

Pengelompokan Biotipe Wereng Cokelat Berdasarkan Hasil PCR-RAPD

Clustering of Brown Planthopper Biotype Based on RAPD-PCR

BAHAGIAWATI*, HABIB RIJZAANI

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian,
Jalan Tentara Pelajar No. 3A, Bogor 16114

Diterima 16 Juni 2003/Disetujui 31 Januari 2005

Random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was used to differentiate two brown planthopper biotypes, that were multiplied in the greenhouse. Ten selected random decamer RAPD primers produced unique DNA band patterns for each individual brown planthopper. However, no single primer produced DNA band that could differentiate the two brown planthopper biotype populations. Nonetheless, analysis of the DNA band patterns was able to cluster the majority of the individual samples according to their respective biotypes. Molecular data analysis also indicated greater genetic variation within biotype population than among biotypes.

PENDAHULUAN

Nilaparvata lugens atau wereng cokelat merupakan hama utama padi di Indonesia. Hama ini merusak padi secara langsung dengan menghisap cairan dari batang hingga tanaman kering dan mati. Secara tidak langsung wereng cokelat menjadi vektor bagi penyebaran penyakit kerdil rumput dan kerdil hampa yang disebabkan oleh virus.

Para peneliti mengelompokkan wereng cokelat dalam beberapa biotipe berdasarkan virulensi pada varietas-varietas padi pembeda atau biasa disebut dengan *differential varieties* (Panda & Khush 1995). Varietas pembeda adalah satu set varietas-varietas padi yang telah diketahui gen ketahanannya seperti berikut: Pelita I/1 atau Taichung Native-1 (tidak mempunyai gen tahan wereng cokelat), IR26 atau Mudgo (mempunyai gen tahan Bph1; *brown planthopper* (bph)), IR36 atau IR42 (mempunyai gen tahan bph2), Rathu Heenathi (mempunyai gen tahan Bph3), dan Babawee (mempunyai gen tahan bph4) (Mochida 1979). Biotipe 1 adalah populasi wereng cokelat yang hanya dapat hidup pada varietas padi yang tidak mempunyai ketahanan terhadap wereng cokelat, sedangkan biotipe 2 dapat hidup pada varietas padi yang tidak mempunyai ketahanan terhadap wereng cokelat, dan juga pada varietas padi yang mempunyai gen tahan Bph1. Biotipe 3 dapat hidup pada varietas yang tidak mempunyai ketahanan terhadap wereng cokelat, dan pada varietas padi yang mempunyai gen tahan bph2, dan biotipe 4 dapat hidup dan menyerang varietas padi yang tidak mempunyai gen tahan, dan yang mempunyai gen tahan Bph1, bph2, dan Bph3. Ketiga biotipe wereng cokelat tersebut telah ditemui di alam, sedangkan biotipe 4 hanya ada di laboratorium (Mochida 1979). Indonesia telah mengalami beberapa kali serangan wereng cokelat yang berat. Serangan berat wereng cokelat pertama terjadi pada tahun 1973/1974 menyerang varietas padi unggul pertama yaitu PB5 dan PB8. Varietas padi tersebut tidak mempunyai gen tahan

wereng cokelat dan populasi wereng cokelat tersebut dikenal dengan wereng cokelat biotipe 1. Serangan berat berikutnya terjadi pada tahun 1976/1977 yang menyerang ratusan ribu hektar padi IR26, yaitu padi asal *International Rice Research Institute* (IRRI) yang mengandung gen tahan wereng cokelat Bph1. Wereng cokelat yang menyerang IR26 ini disebut dengan wereng cokelat biotipe 2. Untuk menanggulangi wereng cokelat biotipe 2 dilepas IR36 dan IR42 pada 1977, namun pada tahun 1982 IR42 juga diserang berat oleh wereng cokelat yang dikenal dengan biotipe 3 Sumatera Utara.

Sejak tahun 1983/1984 mulai diterapkan pengendalian wereng cokelat terpadu sehingga sejak itu tidak lagi ditemukan serangan wereng cokelat dalam areal yang luas. Sejak 1978 telah dikembangkan teknik untuk mengidentifikasi biotipe wereng cokelat di lapang berdasarkan perbedaan reaksi varietas padi pembeda terhadap suatu populasi wereng cokelat yang didapat dari lapangan. Pembagian wereng cokelat dalam biotipe dapat bermanfaat dalam menjelaskan reaksi fenotipiknya terhadap varietas padi. Tetapi apakah perbedaan ini mempunyai dasar genetika? Pertanyaan ini telah pula menjadi sumber beberapa diskusi mengenai kemungkinan pembagian wereng cokelat sebagai biotipe dalam kategori subspecies. Sampai sekarang biotipe wereng cokelat hanya dibedakan berdasarkan reaksi terhadap varietas diferensial padi. Tidak ada perbedaan wereng dalam morfologi atau karakter biokimia (Sogawa 1982).

Penelitian berdasarkan informasi molekuler terhadap biotipe-biotipe wereng cokelat belum banyak dilakukan. IRRI (1986) mencoba mencari informasi molekuler dengan menganalisa kandungan protein yang dimiliki biotipe-biotipe wereng cokelat. Hasil analisa beberapa isoenzim menunjukkan beberapa perbedaan kecil frekuensi alel isoenzim tersebut antar biotipe.

RAPD adalah teknik sidik jari DNA yang sederhana dan berpotensi dalam menampilkan perbedaan molekuler organisme dalam berbagai tingkatan taksonomi (Welsh & McClelland 1990; Williams *et al.* 1990). Beberapa penelitian telah melaporkan penggunaan teknik ini untuk membedakan

*Penulis untuk korespondensi, Tel. +62-251-316897,
Fax. +62-251-338820, E-mail: bahagiawati@indo.net.id

dua spesies atau bahkan subspecies, selain itu dapat membedakan di tingkat strain atau pathovar yang berbeda; penggunaannya pun amat luas dari tanaman, mamalia, jamur, serangga, hingga bakteri (Hodge *et al.* 1995; Brown *et al.* 1997; Castrillo & Brooks 1998; Loo *et al.* 1999; Martinez & Pastene 1999).

Shufran dan Whalon (1995) menyatakan bahwa berdasarkan hasil PCR-RAPD, biotipe-biotipe wereng cokelat tidak terlalu berbeda. Pada tiga populasi wereng dengan biotipe yang berbeda (biotipe 1, 2, dan 3) tidak diperoleh pola pita DNA atau sidik jari yang dapat membedakan ketiga biotipe. Shufran dan Whalon (1995) menyimpulkan bahwa biotipe tidak dapat dijelaskan secara molekuler melalui PCR-RAPD. Namun bila dilihat kembali hasil analisis tersebut, secara keseluruhan, setiap kelompok biotipe mempunyai pola pita DNA yang mirip dan berbeda dengan kelompok lain.

Walaupun Shufran dan Whalon (1995) memakai lima *primer* terpilih tidak dapat membedakan biotipe wereng cokelat dengan PCR-RAPD; penelitian kami bertujuan untuk mengkonfirmasi hasil penelitian Shufran dan Whalon (1995) dengan memakai *primer* berbeda dan dengan jumlah *primer* yang lebih banyak. Lebih lanjut penelitian ini bertujuan untuk mengelompokkan biotipe wereng cokelat berdasarkan analisis pola pita DNA hasil PCR-RAPD. Secara tidak langsung penelitian ini juga bertujuan untuk mencari *primer* RAPD yang dapat membedakan biotipe-biotipe wereng cokelat.

BAHAN DAN METODE

Wereng Cokelat. Pada penelitian ini digunakan biotipe wereng cokelat yaitu biotipe 1 ialah wereng cokelat yang diperbanyak di varietas padi TN1 (Taichung Native 1, varietas padi yang tidak mempunyai gen ketahanan terhadap wereng cokelat) dan biotipe 2 yaitu wereng cokelat yang diperbanyak di varietas padi IR26 yang mempunyai gen tahan Bph 1. Kedua biotipe wereng cokelat ini diperbanyak di rumah kaca milik Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor.

Primer Oligonukleotida. Penelitian ini menggunakan 20 *decamer primer* oligonukleotida (selanjutnya disebut *primer*) yang berasal dari *Integrated DNA Technology*. Keduapuluh *primer* ini kemudian diseleksi tingkat polimorfismenya. Sepuluh *primer* yang menunjukkan tingkat polimorfisme tinggi dipakai untuk analisis pengelompokan wereng cokelat. Sekuen DNA dari sepuluh *primer* terpilih dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Sepuluh *primer* oligonukleotida yang dipakai dalam PCR-RAPD untuk individu-individu wereng cokelat

Kode	Sekuen (5'-3')	% GC	Total pita RAPD	% pita polimorfik
IDT31	TGCGGGTCCT	70	6	100
IDT32	CACAGCTGCC	70	7	86
IDT36	CCATTCCCCA	60	6	100
IDT40	GGACAACGAG	60	6	100
IDT41	CTCTGCGCGT	70	3	100
IDT45	TGGCGCAGTG	70	3	100
IDT46	CCGCTACCGA	70	4	100
IDT47	CCTTCCCTC	60	4	100
IDT48	ACGCCAGAGG	70	7	100
IDT50	GGTCTGCTTG	60	4	100

Ekstraksi DNA. Dua puluh individu dari tiap populasi diambil secara acak dan dibekukan pada -20 °C. Setiap wereng dimasukkan dalam satu tabung mikro 1.5 ml dan ditambahkan 45 µl bufer homogenisasi yang mengandung: NaCl 0.5 M, sucrose 0.2 M, EDTA 0.05 M pH 8, dan Tris-Cl 0.1 M pH 8. Dengan penumbuk mini, wereng digerus dengan cepat hingga halus. Bufer pemecah sel (EDTA 0.25 M, Tris-Cl 0.5 M pH 8, and SDS 6.25% b/v) sebanyak 5 µl kemudian ditambahkan dan larutan diaduk dengan menggosok secara perlahan. Kemudian tabung ditutup dan dipanaskan dalam pemanas air bersuhu 65 °C selama 30 menit. Setelah inkubasi selesai, 7 µl 8 M kalium asetat ditambahkan dan dicampur secara perlahan. Larutan kemudian didinginkan selama setengah jam dalam es. Sisa-sisa gerusan kemudian diendapkan dengan sentrifusa pada kecepatan 10 000 g selama 15 menit. Supernatan dipindahkan ke tabung 1.5 ml baru sebanyak 40 µl. Alkohol 96% yang telah didinginkan pada -20 °C selama minimal satu malam kemudian ditambahkan sebanyak 80 µl. Setelah dicampur dengan membolak-balikkan tabung secara perlahan, larutan dibiarkan selama 5-10 menit dalam suhu kamar. DNA kemudian diendapkan dengan sentrifusa berkecepatan 10 000 g selama 15 menit. Supernatan dibuang dan pelet dicuci dengan alkohol 70% dua kali. Setelah dikeringkan dari sisa alkohol dengan membiarkannya di udara terbuka selama beberapa menit, DNA dilarutkan dalam 50 µl bufer TE pH 8.0 (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM) dan disimpan pada -20 °C.

Kualitas dan konsentrasi DNA yang terekstraksi diukur dengan spektrofotometer (U-2000 Spectrophotometer, Hitachi). DNA dengan perbandingan $A_{260}:A_{280}$ sekitar 1.8 atau lebih dipakai pada reaksi PCR selanjutnya. Konsentrasi DNA dihitung berdasarkan nilai serapan pada sinar UV berpanjang gelombang 260 nm dengan asumsi satu A_{260} sama dengan 50 µg/µl DNA utas ganda.

Penapisan Primer Oligonukleotida. Tahap ini bertujuan untuk menapis 20 *primer* yang dipakai untuk mendapatkan 10 *primer* yang memberikan persentase polimorfisme yang tinggi. Konsentrasi DNA yang digunakan adalah 10 ng sedangkan *primer* adalah 5 pikomol per 25 µl reaksi. Proses PCR dan visualisasi hasilnya sesuai dengan yang diuraikan di bawah ini. DNA cetakan berasal dari 20 individu wereng cokelat untuk masing-masing biotipe.

PCR-RAPD dan Elektroforesis. Untuk tahap pengelompokan biotipe wereng cokelat berdasarkan karakterasi molekuler, DNA cetakan yang digunakan ialah DNA dari 10 individu masing-masing biotipe. Reaksi RAPD dilakukan pada volume total 25 µl (PTC-100, MJ Research). Konsentrasi komponen PCR adalah: KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, Triton 0.1%, MgCl₂ 2.5 mM, dNTP 0.24 mM, 1 U *Taq* polimerase, 10 ng DNA cetakan, dan 0.2 µM *primer*. Amplifikasi DNA dilakukan pada: 94 °C selama 2 menit untuk denaturasi; 44 putaran 94 °C selama 10 detik, 36 °C selama 10 detik, dan 72 °C selama 2 menit untuk penggandaan; diakhiri dengan pemanjangan akhir pada 72 °C selama 10 menit. Produk PCR disimpan pada -20 °C sampai dianalisa dengan elektroforesis.

Sebanyak 20 µl produk PCR dicampur dengan 2 µl 10X *loading dye* dan dielektroforesis pada 1.4% gel agarosa selama sekitar 75 menit dengan tegangan 90 volt (sekitar 3 volt/cm).

DNA hasil elektroforesis diwarnai dengan etidium bromida. Pita-pita DNA yang dihasilkan dipendarkan dengan ultraviolet dan difoto dengan film Polaroid 667.

Analisa Data untuk Pengelompokan Wereng Cokelat.

Semua analisa didasarkan ada atau tidaknya pita DNA yang teramplifikasi. Intensitas pita DNA tidak terlalu diperhitungkan karena analisa RAPD bersifat kualitatif. Data dari kesepuluh *primer* dijadikan satu dan digunakan sebagai masukan bagi program NTSysPC versi 2.10s untuk mengetahui jarak genetik (*genetic distance*) antar sampel. Algoritma yang dipakai untuk menentukan pengelompokan ini adalah UPGMA dengan *bootstrap* 100 kali. Kemiripan antar sampel ditentukan dengan koefisien Dice. Sebagai alat bantu visualisasi, program FreeTree (Pavlicek *et al.* 1999) digunakan untuk menghasilkan *tree* atau dendogram yang menunjukkan pengelompokan dari seluruh sampel berdasarkan profil RAPD. Variasi genetik dari dua populasi dianalisis dengan program WinAmova. Untuk keperluan ini, kesetimbangan genetik Hardy-Weinberg diasumsikan terjadi dalam populasi wereng cokelat yang dianalisa.

HASIL

Penapisan *Primer*. Dari kedua puluh *primer* yang disaring didapat sepuluh *primer* yang potensial untuk menunjukkan polimorfisme antar biotipe (Tabel 1). Tiga hingga tujuh pita DNA dihasilkan dari setiap reaksi RAPD dengan ukuran sekitar 200 pb hingga 1600 pb. Secara total didapat 50 pita DNA yang dapat diskor untuk analisa profil RAPD (Gambar 1a & 1b).

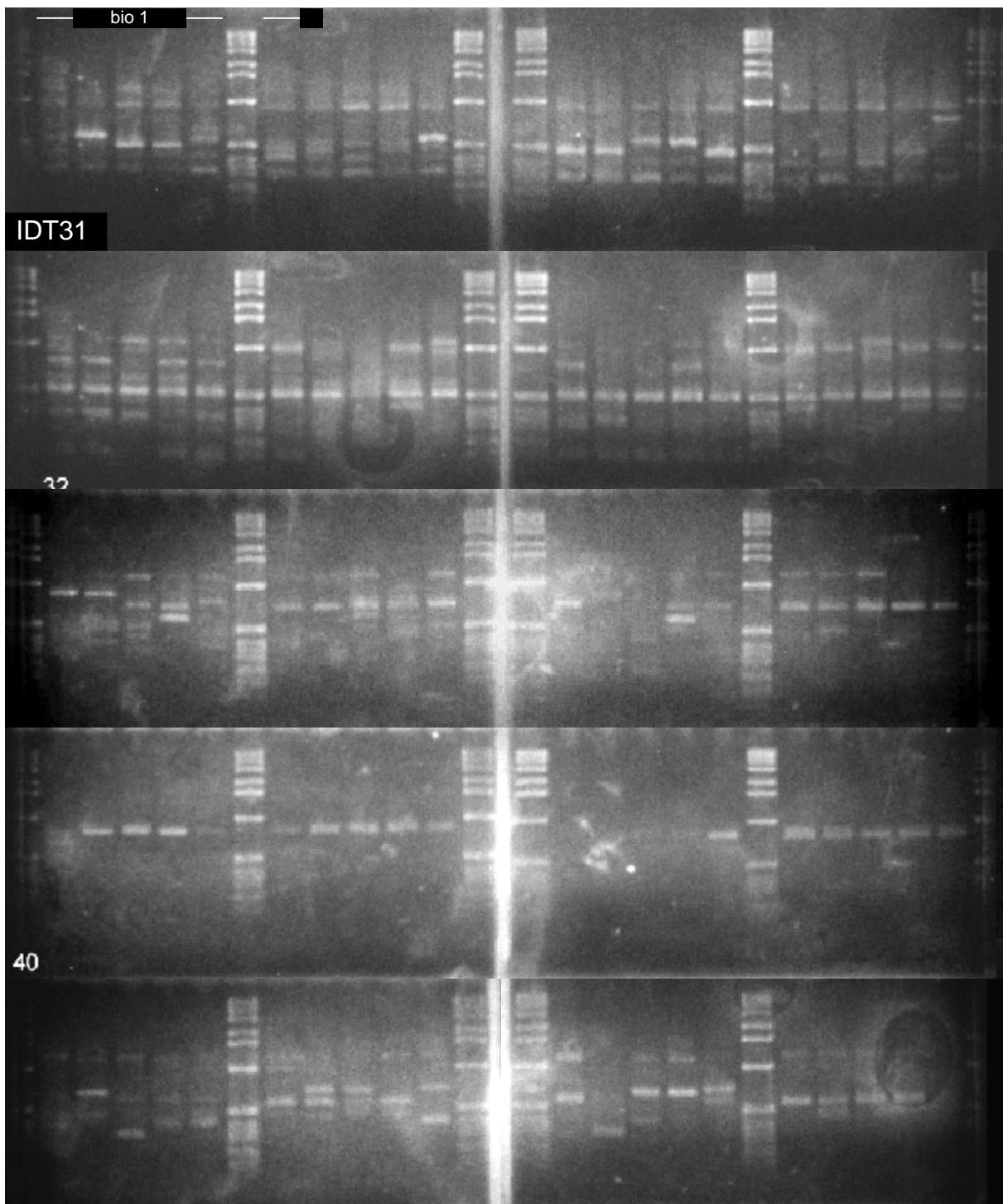
Penelitian ini juga menunjukkan bahwa polimorfisme juga dapat dilihat antar individu dalam satu populasi (biotipe) dan antar populasi (Tabel 2 & 3). Tabel 2 memperlihatkan ukuran pita DNA yang polimorfik dari tiap *primer* yang digunakan pada DNA individu wereng cokelat biotipe 1 dan 2. Tabel 3 memperlihatkan hasil analisa variasi baik di dalam satu populasi maupun antar populasi. Dari Tabel 2 terlihat bahwa ukuran pita DNA polimorfik yang dihasilkan dari setiap *primer* umumnya berbeda. Tabel ini juga menunjukkan bahwa frekuensi kemunculan pita polimorfik itu juga berbeda. Dari kelimpuluh pita DNA yang diskor, hanya ada satu *primer* (IDT32) yang menunjukkan satu pita (250 pb) yang dimiliki oleh semua individu dari kedua populasi. Dengan kata lain, RAPD menggunakan sepuluh *primer* ini menghasilkan 98% pita-pita DNA polimorfik. Tidak ada dua individu yang mempunyai profil RAPD yang sama. Hal ini menunjukkan potensi kemampuan teknik RAPD dalam mendeteksi perbedaan genetik antar individu. Artinya setiap individu mempunyai profil RAPD atau sidik jari yang berbeda berdasarkan *primer* tersebut. Tidak ada pita DNA yang khusus hanya ditemui dalam salah satu populasi. Tabel 3 menyatakan bahwa variasi di dalam satu populasi jauh lebih besar dari antar populasi.

Pengelompokan Wereng Cokelat. Hasil pengelompokan wereng cokelat berdasarkan pola pita DNA dengan analisis UPGMA dapat dilihat pada Gambar 2. Meskipun belum didapat *primer* RAPD yang menghasilkan pita DNA yang dapat membedakan kedua biotipe wereng cokelat, hasil RAPD dalam

penelitian ini mengelompokkan sebagian besar dari individu anggota satu biotipe dalam satu kelompok. Dari *dendogram* yang dihasilkan terlihat bahwa individu-individu biotipe 2 sebagian besar tergabung dalam satu kelompok. Ada dua anggota dari biotipe 2 yang tergabung dalam kelompok biotipe 1. Kelompok biotipe 1 terbagi menjadi 2, dengan satu kelompok beranggota individu biotipe 1 saja dan satu kelompok dengan tambahan individu biotipe 2. Kelompok yang beranggota biotipe 1 saja terlihat mempunyai jarak kesamaan genetik yang relatif lebih jauh antar sesama anggotanya atau dengan kelompok yang lain (Gambar 2).

Tabel 2. Ukuran pita yang dihasilkan tiap *primer* yang dipakai dalam analisa PCR-RAPD dan frekuensi kemunculan pita pada tiap biotipe wereng cokelat

<i>Primer</i>	No. pita	Ukuran (bp)	Frekuensi kemunculan pita pada	
			Biotipe 1 (%)	Biotipe 2 (%)
IDT31	1	1100	50	20
	2	1000	0	60
	3	700	60	0
	4	500	100	90
	5	400	0	40
	6	350	60	0
IDT32	1	950	90	100
	2	700	0	10
	3	600	50	10
	4	500	50	80
	5	400	90	90
	6	250	100	100
	7	1300	40	20
IDT36	1	1200	60	50
	2	800	30	10
	3	700	30	0
	4	650	30	100
	5	550	30	10
	6	500	30	30
IDT40	1	1300	80	70
	2	1000	0	10
	3	700	40	30
	4	600	50	80
	5	400	50	20
	6	300	20	0
IDT41	1	850	10	80
	2	800	70	100
	3	700	10	0
IDT45	1	650	10	40
	2	500	50	60
	3	300	90	60
IDT46	1	1050	10	30
	2	1000	80	60
	3	800	50	0
	4	500	0	50
IDT47	1	1600	10	0
	2	1100	20	60
	3	1000	40	10
	4	800	30	0
IDT48	1	1000	70	60
	2	900	10	10
	3	800	10	0
	4	500	50	70
	5	450	40	40
	6	400	10	0
	7	250	20	0
IDT50	1	1050	0	20
	2	800	0	10
	3	700	90	90
	4	500	0	20

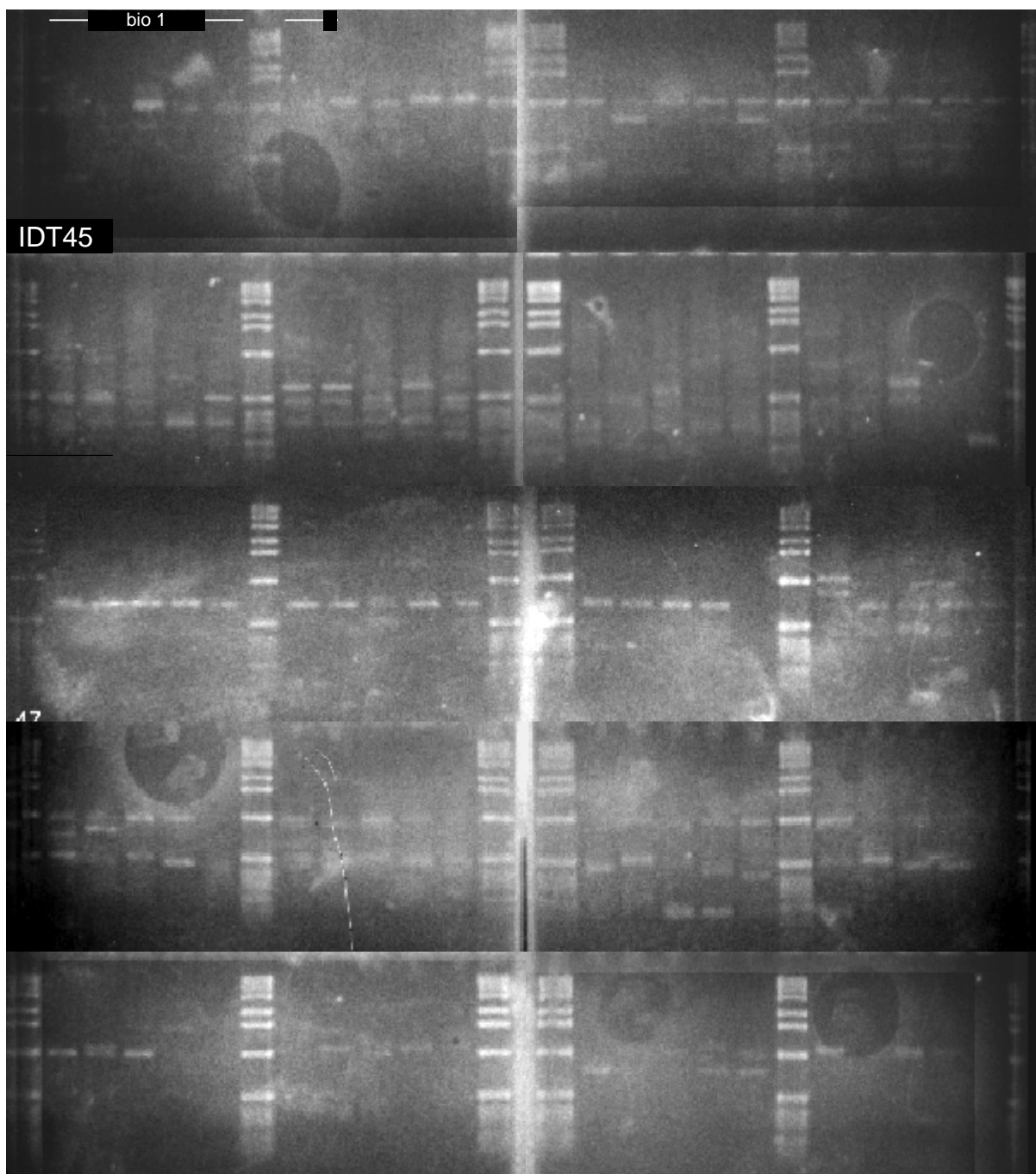


Gambar 1a. Hasil PCR-RAPD dengan *primer* IDT31, 32, 36, 40, dan 41 dengan DNA dari masing-masing individu wereng coklat. Bio 1 ialah biotipe 1 dan bio 2 ialah biotipe 2 wereng coklat. Satuan untuk penanda DNA adalah kilo-basa.

PEMBAHASAN

Penelitian ini tidak menemukan *primer* yang menghasilkan pita DNA yang dapat membedakan biotipe 1 dan biotipe 2 wereng coklat secara nyata. Hal serupa ditemui oleh Shufran dan Whalon (1995) yang belum pula menemukan pita DNA yang dapat membedakan ketiga populasi biotipe wereng coklat.

Roderick (1994) mencatat satu sifat dari wereng coklat yang mungkin menyulitkan pencarian marka RAPD pembeda biotipe. Karakter biotipe suatu wereng coklat sangat mungkin disebabkan oleh interaksi banyak gen. Hal ini sangat jelas terlihat dari kemampuan suatu biotipe untuk beradaptasi dan berubah menjadi biotipe yang lain dalam beberapa generasi (Wilson & Claridge 1985). Meskipun secara fenotipik karakter suatu biotipe dapat jelas dibedakan satu dengan yang lain, secara genetik biotipe-biotipe wereng coklat sulit dibedakan.



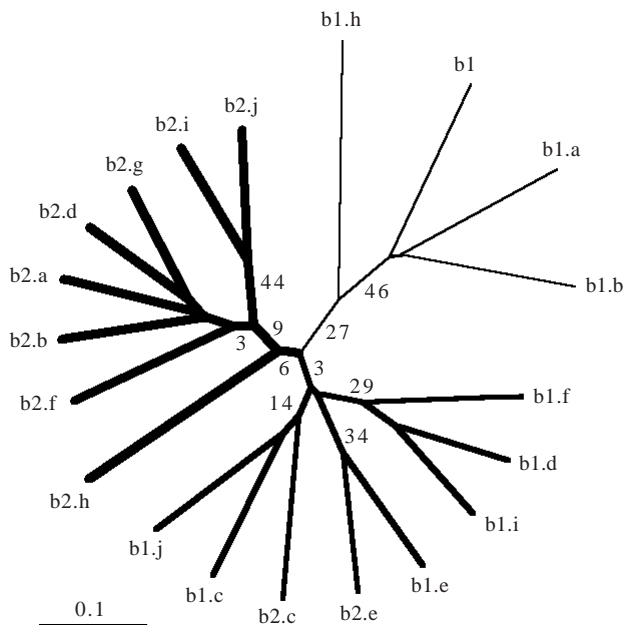
Gambar 1b. Hasil PCR-RAPD dengan *primer* IDT45, 46, 47, 48, dan 50 dengan DNA dari masing-masing individu wereng coklat. Bio 1 ialah biotipe 1 dan bio 2 ialah biotipe 2 wereng coklat. Satuan untuk penanda DNA adalah kilo-basa.

Berdasarkan analisa variasi molekuler (DNA), terlihat bahwa variasi terutama terdeteksi antar individu (79.1%) daripada antar populasi (20.9%) (Tabel 3). Hal ini menunjukkan bahwa variasi dalam satu populasi biotipe cukup tinggi. Jarak genetik dari kedua populasi biotipe hanya sebesar 0.064 (kesamaan sebesar 0.936). Meskipun kecil, jarak ini lebih tinggi dari yang diperkirakan oleh Shufran dan Whalon (1995) sebesar 0.013. Tidak terlihat pula perbedaan besar dalam nilai rata-rata heterozigositas kedua populasi, meskipun nilai yang diperoleh di penelitian ini lebih besar daripada yang diperoleh

Tabel 3. Hasil analisa variasi genetik dari profil PCR-RAPD individu-individu wereng coklat dari dua biotipe

	Populasi	
	Biotipe 1	Biotipe 2
Rata-rata heterozigositas (<i>unbiased</i>)	0.236	0.203
% lokus polimorfik*	78.000	68.000
Variasi antar populasi**	1.828 (20.89%)	
Variasi dalam populasi**	6.922 (79.11%)	
Jarak Genetik (<i>Unbiased</i> , Nei 1978)	0.064	

*kriteria 0.95, **p = 0.001



Gambar 2. Pengelompokan individu-individu wereng cokelat berdasarkan derajat kesamaan profil RAPD. b1: individu-individu biotipe 1 (a-j), b2: individu-individu biotipe 2 (a-j). Nilai bootsrap dari 100 kali bootstrap diberikan pada cabang-cabang utama.

Shufran dan Whalon (1995). Pada Tabel 3 juga terlihat bahwa ada perbedaan yang cukup berarti pada persentase pita DNA polimorfik dari kedua populasi wereng cokelat yaitu sebesar 10%. Perbedaan persentase pita DNA polimorfis dalam jumlah relatif sama juga ditemukan oleh Shufran dan Whalon (1995). Hal ini pula yang menyebabkan pengelompokan yang belum tegas dalam dendrogram (Gambar 2). Beberapa wereng cokelat biotipe 2 pada kelompok biotipe 1 dan sebaliknya sejalan dengan postulat yang dibuat oleh IIRRI (1986) yang mengatakan di dalam satu populasi biotipe tertentu terdapat sebagian kecil individu yang mempunyai karakterisasi virulensi berbeda. Individu-individu tersebut akan menjadi biotipe baru bila lingkungan berubah. IIRRI (1988) juga melihat kecilnya variasi frekuensi beberapa alel isoenzim antar populasi. Variasi alel isoenzim lebih terlihat antar individu anggota satu populasi (IIRRI 1988). Kecilnya variasi isoenzim antar populasi ini pula yang mungkin menyebabkan belum dapat diperolehnya primer RAPD pembeda biotipe.

RAPD dengan sepuluh primer dekamer acak belum menghasilkan pita DNA atau marka RAPD yang dapat membedakan wereng cokelat biotipe 1 dan 2. Meskipun demikian, teknik RAPD yang digunakan dalam penelitian ini mengelompokkan sebagian besar individu-individu wereng cokelat yang dianalisa sesuai dengan biotipe mereka meskipun

tidak secara tegas, dimana hal yang sama juga dikemukakan oleh Shufran dan Whalon (1995).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh dana APBN 2001. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Sutrisno dan Ifa Manzila, dimana masing-masing telah menyumbangkan beberapa primer dan menyiapkan biotipe wereng cokelat yang dipakai dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Brown RJ, Malcolm CA, Mason PL, Nichols RA. 1997. Genetic differentiation between and within strains of the saw-toothed grain beetle, *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silividae) at RAPD loci. *Insect Mol Biol* 6:285-289.
- Castrillo LA, Brooks WM. 1998. Differentiation of *Beauveria bassiana* isolates from the Darkling Beetle, *Alphitobius diaperinus*, using isozyme and RAPD Analyses. *J Invert Pathol* 72:190-196.
- Hodge KT, Sawyer AJ, Humber RA. 1995. PCR-RAPD for identification of *Zoothora radicans* isolates in biological control of potato leafhopper. *J Invert Pathol* 65:1-9.
- [IRRI] International Rice Research Institute. 1986. *IRRI Annual Report*. Manila: IIRRI. hlm 92-98.
- [IRRI] International Rice Research Institute. 1988. *IRRI Annual Report*. Manila: IIRRI. hlm 103-105.
- Loo AHB, Tan HTW, Kumar PP, Saw LG. 1999. Population analysis of *Licuala glabra* Griff. var. *glabra* (Palmae) using RAPD profiling. *Ann Botany* 84:421-427.
- Martinez I, Pastene LA. 1999. RAPD-typing of Central and Eastern North Atlantic and Western North Pacific minke whales, *Balaenoptera acutorostrata*. *ICES J Marine Sci* 56:640-651.
- Mochida O. 1979. Brown planthopper reduced rice production. *Indon Agric Res Dev J* 1 & 2: 2-7.
- Panda N, Khush GS. 1995. *Host plant Resistance to Insects*. Wallingford: CAB International.
- Pavlicek A, Huda S, Flegr J. 1999. FreeTree-Freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the robustness application in the RAPD analysis of the genus *Frenkelia*. *Folia Biologica* 45:97-99.
- Roderick GK. 1994. Genetic of host plant adaptation in delphacid planthoppers. Di dalam: Denno RF, Perfect TJ (ed). *Planthoppers: Their Ecology and Management*. New York: Chapman & Hall. hlm 799.
- Shufran KA, Whalon ME. 1995. Genetic analysis of brown planthopper biotypes using random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (PCR-RAPD). *Insect Sci Applic* 16:27-33.
- Sogawa K. 1982. The rice brown planthopper: feeding physiology and host plant interactions. *Ann Rev Entomol* 27:49-73.
- Welsh J, McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl Acids Res* 18:7213-7218.
- Williams JGK, Kubelik AR, Kivak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl Acids Res* 18:6531-6535.
- Wilson MR, Claridge MF. 1985. The leafhoppers and planthoppers faunas of rice fields. Di dalam: Nanlt LR, Rodriquez JC (ed). *The Leafhoppers and Planthoppers*. New York: John Wiley. hlm 500.