

**POTENSI POPULASI INFUSI GENETIK UNTUK MEMPERLUAS VARIASI
GENETIK KEBUN BENIH SEMAI *Pinus merkusii* DI JEMBER**

*A potency of genetic infusion populations to broaden genetic variation in the seedling
seed orchard of *Pinus merkusii* in Jember*

I.L.G. Nurtjahjaningsih

Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan

Jl. Palagan Tentara Pelajar Km. 15, Purwobinangun, Pakem, Sleman, Yogyakarta 55582

Telp. (0274) 895954, 896080, Fax. (0274) 896080

ABSTRACT

*When genetic base in a seed orchard is narrow, a strategy of genetic infusion should be applied to broaden and maintain its genetic variation over several successive generations. For this purpose, genetic-infusion populations were established in tree improvement programs of *Pinus merkusii* located in Jember. To be successful genetic variation of the infusion populations should be assessed. This study was aimed to determine genetic diversity of three infusion populations of *P. merkusii* i.e. Takengon, Janto and Blankejeren population using five microsatellite markers. The results showed that gene diversity of plus trees in the seed orchard was at a moderate level ($H_E=0.508$). Significant inbreeding deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was detected ($F_{IS}=0.073$). Gene diversity of the infusion populations was comparatively high. It ranged between 0.498 (Janto) and 0.524 (Blankejeren). The F_{IS} was low and insignificant deviation from HWE at any genetic infusion populations. The genetic differentiation among the populations (in both seed orchard and genetic infusion) was very low ($F_{ST}=0.003$) indicating that they were genetically related. It is recommended that the infusion populations have a potential to maintain the genetic diversity in the seed orchard. However, since they are related, it is necessary to find other potential genetic infusion populations that could broaden genetic diversity more effectively in the seed orchard.*

Key Words : ****Pinus merkusii*, genetic infusion, seed orchard, microsatellite***

ABSTRAK

Ketika keragaman genetik di kebun benih sempit, strategi infusi genetik harus diaplikasikan untuk memperluas dan menjaga variasi genetik pada beberapa generasi berikutnya. Untuk tujuan ini, populasi infusi-genetik dibangun di dalam program pemuliaan pohon *Pinus merkusii* di Jember. Agar upaya perluasan variasi genetik ini berhasil, potensi parameter keragaman genetik dari populasi infusi-genetik harus diketahui. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui keragaman genetik dari tiga populasi infuse-genetik *P. merkusii* (populasi Takengon, Janto dan Blankejeren) menggunakan 5 penanda mikrosatelit. Hasil penelitian menunjukkan keragaman genetik pohon di kebun benih ada pada level yang sedang ($H_E = 0,508$). Nilai silangdalam (*inbreeding*) menunjukkan secara nyata menyimpang dari hukum Hardy-Weinberg (HWE) ($F_{IS} = 0,073$). Keragaman genetik populasi infuse-genetik tinggi, berkisar antara 0,498 (Janto) dan 0,524 (Blankejeren). Selain itu, nilai F_{IS} rendah dan tidak signifikan. Perbedaan genetik antar populasi (baik kebun benih maupun infusi genetik) sangat rendah ($F_{ST} = 0,003$) menunjukkan populasi-populasi ini secara genetik berkerabat. Sehingga direkomendasikan bahwa populasi infusi genetik mempunyai potensi untuk menjaga keragaman genetik di kebun benih. Namun, karena populasi-populasi ini berkerabat, diperlukan mencari populasi lain yang dapat lebih memperluas keragaman genetik populasi kebun benih.

Kata Kunci : *Pinus merkusii*, infusi genetik, kebun benih, mikrosatelit

I. PENDAHULUAN

Kebun benih merupakan pertanaman yang dibangun untuk menghasilkan benih bermutu dengan kuantitas yang cukup. Sebuah populasi pohon, termasuk kebun benih, yang mempunyai keragaman genetik yang cukup akan lebih produktif, dan sehat karena lebih mampu beradaptasi dengan perubahan lingkungan atau resisten terhadap penyakit (Rajora *et al.*, 2000). Dengan demikian keragaman genetik merupakan komponen yang penting untuk kelestarian suatu populasi. Namun demikian seleksi pohon secara intensif yang dilakukan di kebun benih berpengaruh nyata terhadap keragaman genetik,

yakni dapat menyebabkan menurunnya keragaman genetik, bahkan meningkatkan kedekatan genetik antar tetuanya (Gomory, 1992; Rajora, 1999). Untuk memperluas basis genetik di populasi pemuliaan, strategi populasi infusi genetik harus diterapkan (Zobel dan Talbert, 1991).

Program pemuliaan *Pinus merkusii* di Indonesia dimulai pada akhir tahun 1970-an dengan membangun uji keturunan yang melibatkan 1.000 pohon plus yang diseleksi dari pertanaman *P. merkusii* di Jawa. Program pemuliaan ini dilaksanakan atas kerja sama antara Fakultas Kehutanan Universitas Gadjah Mada, Direktorat

Reboisasi dan Rehabilitasi (DITSI) dan Perum Perhutani. Melalui seleksi yang intensif, pada akhir seleksi terdapat 600 pohon induk (famili), yang kemudian dikonversi menjadi kebun benih semai dan digunakan sebagai sumber benih *P. merkusii* untuk tujuan reboisasi dan penanaman komersial. Berdasarkan penanda mikrosatelit, keragaman genetik kebun benih tersebut tergolong dalam level yang sedang ($H_E=0,500$), akan tetapi mempunyai kedekatan genetik yang tinggi antar famili (perbedaan genetik (F_{ST}) = 0,008) (Nurtjahjaningsih *et al.*, 2007). Hal ini disebabkan di samping karena seleksi pohon induk secara intensif (Soeseno, 1988; Rajora, 1999), juga karena adanya indikasi bahwa pertanaman *P. merkusii* di Jawa hanya berasal dari satu sub-populasi di Aceh (Siregar dan Hattermer, 2004). Untuk mengatasi kemungkinan menurunnya keragaman genetik dan meningkatnya kedekatan secara genetik, diperlukan adanya infusi genetik dari populasi alamnya atau populasi yang mempunyai ukuran yang luas (Soeseno, 1988; Rajora, 1999). Untuk tujuan memperluas variasi genetik di kebun benih, populasi infusi-genetik telah dibangun di dekat lokasi kebun benih *P. merkusii* di Jember. Asal bibit populasi-populasi tersebut berasal dari beberapa sebaran alam *P. merkusii* di Aceh, Sumatera. Koleksi benih dan pemapanan populasi infusi ini dilakukan oleh Fakultas Kehutanan UGM bekerjasama dengan Perum Pehutani.

Pada umumnya, keragaman genetik di populasi alam menunjukkan level yang lebih tinggi dibandingkan dengan populasi hutan tanaman, termasuk kebun benih (Rajora, 1999). Hal ini disebabkan populasi alam bisa menjaga ukuran populasi *breeding* yang luas, sehingga

bisa mempertahankan sistem perkawinan silang-luar (*outcrossing*) (Gomory, 1992). Namun, praktik manajemen hutan berdasarkan tebang pilih atau tebang habis menyebabkan deforestasi dan habitat terfragmentasi, yang selanjutnya menyebabkan degradasi luasan populasi pemuliaan (Rajora *et al.*, 2000). Beberapa studi melaporkan bahwa keragaman genetik yang tinggi tidak selalu diperoleh dari hutan alam (Hall *et al.*, 1994). Oleh karena itu, pendekatan analisis DNA perlu dilakukan untuk memastikan bahwa populasi infusi genetik mempunyai potensi untuk memperluas variasi genetik di populasi pemuliaan.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui parameter keragaman genetik populasi infusi genetik dan kedekatan genetik dengan populasi pohon di kebun benih *P. merkusii* di Jember. Diharapkan informasi ini dapat membantu meningkatkan manajemen kebun benih dalam rangka memperluas variasi genetiknya.

II. BAHAN DAN METODE

A. Deskripsi plot pengamatan

Populasi infusi genetik dibangun pada tahun 1997 dan berlokasi tidak jauh dari kebun benih *P. merkusii* di Jember, Jawa Timur, terletak 600 m di atas permukaan laut (113° 52' U, 7° 67'S). Material tanaman adalah benih yang berasal dari sebaran alam *P. merkusii* yang terdiri dari 67 famili dari Takengon (Gambar 1), 41 famili dari Janto dan 386 famili dari Blangkejeren. Famili-famili ini telah digunakan sebagai bahan tanaman untuk memperluas variasi genetik pada generasi kedua *P. merkusii*.



Gambar 1. Salah satu populasi infusi-genetik dari sub-populasi Takengon

B. Pengumpulan bahan tanaman untuk materi DNA

Untuk populasi infusi genetik, 24 sampel daun dikoleksi secara random dari populasi Takengon, Janto dan Blangkejeren pada bulan Agustus 2003. Untuk populasi pohon plus kebun benih, sejumlah 644 sampel daun dikoleksi dari kebun benih generasi pertama yang telah mengalami seleksi akhir. Sampel-sampel tersebut dimasukkan ke dalam plastik vinil berukuran kecil dan berklip. Kemudian dikeringkan dalam *silica gel* dan disimpan pada suhu ruang sampai dilakukan ekstraksi DNA.

C. Ekstraksi DNA dan analisis mikrosatelit

Analisis genetik dilakukan di *Laboratory of Forest Ecosystem, Department of Ecosystem Studies, The University of Tokyo, Jepang*. DNA diekstraksi menggunakan metode modifikasi cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) (Zhou *et al.*, 1999). Penelitian ini menggunakan 5 penanda mikrosatelit untuk *P. merkusii*, karakteristik kelima penanda tersebut telah digambarkan dalam Nurtjahjaningsih *et al.* (2005). Amplifikasi PCR menggunakan PCR *thermal cycler* (Takara) dan *Gene amp PCR system 9700*

(*Applied Biosystems*), dalam campuran reaksi (5 μ L) mengandung 5 ng template DNA; 0,2 μ M masing-masing pasangan primer dan 1 x PCR *Master Mix (Qiagen Multiplex)* dengan konsentrasi akhir 3 mM $MgCl_2$. Kondisi PCR meliputi; 15 menit pada suhu 95°C diikuti dengan 30 *cycle* selama 30 detik pada suhu 94°C, 1 menit 30 detik pada masing-masing spesifik suhu *annealing*, 1 menit pada suhu 72°C dan sebuah *step* akhir pemanjangan 30 menit pada suhu 60°C. Amplifikasi fragmen hasil PCR dideteksi dan diurutkan menggunakan ABI 3100 genetik analyzer (*Applied Biosystems*). Amplifikasi fragmen dianalisis menggunakan *gene mapper (Applied Biosystems)*.

D. Analisis statistik

Masing-masing populasi dievaluasi berdasarkan frekuensi alel, kemudian dirangkum dalam parameter keragaman genetik seperti jumlah alel yang terdeteksi (N_A = *number of allele*), alel yang muncul dengan frekuensi 0,05% (R_A = *rare allele*), alel yang terdeteksi hanya pada satu populasi (P_A = *private allele*), keragaman alel (A_{48} = *allelic diversity*; El Mousadik dan Petit, 1996), heterozigositas

harapan ($H_E = \text{expected heterozygosity}$; Nei, 1987), tingkat silang dalam ($F_{IS} = \text{coefficient inbreeding}$). Keragaman alel adalah sebuah parameter yang menunjukkan keragaman alel pada sebuah lokus untuk ukuran sampel yang ditetapkan (El Mousadik dan Petit, 1996). Dalam hal ini keragaman alel ditetapkan pada jumlah sampel $N=24$ ($2n=48$). Secara signifikan menyimpang dari ekuilibrium Hardy-Weinberg (HWE), seperti dibuktikan oleh penyimpangan F_{IS} dari nol, diuji dengan randomisasi.

Perbedaan genetik antara populasi pohon plus dan masing-masing populasi infusi genetik dievaluasi menggunakan nilai F_{ST} (Weir dan Cockerham, 1984), dan signifikansi diuji dengan 1000 permutasi *bootstrap*. Signifikansi perbedaan pada setiap lokus diuji dengan uji nyata *log-*

likelihood (G) (Goudet *et al.*, 1996). Nilai pasangan F_{ST} dihitung dan signifikan diuji dengan randomisasi genotip multilokus antara dua populasi dengan koreksi *Bonferroni standard*.

Parameter keragaman genetik dan perbedaan genetik dihitung menggunakan *FSTAT software versi 2.9.3.2* (Goudet, 2001).

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. HASIL

Frekuensi alel

Tabel 1 menunjukkan frekuensi alel masing-masing populasi pada setiap lokus. Distribusi frekuensi alel tiap alel menyebar hampir sama besar di masing-masing populasi. Ada beberapa

Tabel 1. Frekuensi alel tiga populasi infusi-genetik dan populasi pohon plus di kebun benih

Populasi N		Kebun Benih 644	Takengon 24	Janto 24	Blankejeren 24
Lokus	Allele				
pm01	1	0,078	0,063	0,042	0,125
	2	0,684	0,625	0,542	0,542
	3	0,236	0,313	0,396	0,333
	4	0,002	0,000	0,021	0,000
pm05	1	0,122	0,146	0,146	0,167
	2	0,815	0,792	0,854	0,771
	3	0,061	0,063	0,000	0,063
	4	0,002	0,000	0,000	0,000
pm07	1	0,031	0,021	0,021	0,021
	2	0,005	0,000	0,000	0,000
	3	0,499	0,521	0,521	0,563
	4	0,328	0,396	0,375	0,396
	5	0,137	0,063	0,083	0,021
pm09a	1	0,002	0,000	0,000	0,000
	2	0,003	0,000	0,000	0,000
	3	0,010	0,000	0,000	0,000
	4	0,014	0,063	0,042	0,000
	5	0,213	0,292	0,104	0,146
	6	0,494	0,479	0,542	0,417
	7	0,239	0,167	0,313	0,438
	8	0,025	0,000	0,000	0,000
pm12	1	0,383	0,396	0,375	0,396
	2	0,002	0,000	0,000	0,000
	3	0,616	0,604	0,625	0,604

alel langka (frekuensi $< 0,05\%$) dan alel privat (alel yang hanya ditemukan di satu populasi) di populasi kebun benih, namun tidak ditemukan di populasi infusi genetik.

Parameter keragaman genetik

Tabel 2 menunjukkan parameter keragaman genetik tiga populasi infusi genetik dan kebun benih. Jumlah alel yang terdeteksi (N_A) pada populasi kebun benih adalah 24, sedangkan pada populasi infusi genetik berkisar antara 15-16. Keragaman alel (A_{24}) masing-masing populasi pun hampir sama yaitu berkisar 3,00 - 3,40. Meskipun sampel yang digunakan untuk analisis keragaman pada populasi kebun benih lebih besar dibandingkan dengan ketiga populasi infusi genetik (644 vs. 24), namun nilai keragaman genetik (H_E) populasi kebun benih (0,508) hampir sama dengan nilai populasi infusi genetik (0,498 - 0,524). Akan tetapi, populasi kebun benih mempunyai nilai koefisien silang dalam (F_{IS}) yang cukup tinggi dan nilainya signifikan (0,073), sedangkan populasi infusi genetik

mempunyai nilai F_{IS} yang kecil dan nilainya tidak signifikan (negatif).

Perbedaan genetik

Tabel 3 menunjukkan hubungan secara genetik antara populasi kebun benih dan populasi infusi genetik. Nilai F_{ST} antar populasi pada umumnya sangat kecil, bahkan ada yang nilainya negatif. Nilai F_{ST} rata-rata populasi sangat kecil (rata-rata $F_{ST} = 0,003$). Karena nilainya sangat kecil, sehingga perbedaan nilai genetik antar populasi tidak signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa hubungan kekerabatan antar populasi-populasi tersebut sangat tinggi.

B. PEMBAHASAN

Parameter keragaman genetik

Penelitian ini merupakan analisis yang pertama terhadap keragaman genetik dan perbedaan genetik pada populasi infusi genetik menggunakan penanda mikrosatelit. Keragaman genetik di dalam populasi infusi genetik menunjukkan level yang hampir sama dan tergolong dalam level

Tabel 2. Parameter keragaman genetik populasi infusi-genetik dan populasi kebun benih dideteksi menggunakan 5 penanda mikrosatelit

Populasi	N	N_A	A_{24}	H_E	F_{IS}
Takengon	24	16	3,20	0,521	-0,071
Janto	24	16	3,20	0,498	-0,105
Blankejeren	24	15	3,00	0,524	-0,097
Kebun Benih	644	24	3,40	0,508	0,073*

Tabel 3. Perbedaan genetik (F_{ST}) antara populasi infusi-genetik dan populasi kebun benih. Di atas diagonal adalah nilai F_{ST} , sedangkan di bawah diagonal adalah level signifikansi antar populasi.

Populasi	Kebun Benih	Takengon	Janto	Blankejeren
Kebun Benih	0	-0,0044	0,0043	0,0099
Takengon	ns	0	-0,0023	0,0035
Janto	ns	ns	0	0,0062
Blankejeren	ns	ns	ns	0

yang sedang ($H_E=0,498 - 0,524$). Menggunakan analisis isozim, Kartikawati (1998) melaporkan bahwa variasi genetik 5 sub-populasi di Propinsi Aceh mempunyai level yang hampir sama dengan yang diamati di studi ini ($H_E = 0,304$). Meskipun penanda SSR dengan analisis isozim tidak dapat dibandingkan, akan tetapi hal ini menunjukkan tren keragaman genetik *P. merkusii* di Aceh. Berbeda dengan sebaran hutan *P. merkusii* di Thailand, berdasarkan analisis isozim, Changtragoon dan Finkeldey (1995) melaporkan bahwa nilai variasi genetiknya sangat rendah ($H_E = 0,058$). Hal ini karena luasan populasi *breeding* yang sempit sehingga menyebabkan penyimpangan genetik misalnya tingginya tingkat silang sendiri (*selfing*).

Menurut Cooling (1968) hutan *P. merkusii* di Aceh merupakan kawasan sebaran alam yang paling luas dan menyambung antar sub-populasi yang satu dengan yang lain, dibandingkan dengan sebaran alam di daerah lain seperti Gunung Kerinci dan Tapanuli yang cenderung terfragmentasi. Dengan demikian sangat mungkin apabila hutan *P. merkusii* di Aceh mempunyai kekerabatan yang dekat antar sub populasi ($F_{ST} = 0,003$ pada studi ini, $D_A = 0,006$ (Kartikawati, 1998). Sedangkan hutan *P. merkusii* di Thailand mempunyai kekerabatan yang rendah ($F_{ST} = 0,104$) karena populasinya terfragmentasi (Changtragoon dan Finkeldey, 1995).

Potensi populasi infusi genetik

Untuk menjaga keragaman genetik di kebun benih tetap tinggi, maka diperlukan penambahan material genetik dari populasi-populasi di sebaran alamnya (Zobel dan Talbert, 1991; Rajora, 1999). Namun demikian, materi genetik

yang digunakan harus berasal dari populasi *breeding* yang luas sehingga mempunyai keragaman genetik yang cukup atau tingkat silang sendiri (*selfing*) tidak nyata (Rajora, 1999).

Menggunakan analisis penanda mikrosatelit (SSR), tiga populasi (Takengon, Janto, Blangkejeren) mempunyai tingkat keragaman genetik yang hampir sama dengan populasi kebun benih. Selain itu, nilai silang-dalam ketiga populasi rendah dan tidak signifikan dibandingkan dengan nilai silang-dalam di populasi kebun benih. Cooling (1968) melaporkan bahwa hutan *P. merkusii* terluas adalah di Propinsi Aceh dan merupakan populasi terbesar (± 200.000 ha) dibandingkan dengan Tapanuli dan Kerinci, yang keduanya merupakan populasi terfragmentasi. Sehingga bisa diduga bahwa aliran gen (*gene flow*) di hutan *P. merkusii* Aceh sangat tinggi. Seperti yang dilaporkan oleh Aldrich dan Hamrich (1998) bahwa aliran gen yang terjadi di hutan yang menyambung (*continuous forest*) lebih tinggi dibandingkan dengan hutan yang terfragmentasi atau terisolasi. Berdasarkan hasil yang diperoleh pada penelitian ini, dikomendasikan bahwa tiga sub-populasi infusi genetik yang diuji mempunyai potensi untuk memperluas basis genetik di kebun benih *P. merkusii*.

Namun demikian, perlu disampaikan bahwa hubungan kekerabatan antara ketiga populasi infusi genetik dan populasi kebun benih sangat tinggi ($F_{ST} = 0,003$). Seperti telah disampaikan di muka bahwa pohon plus yang dikoleksi untuk pembangunan kebun benih berasal dari hutan tanaman *P. merkusii* di Jawa, sedangkan hutan tanaman ini pada awalnya dikembangkan menggunakan benih yang berasal dari sub-

populasi di hutan alam Aceh (Siregar dan Hattermer, 2004), sehingga sangat beralasan adanya kekerabatan yang tinggi di antara populasi pohon induk di kebun benih dengan populasi infusi genetik.

IV. KESIMPULAN

Keragaman genetik yang tinggi dan nilai silang-dalam yang rendah dari tiga populasi infusi genetik memungkinkan populasi-populasi ini digunakan untuk memperluas variasi yang ada di kebun benih *P. merkusii*. Namun demikian, kekerabatan yang tinggi di antara populasi infusi genetik dan kebun benih mengindisikasikan perlunya penambahan variasi genetik dari populasi lain.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih yang sedalam-dalamnya kepada Fakultas Kehutanan UGM dan Perum Perhutani yang telah memulai program pemuliaan *Pinus merkusii* di Indonesia dan berkat ijin dari kedua lembaga ini penulis dapat melakukan penelitian di kebun benih *P. merkusii* di Jember. Penulis juga menyampaikan terima kasih kepada Prof. Yuji Ide atas saran dan dukungan yang tidak ternilai. Demikian pula kepada Prof. Moh. Na'iem, Dekan Fakultas Kehutanan Universitas Gadjah Mada, Bapak Sadardjo, M.Sc. dan Bapak Suka Harja dari Perhutani, atas ijin dan bantuannya selama penelitian penulis mengucapkan banyak terima kasih.

DAFTAR PUSTAKA

- Aldrich, P.R., Glaubitz, J.C., Parker, G.R., Rhodes JR, O.E., and Michler, C.H. (2005). Genetic structure inside a declining red oak community in old-growth forest. *Journal of Heredity* **96** (6): 627-634
- Aldrich, P.R. and Hamrick, J.L. (1998). Reproductive dominance of pasture trees in a fragmented tropical forest mosaic. *Science* **281**: 103-105
- Chantragoon, S. and Finkeldey, R. (1995). Pattern of genetic variation and characterization of the mating system of *Pinus merkusii* in Thailand. *Forest Genetics*, **2**(2), 87-97.
- Cooling, E.N. (1968). Fast growing timber tree of the lowland tropics. No.4. CFI. *Pinus merkusii* Commonwealth Forestry Institute. Department of Forestry, University of Oxford. 169p.
- El Mousadik, A. Petit, R.J. (1996) High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree (*Argania spinosa* (L.) Skeels) endemic to Morocco. *Theoretical and Applied Genetics* **92**: 832-839
- Goudet, J. (2001) *FSTAT (version 2.9.3.2): A program to estimate and test gene diversities and fixation indices*. [Www.unil.ch/izea/software/fstat.html](http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html)
- Goudet, J., Raymond, M., de Meeus, T., Rousset, F. (1996) Testing differentiation in diploid populations. *Genetics* **144**: 1933-1940.

- Gomory, D. (1992). Effect of stand origin on the genetic diversity of Norway spruce (*Picea abies* Karst.) populations. *Forest Ecology and Management* **54**: 215-223
- Hall, P., Chase, M.R., Bawa, K.S. (1994). Low genetic variation but high population differentiation in a common tropical forest. *Conservation Biology* **8** (2): 471-482
- Kartikawati, N.K. (1998). Study of genetic variation of tusam (*Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese) natural forest in Aceh and plantation forest in Java using isozyme analysis method. Master Thesis. Gadjah Mada University. 89p.
- Nei, M. (1987) Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press. New York 512pp.
- Nurtjahjaningsih, I.L.G., Saito, Y., Lian, C.L., Tsuda, Y., Ide, Y. (2005) Development and characteristics of microsatellite markers in *Pinus merkusii*. *Molecular Ecology Notes* **5**: 552-553.
- Nurtjahjaningsih, I.L.G., Saito, Y., Tsuda, Y. and Ide, Y. (2007) Genetic diversity of parental dan offspring populations in a *Pinus merkusii* seedling seed orchard detected by microsatellite markers. *Bulletin of the Tokyo University Forest, the Tokyo University Forests* **118**: 1-14
- Rajora, O.P. (1999). Genetic biodiversity impacts of silvicultural practices and phenotypic selection in white spruce. *Theor Appl Genet* **99**: 954-961
- Rajora, O.P. Rahman, M.H. Buchert, G.P. and Dancik, B.P. (2000). Microsatellite DNA analysis of genetic effects of harvesting in old-growth eastern white pine (*Pinus strobus*) in Ontario, Canada. *Molecular Ecology* **9**: 339-348
- Siregar, I.Z. and Hattermer, H.H. (2004). Patterns of genetic structure and variation of Merkus pine (*Pinus merkusii*) in Indonesia. *Journal of Tropical Forest Science*, **16** (2), 160-172.
- Soeseno, Oemi Hani'in. (1988). Genetic variation and improvement of *Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese. Dissertation. Gadjah Mada University. 266p.
- Weir, B.S. and Cockerham, C.C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**(6), 1358-1370.
- Zobel, B. and Talbert, J. (1991). Applied forest tree improvement. Waveland Press, Inc. U.S.A. 505p.
- Zhou Z., Miwa M., Hogetsu T (1999) Analysis of genetic structure of *Suillus grevillei* population in a *Larix kaempferi* stand by polymorphism of inter-simple sequence repeat (ISSR). *New Phytologist* **144**: 55-63.