersebut (Ismail *et al.*, 2007). Gen-gen yang didapatkan berdasarkan analisis sekuen ini ada yang hanya dimiliki Kasalath, atau Kasalath dan Nipponbare memiliki gen yang sama. Beberapa gen-gen penting yang ada di dalam lokus *Pup1* dapat dilihat dalam Tabel 1.

Berdasarkan analisis sekuen dan ekspresi gen yang berada di dalam lokus *Pup1* antara Nipponbare dan Kasalath ternyata tidak didapatkan gen yang terlibat langsung terhadap proses penangkapan P (*P uptake*). Seperti gen-gen *Pi transporter* atau *phosphatase* ternyata tidak didapatkan di dalam lokus *Pup1*, padahal kedua gen tersebut merupakan gen-gen yang paling penting dalam transportasi P (Ismail *et al.*, 2007). Hal ini terbukti tidak didapatkan gen yang mengatur proses yang berhubungan dengan *P uptake* secara fisiologi, misalnya sekresi asam organik, panjang rambut akar, dan kepadatan akar. Oleh karena itulah mungkin lokus *Pup1* meningkatkan toleransi terhadap defisiensi P dengan menggunakan mekanisme baru atau lokus tersebut mengkode gen-gen regulator (faktor transkripsi) yang mempengaruhi gen-gen lain (Heuer *et al.*, 2009).

Salah satu gen yang berada dalam daerah INDEL (*Insertion Deletion*) pada daerah *Pup1* di Kasalath mengkode protein kinase yang sangat penting dalam proses fosforilasi (pelepasan fosfor) dan sangat terkait dengan transportasi P. Diduga gen ini terlibat dalam perbaikan tanaman toleran defisiensi P yakni



Gambar 5. Perkiraan kondisi *Pup1* pada Nipponbare dan Kasalath (Heuer *et al.*, 2009). a = tiga segmen Kasalath dalam BAC (*Bacterial Artificial Chromosomes*) (K0159D02, K0322B09, K0185A05), b = 452 kb segmen Kasalath yang unik dibandingkan dengan Nipponbare yang dibuat berdasarkan primer-primer *Pup1*.

Tabel 1. Gen-gen yang berada dalam lokus *Pup1* (Ismail, 2007).

Fragmen ^{*)}	Kemiripan sekuen gen
2	<i>Hypothetical protein</i> dan <i>transposon</i>
4	<i>Alpha dioxygenase</i>
5	<i>DNA alpha dioxygenase</i>
	<i>Protein copper homeostasis Cut C proteins</i>
7	<i>Hypothetical protein</i>
13	<i>Hypothetical protein</i>
16	<i>Hypothetical protein</i>
18	<i>Dirigent protein</i>
19	<i>Hypothetical protein</i>
21	<i>ULP1 protease phosphatase</i> dan <i>transporon</i> (all 95% identical AA)
22/24	<i>PR1 like</i>
26	<i>Expressed protein</i>
27	<i>Leuchine rich repeat (LRR) protein</i>
38	<i>Kinase</i>
42	Gen tidak ada dalam database
43	<i>Receptor serine/threonine kinase</i>
	<i>Zn-knucle</i>
50	<i>Bp 577-613 hit many chromosomes</i> dan <i>chloroplast DNA</i> pada padi dan spesies lain
51	<i>Zn-finger transcription factor</i>
64	<i>Hypothetical protein</i>
65	<i>Exo70</i> dan <i>transposons</i>
67	<i>Wall associated kinase</i>
68	<i>Aspartyl protease</i>
69	<i>Hypothetical protein</i>

^{*)} nomor fragmen identik dengan nama primer pada Tabel 2.

memperbaiki performan tanaman dalam tahap post translasi untuk aktivasi penangkapan P. Gen-gen lain seperti *dirigent-like*, *fatty acid α -dioxygenase*, *aspartic proteinase* ternyata tidak berhubungan langsung dengan penangkapan P, tetapi membantu menciptakan kondisi sehingga penangkapan P menjadi lebih baik. Ketiga gen tersebut bekerja sama di dalam merubah (meningkatkan) kandungan lignin membran sel sehingga meningkatkan volume akar pada kondisi kurang P dan secara tidak langsung akan meningkatkan penangkapan P. Di samping itu, ketiga gen tersebut berperan penting di dalam meningkatkan mekanisme ketahanan terhadap beberapa cekaman abiotik (kekeringan, keracunan aluminium) dan terhadap blas,

BLB, dan penggerek batang (Heuer *et al.*, 2009). Potongan-potongan gen tersebut memang memerlukan faktor transkripsi yang cocok agar bisa terekspresi dengan sempurna.

Studi ekspresi gen-gen di dalam lokus *pup1* ini masih terus berlangsung sampai saat ini. sekuen dari *pup1* ini dapat diakses melalui bank gen dengan kode lokus ab458444 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/ab458444.1>). Di dalam situs tersebut telah dapat diakses sekuen lokus *pup1* secara utuh, sehingga bagi siapa saja yang tertarik untuk mengeksplorasi gen-gen yang berada di dalam lokus tersebut dapat melakukannya dengan bebas.

Karakteristik lokus *Pup1* berdasarkan penelitian yang telah dilakukan adalah (Ismail *et al.*, 2007):

1. Tidak mengeluarkan substrat (asam organik) untuk melepas P dari bahan organik, atau ikatan Fe/Al.
2. Tidak menangkap P lebih efisien (tidak membuat akar menjadi responsif dalam menangkap P).
3. Tidak merangsang simbiosis dengan mikoriza.
4. Tidak ditemukan di genom Nipponbare (spesifik hanya terdapat di Kasalath)
5. Tanaman yang berisi *Pup1* akan membentuk bobot kering akar relatif lebih tinggi pada kondisi minus P, sehingga penangkapan P menjadi lebih banyak.
6. Panjang akar tidak berhubungan dengan *Pup1*.

Berdasarkan penelitian terkini (Gamuyao *et al.*, 2012) menyebutkan di dalam lokus *Pup1* terdapat gen yang mengatur pertumbuhan akar, dinamakan gen *Phosphorus-starvation tolerance (PSTOL1)*. Keberadaan gen ini di dalam tanaman transgen telah memicu pembentukan akar lebih cepat pada awal pertumbuhan sehingga tanaman bisa mendapatkan P lebih cepat dan lebih banyak dibandingkan dengan tanaman lain yang tidak memiliki gen *PSTOL1*. Introgresi gen ini di dalam tanaman padi budi daya diharapkan bisa meningkatkan produksi padi di daerah yang kurang P.

PRIMER-PRIMER SPESIFIK *PUP1*

Kegiatan pembuatan primer-primer spesifik lokus *Pup1* ini merupakan penelitian yang terkait dengan penelitian analisis sekuen dan ekspresi *Pup1*, dengan tim peneliti yang sama. Sampai saat ini telah dihasilkan banyak sekali primer spesifik yang bisa mendeteksi keberadaan gen di dalam lokus *Pup1*. Primer-primer tersebut dapat dilihat dalam Tabel 2. Primer-primer tersebut dapat digunakan sebagai marka untuk seleksi, dan dipakai sebagai marka *foreground*. Marka *foreground* merupakan marka yang terpaut sangat erat (*tightly linkage*), dan pada *Pup1* ini marka *foreground* merupakan marka spesifik (marka kandidat gen). Penggunaan marka *foreground* ditambah marka *rekombinan* sudah mulai banyak dilakukan, apalagi dengan penambahan marka yang ada di seluruh kromosom padi (= marka *background*). (Gopalakrishnan *et al.*, 2008). Marka-marka untuk *Pup1* perlu diperbanyak karena dalam proses seleksi diperlukan marka-marka yang bisa membedakan tetua pemulih dengan tetua donor, sehingga semakin banyak marka yang bisa digunakan berarti semakin banyak peluang yang bisa didapatkan untuk marka yang polimorfik. Marka-marka spesifik yang dihasilkan ini memiliki perbedaan basa yang tipis antara tetua donor (Kasalath atau NIL-C443) dengan tetua

Indonesia sehingga harus menggunakan sistem pemisahan DNA yang lebih sensitif seperti menggunakan gel poliakrilamid (Prasetyono *et al.*, 2008).

Aplikasi dari marka-marka spesifik *Pup1* selain digunakan sebagai alat seleksi dengan tetua Kasalath atau NIL-NIL turunan Kasalath, juga bisa dipakai untuk mendeteksi keberadaan gen yang berada di dalam lokus *Pup1* pada galur atau varietas lain. Chin *et al.* (2009) melaporkan dari 159 aksesori padi yang diteliti menggunakan primer spesifik untuk *Pup1* ternyata lebih dari 50% padi-padi gogo memiliki segmen *Pup1* juga, sedangkan hanya 10% padi-padi sawah yang memiliki segmen *Pup1*. Hal ini membuktikan segmen *Pup1* ternyata dimiliki juga oleh padi-padi lain, selain Kasalath. Jadi, dampak positif dari marka spesifik ini adalah tetua donor yang digunakan tidak harus Kasalath, tapi tetua asli Indonesia. Hal ini akan lebih memudahkan perakitan varietas baru yang toleran terhadap defisiensi P karena tidak perlu menggunakan galur dari IRRI (tidak memerlukan *Material Transfer Agreement*).

PROGRAM PEMULIAAN DI INDONESIA

Program perakitan galur-galur baru yang toleran terhadap defisiensi fosfor di Indonesia telah dilakukan sejak tahun 2005 melalui *Proyek Generation Challenge Programme (GCP)*. Tetua Indonesia yang digunakan adalah Dodokan, Situ Bagendit, dan Batur. Setelah dilakukan amplifikasi menggunakan seluruh primer spesifik *Pup1* ternyata dari tiga tetua Indonesia Dodokan memiliki segmen *Pup1* juga secara penuh, sehingga diperkirakan efek persilangan dengan tetua yang mengandung *Pup1* tidak banyak mempengaruhi efektivitasnya dalam penangkapan P. Situ Bagendit sama sekali tidak memiliki segmen *Pup1* sehingga efek masuknya segmen *Pup1* akan jauh lebih kelihatan. Batur memiliki segmen *Pup1* secara *partial*, artinya sebagian segmen *Pup1* sudah dimiliki Batur sehingga efek tambahan dari adanya *Pup1* juga tidak begitu besar (Chin *et al.*, 2011). Namun, ekspresi *Pup1* tidak berdiri sendiri tetapi dipengaruhi oleh gen lain sehingga perpaduan gen-gen di dalam persilangan tersebut diperkirakan akan memberikan hasil yang baik.

Untuk strategi ke depan pemilihan tetua asli Indonesia yang telah teruji di lingkungan yang toleran cekaman abiotik sangat bermanfaat mengingat *Pup1* tidak bisa melepas ikatan P dengan unsur lain, namun bisa mempercepat penangkapan P yang telah terlepas dari ikatan unsur lain. Misalnya, tetua Indonesia yang toleran terhadap keracunan aluminium akan meningkatkan hasilnya apabila disisipi *Pup1* karena selain bisa melepas ikatan P dari Al juga bisa meningkatkan

Tabel 2. Primer-primer spesifik *Pup1*.

Nama marka	Nama gen (kandidat)	Tipe marka	Lokasi secara fisik (bp)		Ukuran pita (bp) Kas/Nipp	Sekuen primer F	Sekuen primer R	Referensi
			Kasalath AB458444.1	Nipponbare chromosome 12				
K01 (= Kas1n)	<i>OsPupK01</i>	Kodominan	96175-96299	15315156-15315277	125/122	AGTCTGGATGGACAACCTGCTGCTG	TGCTAGCTATTGCCGTACGTCG	Chin <i>et al.</i> (2011)
K05	<i>OsPupK05</i>	Kodominan	116430-116701	15336063-15336342	272/280	ATTGACATCGACGGCGAC	TCCTCGTAACATGGCTTGC	Chin <i>et al.</i> (2011)
K20-1	<i>OsPupK20-2</i>	Kodominan	169881-170120	15410254-15410496	240/243	TCAGGTGATGGGAATCATTG	TGTTCCAACCAACAACCTG	Chin <i>et al.</i> (2011)
K20-1/ <i>MSE</i>	<i>OsPupK20-2</i>	CAPS (<i>MseI</i>)			201/243			Chin <i>et al.</i> (2011)
K20-2	<i>OsPupK20-2</i>	Kodominan	169290-170607	15409652-15410981	982/995	TCAAAATTTCTTCAGGTATGTACTCC	TTGGGTGATCAGCTTTGAGA	Chin <i>et al.</i> (2011)
K20-2/ <i>BSP</i>	<i>OsPupK20-2</i>	CAPS (<i>Bsp1286I</i>)			K: 231+349+402 N: 413+582 212/206			Chin <i>et al.</i> (2011)
K29-1	<i>OsPupK29</i>	Kodominan	205067-205287	15431572-15431786		ATGGCAACGGGGTAGAG	GTCCAGGTAAACCAGAGGAA	Chin <i>et al.</i> (2011)
K29-2	<i>OsPupK29</i>	Kodominan	204398-204616	15430672-15430883	291/212	CCCCTGCTGCTTACCTTA	CTCCCGTCAAGCACAATCT	Chin <i>et al.</i> (2011)
K29-3	<i>OsPupK29</i>	Kodominan	202698-202933	15419578-15419825	236/248	TTCGTCAGATGCTGCTATG	TCTTCGGTGAATTGGCACA	Chin <i>et al.</i> (2011)
K41	<i>OsPupK41</i>	Dominan	262050-262431	Kosong	382/-	TGATGAATCCATAGGACAGCGT	TCAGGTGGTCTCTTGGTGA	Chin <i>et al.</i> (2011)
K42	<i>OsPupK42</i>	Dominan	267154-268071	Kosong	918/-	CCCGAGAGTTCTCAGAAGGA	AGTGAGTGGCGTTGCGAT	Chin <i>et al.</i> (2011)
K43	<i>OsPupK43</i>	Dominan	268590-269501	Kosong	912/-	AGGAGGATGAGCCTGAAGAGA	TCGCACTAACAGCAGCAGATT	Chin <i>et al.</i> (2011)
K45	<i>OsPupK45</i>	Dominan	274072-274344	Kosong	276/-	GCGGAAGAAGAGGATAACGA	TCTAGGCTTCGTTGGCAAG	Chin <i>et al.</i> (2011)
K46-1	<i>OsPupK46-2</i>	Dominan	275710-276232	Kosong	523/-	TGAGATGACCGTCAAGATGCT	AAGGACCACCATTCATAGC	Chin <i>et al.</i> (2011)
K46-2	<i>OsPupK46-2</i>	Dominan	276371-276597	Kosong	227/-	AGGAAGATGGTTGCTGTTGG	TTCAACCAACAGTGTGTC	Chin <i>et al.</i> (2011)
K48	<i>OsPupK48</i>	Dominan	282795-283640	Kosong	847/-	CAGCATTACAGAACCAACAG	ATCCGTGTGGAGCAACTCATC	Chin <i>et al.</i> (2011)
K52	<i>OsPupK52</i>	Dominan	300870-301374	Kosong	505/-	ACCGTTCACACAGATTCAT	CCCGTAATAGCAACAACCAA	Chin <i>et al.</i> (2011)
K59 (= Kas59)	<i>OsPupK59</i>	Dominan	324843-325392	Kosong	550/-	GGACACGGATTCAAGGAGGA	TGCTTTCCATTTCGGGCTC	Chin <i>et al.</i> (2011)
Ba76H14_7154	Kasgene69	Kodominan	271716-272007	15466159-15466418	292/259	GAAACGGGGTCAATAAGC	GGGTTCTGCAACAGGAGTA	Chin <i>et al.</i> (2009)
Kasgene4n_C2	Kasgene4n	*	*	*		TCGGGTCAAGTTTGGATCAT	CCAAGAAACCTGCTCGACTG	**
Kasgene5n_NK_C	Kasgene5n	Kodominan	*	15335996-15336234	227/238	CGTAGGACAGTGATGGAGTACG	GCAATGCGCAAGCAAAATG	**
Kasgene16_C	Kasgene16	Kodominan	*	*	233/250	GCGGTTCTATCTGCTGATTGTG	CTGTGTAAGTGCGACACA	**
Kasgene18_C	Kasgene18	Kodominan	75692-76406	15409792-15410981	240/243	TCAGGTGATGGGAATCATTG	TGTTCCAACCAACAACCTG	**
Kasgene19_C2	Kasgene19	Kodominan	*	15414907-15415126	300/309	CTTGATGCTGTAGGCCCTTA	ACGTTGAGAAAAATGCGATG	**
gene26-1	Kasgene26	Kodominan	108195-111782	15418872-15421109	480/491	CCATAGTAGCACAAGAAACGACA	GCTTCAATGAGCCGATTACGAA	**
Primer 38	Kasgene38	Dominan	165334-171018	Kosong	382/0	TGATGAATCCATAGGACAGCGT	TCAGGTGGTCTCTGTTGGTA	**
Primer 39	Kasgene39	Dominan	171934-173121	Kosong	918/0	CCGAGAGTTCTCAGAAGGA	AGTGAGTGGCGTTTGGCAT	**
Primer 40	Kasgene40	Dominan	172735-175953	Kosong	912/0	AGGAGGATGAGCCTGAAGAGA	TCGCACTAACAGCAGCAGATT	**
Primer 42	Kasgene42	Kodominan	178979-179355	Kosong	327/0	TATCGCGAAGAAGAGGATAACGA	CAGTATGCAAAAGTCCCTCAAGTCCTGATGGCAG	**
Primer 43	Kasgene43	Kodominan	180557-184996	Kosong	523/0	TGAGATAGCCGTCAAGATGCT	AAGGACCACCATTCATAGC	**
Primer 45	Kasgene45	Kodominan	186961-187907	Kosong	847/0	CAGCATTACAGAACCAACAG	ATCCGTGTGGAGCAACTCATC	**
Primer 50	Kasgene50	Kodominan	203706-204517	Kosong	505/0	ACCGTTCACACAGATTCAT	CCCGTAATAGCAACAACCAA	**
Lu_SSR3	*	Kodominan	250646-250989	15493132-15493499	344/368	CACCACCTGCTTGTGTGC	AAACCAATTAGCCCCGATT	**
Bb66P16_2258	Intergenic Kasgene 65-66	Kodominan	255118-255292	15453122-15453266	175/144	CAATGGGACGTGTTCTTGA	CCCTGTTGCTGCATAATTT	**
K30n_1	*	Kodominan	*	*	*	ATGGCAACGGGGTAGAG	GTCCAGGTAAACAGAGGAA	**
K30n_2	*	Kodominan	*	*	*	CCCCTGCGTTCTACCTTA	CTCCCGTCAAGCACAATCT	**
K30n_4	*	Kodominan	*	*	*	TTCGTCAGATGCTGCTATG	TCTTCGGTGAATTGGCACA	**

* data tidak tersedia, No. 4 dan 6 menggunakan enzim restriksi. ** Dr. Joong Hyoun Chin, 2008 (komunikasi pribadi).

penangkapan P. Kasalath, sebagai tetua asli yang mengandung *Pup1* walaupun toleran terhadap defisiensi P ternyata sama sekali tidak toleran terhadap keracunan aluminium (Ma *et al.*, 2002), bahkan lebih sensitif dibanding tanaman cek sensitif Al dari Indonesia (ITA131) (Prasetyono, 2010).

Mekanisme *Pup1* ini juga telah membuat program penelitian baru di dalam Proyek GCP tahun 2010-2013, yakni dengan menggabungkan *Pup1* dengan gen-gen untuk toleransi terhadap aluminium

(*Alt*), dengan menambahkan gen *Alt* ke dalam padi Indonesia yang telah tersisipi *Pup1*. Efek perpaduan dua gen ini diharapkan akan memberikan hasil yang positif.

Tantangan yang harus dihadapi dalam pemanfaatan lokus *Pup1* dalam penelitian toleransi defisiensi P adalah masih sulitnya membuat pengujian fenotipik buatan yang handal. Pengujian fenotipik untuk *Pup1* selama ini menggunakan media tanah dengan risiko jenis tanah yang berbeda akan memberikan hasil

yang berbeda, mungkin dapat dipecahkan dengan penggunaan media buatan yang terkondisikan sama dengan kondisi di alam, misalnya media yang P-nya terikat oleh Al, Ca, Fe atau unsur lain yang menyerupai kondisi sebenarnya.

KESIMPULAN

Lokus *Pup1* berisi banyak gen yang tidak terlibat langsung dengan penangkapan P, tetapi mempengaruhi penangkapan P. Beberapa gen (*dirigent-like*, *fatty acid α -dioxxygenase*, *aspartic proteinase*) berperan meningkatkan kadar lignin sehingga meningkatkan volume akar menyebabkan penangkapan P menjadi lebih baik dan meningkatkan daya tahan terhadap cekaman biotik dan abiotik. Gen *PSTOL1* berperan di dalam percepatan pembentukan akar pada pertumbuhan awal tanaman sehingga tanaman bisa mendapatkan P lebih cepat dan lebih banyak.

Marka-marka spesifik *Pup1* dapat dimanfaatkan untuk program MAB sebagai marka *foreground*, dan bisa dikombinasikan dengan marka rekombinan dan marka *background*. Marka ini juga bisa dipakai untuk mengeksplorasi plasma nutfah padi Indonesia untuk mendapatkan sumber donor baru yang mengandung *Pup1* dengan *background* genetik asli dari Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- Abu Qamar, S.F., T.G. Sors, S.M. Cunningham, B.C. Joern, and J.J. Volenec. 2005. Phosphate nutrition effects on growth, phosphate transporter transcript levels and physiology of alfalfa cells. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 82:131-140.
- Badan Pusat Statistik. 2008. Statistik Indonesia. Jakarta.
- Chin, J.H., X. Lu, M. Penarubia, V. Aldemita, T. Chua, S. Haefele, A.M. Ismail, M. Wissuwa, and S. Heuer. 2007. Phosphorus deficiency tolerance in rice: Development of molecular markers and a phenotyping system for *Pup1*, a major QTL for phosphorus deficiency tolerance. Poster on 5th International Symposium on Rice Functional Genomics 2007. Japan, October 15-17, 2007.
- Chin, J.H., X. Lu, S.M. Haefele, R. Gamuyao, A.M. Ismail, M. Wissuwa, and S. Heuer. 2009. Development and application of gene-based markers for the major rice QTL *Phosphorus uptake 1*. *Theor. Appl. Genet.* DOI 10.1007/s00122-009-1235-7.
- Chin, J.H., R. Gamuyao, C. Dalid, M. Bustamam, J. Prasetyono, S. Moeljopawiro, M. Wissuwa, and S. Heuer. 2011. Developing rice with high yield under phosphorus deficiency: *Pup1* sequence to application. *Plant Physiol.* 156:1202-1216.
- Collard, B.C.Y., M. Thomson, M. Penarubia, X. Lu, S. Heuer, M. Wissuwa, A.M. Ismail, and D.J. Mackill. 2006. SSR analysis of near isogenic lines (NILs) for P deficiency tolerance. *SABRO J. Breed. Gen.* 38(2):131-138.
- Cordell, D., J.O. Dragert, and S. White. 2009. The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environmental Change* 19:292-305.
- Gamuyao, R., J.H. Chin, J.P. Tanaka, P. Pesaresi, S. Catausan, C. Dalid, I.S. Loedin, E.M.T. Mendoza, M. Wissuwa, and S. Heuer. 2012. The protein kinase *Pstol1* from traditional rice confers tolerance of phosphorus deficiency. *Nature* 488. Doi:10.1038/nature11346.
- Gopalakrishnan, S., R.K. Sharma, R.K. Anand, M. Joseph, V.P. Singh, A.K. Singh, K.V. Bhat, N.H. Singh, and T. Mohapatra. 2008. Integrating marker assisted *background* analysis with foreground selection for identification of superior bacterial blight resistant recombinants in Basmati rice. *Plant Breed.* 127:131-139.
- Havlin, J.L., J.D. Beaton, S.L. Tisdale, and W.L. Nelson. 1999. *Soil Fertility and Fertilizers*. Sixth edition. Prentice Hall. New Jersey. 499 p.
- Heuer, S., X. Lu, J.H. Chin, J.P. Tanaka, H. Kanamon, T. Matsumoto, T.D. Leon, V.J. Ulat, A.M. Ismail, M. Yano, and M. Wissuwa. 2009. Comparative sequence analyses of the major quantitative trait locus *phosphorus uptake 1* (*Pup1*) reveal a complex genetic structure. *Plant Biotech. J.* 7:456-471.
- Ismail, A.M. 2007. Revitalizing marginal lands: Discovery of genes for tolerance of saline and P-Deficient Soils to Enhance and Sustain Productivity. Presented on GCP Meeting, Bogor (Indonesia), 24 Agustus 2007.
- Ismail, A.M., S. Heuer, M.J. Thomson, and M. Wissuwa. 2007. Genetic and genomic approaches to develop rice germplasm for problem soils. *Plant Mol. Biol.* DOI 10.1007/s11103-007-9215-2.
- Ma, J.F., R. Shen, Z. Zhao, M. Wissuwa, Y. Takeuchi, T. Ebitani, and M. Yano. 2002. Response of rice to Al stress and identification of quantitative trait loci for Al tolerance. *Plant Cell Physiol.* 43(6):652-659.
- Marschner, H. 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Acad Press. San Diego. 889 p.
- Morcuende, R., R. Bari, Y. Gibon, W. Zheng, B.D. Pant, O. Blasing, B. Usadel, T. Czechowski, M.K. Udvardi, M. Stitt, and W.R. Scheible. 2007. Genome-wide reprogramming of metabolism and regulatory networks of *Arabidopsis* in response to phosphorus. *Plant Cell Environ* 30:85-112.
- Prasetyo, B.H. dan D.A. Suriadikarta. 2006. Karakteristik, potensi, dan teknologi pengelolaan tanah Ultisol untuk pengembangan pertanian lahan kering di Indonesia. *J. Litbang Pertanian* 25(2):40-46.
- Prasetyono, J. 2010. Studi efek introgresi *Pup1* (*P uptake 1*) untuk meningkatkan toleransi padi terhadap defisiensi fosfor. Disertasi. Institut Pertanian Bogor. 185 hlm.

- Prasetyono, J., H. Aswidinnoor, S. Moeljopawiro, D. Sopandie, dan M. Bustamam. 2008. Identifikasi marka polimorfik untuk pemuliaan padi toleran defisiensi fosfor. *J. AgroBiogen* 4(2):51-58.
- Rausch, C. and M. Bucher. 2002. Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta* 216:23-37.
- Smith, F.W. 2002. The *phosphate uptake* mechanism. *Plant Soil* 245:105-114.
- Untung, K., H. Lanya, dan Y. Rusyadi. 1991. Permasalahan lapangan tentang padi di daerah tropika. (Judul asli: Field Problem. Ditulis oleh K.E. Mueller). Lembaga Penelitian Padi Internasional. 173 hlm.
- Vance, C., C. Uhde-Stone, and D.I. Allan. 2002. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist* 157:423-447.
- Wissuwa, M. and N. Ae. 2000. Genotypic variation for tolerance to phosphorus deficiency in rice and the potential for its exploitation in rice improvement. *Plant Breed.* 120:43-48.
- Wissuwa, M. and N. Ae. 2001. Further characterization of two QTLs that increase *phosphorus uptake* of rice (*Oryza sativa* L.) under phosphorus deficiency. *Plant Soil* 237:275-286.
- Wissuwa, M., M. Yano, and N. Ae. 1998. Mapping of QTLs for phosphorus-deficiency tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) *Theor. Appl. Genet.* 97:777-783.
- Wissuwa, M., J.N. Wegner, N. Ae, and M. Yano. 2002. Substitution mapping of *Pup1*: A major QTL increasing *phosphorus uptake* of rice from a phosphorus-deficient soil. *Theor. Appl. Genet* 105:890-897.
- Yi, K., Z. Wu, J. Zhou, L. Du, L. Guo, Y. Wu, and P. Wu. 2005. *OsPTF1*, a novel transcription factor involved in tolerance to phosphate-starvation in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Physiol.* 138:2087-2096.
-