

KARAKTERISASI SIFAT KETAHANAN TERHADAP NAUNGAN PADA KEDELAI DENGAN MARKA RAPD

TITIN HANDAYANI

Staf Peneliti Balai Teknologi Lingkungan BPPT
Gedung 412 PUSPIPTEK Serpong Tangerang Banten

ABSTRACT

A series of experiment of soybean tolerance to shade were conducted in order to attain the following objectives: genotypes evaluation for shade tolerance, appropriate selection method to screen tolerant genotype to shade characterization of molecular markers of shade tolerance by using RAPD marker.

The morphological specific characters which is correlated to shade tolerance is the number of productive branches. The intensity 75% of artificial shading is optimal level for doing selection of soybean genotypes.

Molecular analysis by using RAPD technique showed that UBC153, ROTH 480.01, and ROTH 480.03 primer have polymorphic band that can be used for linkage analysis. All polymorphisms segregated independently of each other. The nearest genetic distance was DNA fragment about 125 bp of UBC 153 marker which is linked to tolerance to shade character by about 0.13 centomorgans.

Key Words: Kedelai, *Glycine max* (L.) Merrill, tolerance, shade, RAPD.

PENDAHULUAN

Kedelai [*Glycine max* (L.) Merrill] merupakan salah satu komoditas penting dalam hal penyediaan pangan, pakan dan bahan-bahan industri, sehingga telah menjadi komoditas utama dalam pembangunan pertanian di Indonesia (Asadi *et al.*, 1997). Produksi kedelai mengalami penurunan terus-menerus, hingga pada tahun 2001 tercatat impor 826,93 juta ton. Kondisi ini mendorong perlunya swasembada kedelai melalui peningkatan produktivitas dan luas tanamnya, yang diantaranya melalui tumpangsari dengan tanaman perkebunan atau Hutan Tanaman Industri. Penggunaan lahan di bawah tegakan akan lebih mengoptimalkan pemanfaatan lahan yang selama ini belum banyak dimanfaatkan. Di Indonesia terdapat tidak kurang dari 11,5 juta ha areal perkebunan, dimana sekitar 3-4% dari luasan ini merupakan areal tanaman baru yang dapat dimanfaatkan untuk menanam tanaman sela sampai tanaman pokoknya (Tanaman Belum Menghasilkan) mencapai umur 2-3 tahun. Kendala utama pada lahan semacam ini ialah rendahnya intensitas cahaya. Oleh karena itu diperlukan upaya untuk memperoleh varietas yang adaptif dan berproduksi tinggi pada kondisi semacam ini. Langkah-langkah yang perlu dilakukan ialah: (a) mencari sumber gen toleran terhadap naungan berat 50%-75%, (b) hibridisasi dengan menggunakan genotipe unggul atau galur-galur yang mempunyai sifat agronomis baik sebagai tetua, yang akan diperbaiki sifat toleransinya terhadap naungan, dan (c) uji daya hasil dan adaptasi pada berbagai lokasi.

Pemuliaan tanaman kedelai untuk seleksi daya toleransi terhadap intensitas cahaya rendah dapat dicapai melalui pengetahuan yang cukup tentang mekanisme fisiologi, karakter morfologi, anatomi dan kontrol genetik daya adaptasi tersebut. Setiap metode mempunyai keunggulan dan kelemahan. Karakterisasi morfologi adalah praktis, cepat dan murah, pengamatan dapat secara visual dan bersifat kuantitatif. Namun dapat ditemui kesulitan karena karakter ini dipengaruhi oleh kondisi lingkungan. Kemajuan dalam bidang biologi molekuler, memungkinkan keragaman genetik suatu populasi dapat diamati pada tingkat DNA. Marka molekuler ini tidak dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Marka molekuler yang telah digunakan dalam program pemuliaan tanaman adalah RAPD, RFLP dan AFLP.

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh primer yang dapat memberikan polimorfik pada kedelai toleran dan peka terhadap naungan, mencari marka spesifik dari analisis segregasi yang dikelompokkan (*Bulk Segregant Analysis*), mencari keterkaitan marka RAPD dengan marka morfologi.

BAHAN DAN METODE

Bahan Kegenetikaan.

Tanaman kedelai kultivar Ceneng dan Godek A masing-masing ditentukan sebagai tetua toleran dan peka terhadap naungan (Elfarisna, 2000 dan skrining ulang). Selanjutnya digunakan dalam

persilangan untuk memperoleh populasi dasar F_1 , F_1' , BC_1P_1 , BC_1P_2 dan F_2 . Pengujian dalam naungan menggunakan paranet 75%.

Analisis Molekuler

Analisis RAPD dilakukan pada populasi F_2 , BC_1P_1 dan BC_1P_2 terdiri dari tiga tahap. Tahap pertama yaitu seleksi primer dengan menggunakan DNA tetua. Primer-primer yang digunakan adalah primer yang memberikan polimorfik terhadap tetua toleran dan peka. Analisis tahap kedua dilakukan melalui metoda BSA (*Bulk Segregation Analysis*). Pengelompokan berdasarkan marka morfologi yang mempunyai korelasi tinggi dengan hasil tanaman yaitu jumlah cabang produktif (percobaan 1). Terdapat 10 kelompok DNA untuk famili persilangan, yaitu (1) DNA tetua peka; (2) DNA tetua toleran, (3) DNA F_1 ; (4) DNA F_1 resiproknya; (5) Bulk toleran terdiri atas campuran DNA preamplified dari individu-individu tanaman yang sangat toleran dalam populasi BC_1P_1 ; (6) Bulk peka terdiri atas campuran DNA preamplified dari individu-individu tanaman yang sangat peka dalam populasi BC_1P_1 ; (7) Bulk toleran terdiri atas campuran DNA preamplified dari individu-individu tanaman yang sangat toleran dalam populasi BC_1P_2 ; (8) Bulk peka terdiri atas campuran DNA preamplified dari individu-individu tanaman yang sangat peka dalam populasi BC_1P_2 ; (9) Bulk toleran terdiri atas campuran DNA preamplified dari individu-individu tanaman yang sangat toleran dalam populasi F_2 .

Analisis tahap ketiga, setelah diperoleh primer yang menunjukkan polimorfik, selanjutnya dilakukan analisis terhadap individu tanaman dari populasi F_2 . Dalam penelitian ini digunakan sejumlah 158 tanaman.

Hasil uji korelasi antara karakter morfologi dengan hasil, menunjukkan bahwa korelasi terdekat dengan hasil adalah jumlah cabang produktif. Sehingga pengelompokan DNA preamplifikasi dilakukan secara *Bulk Segregation Analysis* berdasarkan karakter morfologi jumlah cabang produktif. Genotipe toleran yang mempunyai jumlah cabang produktif lebih banyak dibandingkan dengan genotipe peka.

Waktu dan Tempat.

Penanaman bahan kegenetikaan dilakukan di Kebun Percobaan IPB Cikabayan, Bogor. Ekstraksi DNA dilakukan di Laboratorium Pusat Studi Pemuliaan Tanaman IPB dan selanjutnya analisis molekuler RAPD dilakukan di Laboratorium Genetika Balai Teknologi

Lingkungan, BPP Teknologi di Kawasan PUSPIPEK Serpong, Tangerang. Penelitian ini dilakukan pada September 2000 sampai dengan Mei 2003.

Isolasi, Pemurnian Pengkonsentrasian DNA.

DNA genomik diekstraksi dari daun tanaman berumur 2 minggu yang ditumbuhkan di dalam kondisi naungan. Ekstraksi DNA menggunakan metode CTAB (Saghai-Marooof *et al.*, 1984).

Amplifikasi DNA.

Analisis RAPD melalui tahap seleksi primer menggunakan 20 primer acak 10 nukleotida yang terdiri dari 11 primer acak berasal dari kit ROTH Random Primer 270, 280 dan 480 produksi Boehringer Mannheim Germany, serta 9 primer acak produksi University of British Columbia. Tahap awal amplifikasi ini dimulai dengan memeriksa primer yang akan digunakan yaitu primer yang dapat mengamplifikasi DNA total hasil isolasi. Selanjutnya dilakukan optimasi terhadap campuran reaksi dan program amplifikasi PCR untuk memperoleh hasil yang dipastikan konsisten dan dapat diulang.

Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan mesin PCR (Perkin Elmer Cetus Thermal Cycler 480), berlangsung selama 45 siklus dengan program PCR tahap I, (pre-PCR) 94 °C selama 5 menit; tahap II, 94 °C selama 1.30 menit; tahap III, 37 °C selama 1.30 menit; tahap IV, 72 °C selama 1.30 menit; dan tahap V, 72 °C selama 5 menit.

DNA hasil penggandaan (amplifikasi) setelah ditambah dengan 5 µl bromofenol blue dielektroforesis pada gel agarose 1% dengan tegangan 110 volt selama dua jam.

Pita DNA hasil amplifikasi selanjutnya diamati pada UV transiluminator dan dilanjutkan dengan pemotretan film polaroid.

Pemetaan dan Analisis Keterpautan Marka RAPD dengan Karakter Toleransi terhadap Intensitas Cahaya Rendah

Karakter anatomi yang terkait erat dengan sifat toleransi terhadap intensitas cahaya rendah dari hasil analisis percobaan sebelumnya adalah klorofil *a*. Sedangkan karakter morfologi adalah jumlah cabang produktif. Setelah pola pita DNA dari individu F_2 dikelompokkan, kemudian pengelompokkan hasil marka RAPD disesuaikan dengan karakter kandungan klorofil *a* dan jumlah cabang produktif. Selanjutnya dilakukan pemetaan dan analisis keterpautan dengan program *Mapmaker*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

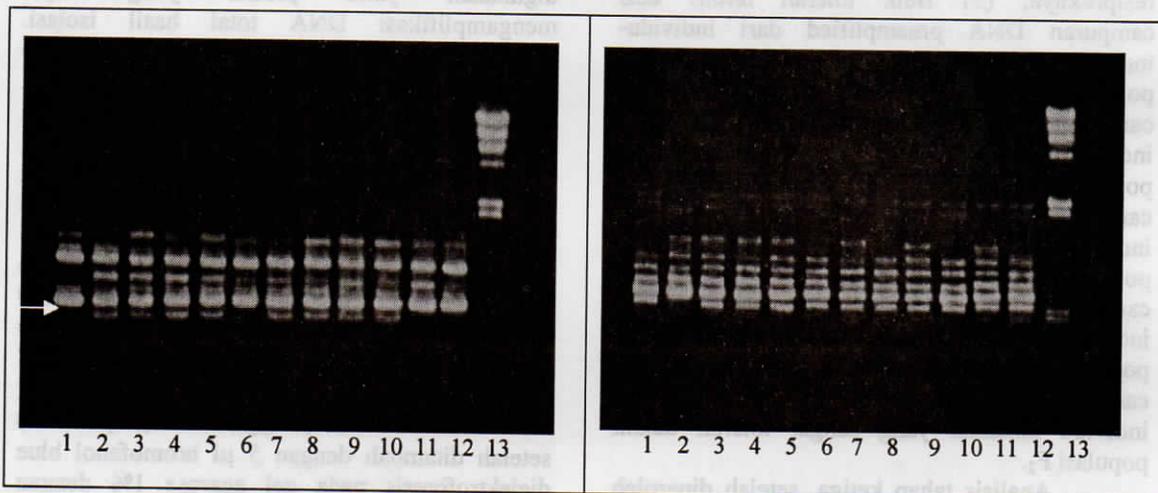
Analisis Molekuler

Hasil amplifikasi 20 primer acak (Tabel Lampiran 1) terhadap DNA genom kedelai toleran (Ceneng) dan peka (Godek A) terhadap naungan diperoleh 79 fragmen DNA yang berukuran antara 125-4000 pasangan basa UBC menghasilkan 73 fragmen DNA. DNA standar (*ladder*) yang digunakan adalah λ HindIII yang menghasilkan 8 fragmen, masing-masing berukuran 125, 564, 2027, 2322, 4361, 6557, 9416 dan 23130 pasangan basa.

Dari 20 primer acak tersebut 14 diantaranya menunjukkan polimorfisme pada kedua genotipe kedelai, sehingga dapat digunakan untuk menganalisis DNA zuriatnya. DNA preamplifikasi tetua dan zuriatnya dikelompokkan menjadi DNA tetua toleran, tetua peka, F₁, F₁

resiproknya, BCP₁ toleran, BCP₁ peka, BCP₂ Toleran, BCP₂ peka, F₂ toleran dan F₂ peka.

Dari 20 primer tersebut dijumpai dua jenis primer yaitu ROTH-480.01 dan UBC-153 memperlihatkan adanya polimorfisme amplifikasi pita DNA yang terpaut dan dapat membedakan antar genotipe-genotipe kedelai yang toleran dan peka terhadap naungan. Untuk memastikan konsistensi pola pita kandidat yang terpaut dengan toleransi tersebut dilakukan amplifikasi ulang dengan menggunakan kedua primer tersebut dan cetakan DNA atau DNA genom yang berasal dari genotipe-genotipe toleran dan peka. Hasil pengujian menunjukkan bahwa pola pita yang dimaksud tetap tampak, yaitu primer ROTH-480.01 menghasilkan fragmen DNA berukuran 125 pasang basa, dan primer UBC-153 menghasilkan fragmen DNA berukuran 125 pasang basa (Gambar 1).



Gambar 1a

Gambar 1b

Gambar 1. Elektroforesis gel agarose hasil amplifikasi DNA genom kedelai dengan primer (a) ROTH-480.01 dan (b) UBC-153. Lajur 13 adalah marka DNA ladder (λ Hind III). Lajur 1 – 12 adalah genotipe-genotipe kedelai yang dianalisis: (1) Godek A (peka), (2) Ceneng (toleran), (3) F₁ (Godek A x Ceneng), (4) F₁ resiproknya, (5) BCP₁ toleran, (6) BCP₁ peka, (7) BCP₂ toleran, (8) BCP₂ peka, (9) F₂ (Godek A x Ceneng) toleran, (10) F₂ peka, (11) F₂ (Ceneng x Godek A) toleran, dan (12) F₂ (Ceneng x Godek A) peka. Tanda panah menunjukkan posisi fragmen ROTH-480.01 dan UBC-153 yang tidak dimiliki oleh lajur genotipe peka terhadap naungan.

Kedua primer tersebut terpaut dengan genotipe kedelai yang toleran terhadap naungan, yaitu Ceneng, F₁ (Godek A x Ceneng), F₁ resiproknya, BCP₁ toleran, BCP₂ toleran dan F₂ toleran.

Pada dasarnya pita DNA hasil amplifikasi dihasilkan dari berpasangannya urutan nukleotida primer dengan urutan genom, dan hasil amplifikasi tersebut menggambarkan keseluruhan atau sebagian urutan nukleotida dari DNA genom yang diamati (Tingey *et al.*, 1992). Polimorfisme pita DNA dihasilkan baik oleh

perubahan urutan basa yang melekat pada situs penempelan primer atau akibat adanya penyisipan atau pengurangan nukleotida di dalam daerah amplifikasi (Williams *et al.*, 1990). Setiap potongan DNA hasil amplifikasi yang berupa pita DNA dalam gel agarose adalah hasil komplementasi dua oligonukleotida primer pada dua posisi dalam genom. Dalam hal ini primer yang terdiri dari 9-10 nukleotida akan mengamplifikasi 9-10 x 2 basa = 18-20 basa dengan posisi yang berlawanan arah. Dengan

demikian, suatu reaksi RAPD yang menghasilkan lima (5) pita DNA hasil amplifikasi secara teori menguji ada tidaknya polimorfisme antara 90 – 100 bp sekuensi DNA yang dihasilkan dari penghitungan 5 pita DNA x 18 – 20 basa untuk setiap primer = 90 – 100 basa (Williams *et. al.*, 1990). Primer-primer yang digunakan dalam penelitian ini rata-rata menghasilkan 7 pita DNA, sesuai dengan penghitungan di atas maka berarti menghasilkan 7 pita DNA x 18 – 20 basa untuk setiap primer = 126 – 140 basa.

Marker berperilaku sebagai marker yang dominan, yaitu dalam populasi yang bersegregasi, individu yang homisigot akan sama-sama memberikan hasil pita DNA untuk suatu marker RAPD tertentu. Dengan demikian, satu-satunya individu yang dapat diduga dengan jelas genotipenya adalah homisigot dari tetua lainnya, yang tidak memberikan hasil pita DNA yaitu tidak terjadi amplifikasi DNA sehingga tidak menunjukkan marka dan tidak adanya pita DNA artinya genotipe individu tanaman adalah homisigot resesif (*aa*). Sedangkan jika ada penampakan pita DNA artinya genotipe individu tanaman adalah homisigot dominan (*AA*) atau heterosigot (*Aa*) (Rafalski *et. al.*, 1991). Dengan demikian teknik RAPD kurang tepat digunakan dalam analisis segregasi pada individu F_2 . Dalam penelitian ini terbukti bahwa individu-individu yang dikelompokkan sesuai dengan kelas toleransi, yaitu sangat toleran, toleran, agak toleran, agak peka, peka dan sangat peka, marka RAPD spesifik untuk sifat toleransi tidak terdapat pada kelompok genotipe peka dan sangat peka. Sedangkan pada lajur kelompok genotipe sangat toleran, toleran, agak toleran dan agak peka terdapat marka RAPD spesifik untuk sifat toleransi terhadap intensitas cahaya rendah.

Populasi yang paling sesuai untuk penyusunan peta genetik dengan menggunakan marker RAPD, yaitu populasi backcross, F_2 dan

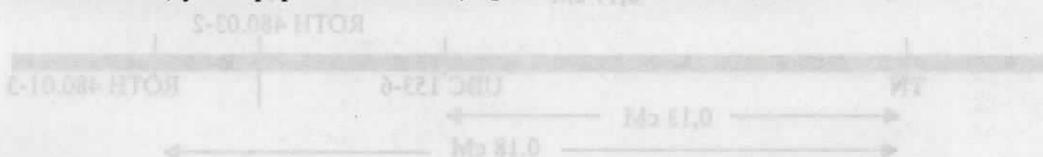
rekombinan silang dalam (*recombinant inbreed*). Namun karena marka RAPD yang diperoleh dapat dianalisis keterkaitannya dengan lokus dari karakter yang diinginkan, maka peta keterkaitan antara berbagai marka RAPD dan karakter yang diinginkan dapat langsung ditentukan dengan menggunakan analisis *Bulk segregant (Bulk Segregant analysis)*, sehingga tidak perlu melalui pembuatan peta genetik (Rafalski *et. al.*, 1991).

Analisis Keterpautan dan Pemetaan Genetik dengan Marka RAPD

Analisis pada individu F_2 ditemukan polimorfisme DNA yang dapat dikelompokkan menjadi 3 tipe dari primer ROTH 480.03, 4 tipe dari primer UBC 153 dan primer ROTH 480.01, yaitu tipe tetua toleran dan peka dan tipe rekombinan (Tabel 1).

Hasil analisis jarak genetik dari marka DNA primer-primer yang digunakan, menunjukkan bahwa urutan pita DNA ke 2 dari primer ROTH 480.03, pita ke 6 dari primer UBC 153 dan pita ke 3 dari primer ROTH 480.01 berturut-turut menunjukkan jarak genetik 0,17 cM; 0,13 cM dan 0,18 cM (Gambar 2).

Total jarak genetik antara marka RFLP yang diketahui pada USDA ARS map sekitar 3000 cM (Shoemaker *et. al.*, 1994; Gresshoff, 1993). Ukuran genome kedelai diduga sekitar $1 - 1,26 \times 10^9$ pb (Blackhall *et. al.*, 1991; Gurley *et. al.*, 1979). Hal ini memberikan jarak rata-rata 340-400 kb per cM (centimorgan). Tetapi genom eukariotik ditandai oleh daerah rekombinasi tinggi dan rendah yang penting untuk memperoleh ukuran hubungan antara jarak genetik dan jarak fisik. Dengan demikian dapat diduga bahwa jarak genetik dengan antara marka RAPD dengan karakter intensitas cahaya rendah untuk primer UBC 153 adalah 39 – 52 kb, primer ROTH 480.01 adalah 54 – 72 kb dan primer ROTH 480.03 adalah 51 – 68 kb.



Gambar 2. Peta keterpautan antara karakter toleransi terhadap naungan (TD) dengan marka DNA RAPD dari primer ROTH 480.03, ROTH 480.01 dan UBC 153.

terdapat adalah pita ke 6 dari primer UBC 153 yaitu 0,13 cM.

SARAN
Masih diperlukan penelitian lebih lanjut terhadap primer yang lain.

KESIMPULAN
1. Analisis molekuler RAPD ditemukan marka spesifik untuk sifat toleransi terhadap naungan dari primer ROTH-480.01 dan primer UBC-153.
2. Jarak genetik antara marka RAPD dengan karakter toleransi terhadap naungan yang

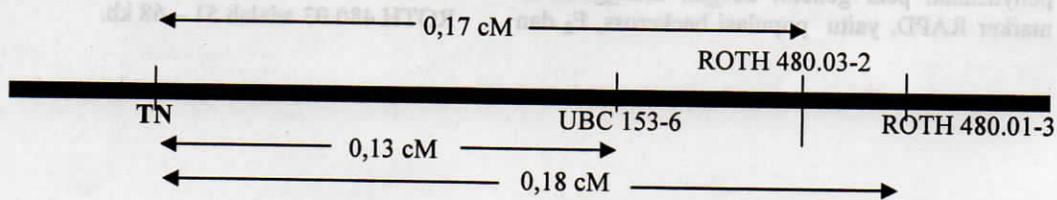
Tabel 1. Kelompok individu F₂ berdasarkan marka RAPD.

No.	Primer/ Tipe Genotipe	Urutan pita DNA (dari atas ke bawah)										Jumlah tanaman		
		ROTH 480.03-					ROTH 480.01							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	Tipe Tetua Toleran	+	+	-	+	+								99
2	Tipe Rekombinan	+	+	+	+	+								19
3	Tipe Tetua Peka	-	+	+	+	+								30
ROTH 480.01		6	7	8	9	10	11	12						158
1	Tipe Tetua Toleran	+	+	+	-	+	+	-						82
2	Tipe Rekombinan 1	+	+	+	-	+	+	-						7
3	Tipe Rekombinan 2	+	+	+	+	+	+	+						11
4	Tipe Rekombinan 3	+	+	+	+	+	+	-						6
5	Tipe Rekombinan 4	+	+	-	-	+	+	+						11
6	Tipe Tetua Peka	+	+	-	+	+	+	+						32
UBC 153		13	14	15	16	17	18	19						158
1	Tipe Tetua Toleran	-	+	-	+	+	+	+						108
2	Tipe Rekombinan 1	+	+	-	+	-	+	+						9
3	Tipe Rekombinan 2	+	+	+	+	+	+	+						5
4	Tipe Rekombinan 3	+	+	-	+	-	+	-						7
5	Tipe Tetua Peka	+	+	+	+	-	+	-						29
Jumlah													158	

Keterangan :

+ = ada - = tidak ada + = marka toleran

Perkiraan ukuran pita DNA (pasangan basa) : no.urut 1) 125 , 2) 560, 3) 125, 4) 560, 5) 2000, 6) 125, 7) 125, 8) 2000, 9) 2000, 10) 2300, 11) 2000, 12) 125, 13) 2000, 14) 2000, 15) 560, 16) 2000, 17) 125, 18) 125.



Gambar 2. Peta keterpautan antara karakter toleransi terhadap naungan (TN) dengan marka DNA RAPD dari primer ROTH 480.01-3, ROTH 480.03-2 dan UBC 153-6.

KESIMPULAN

1. Analisis molekuler RAPD ditemukan marka spesifik untuk sifat toleran terhadap naungan dari primer ROTH-480.01 dan primer UBC-153.
2. Jarak genetik antara marka RAPD dengan karakter toleransi terhadap naungan yang

terdekat adalah pita ke 6 dari primer UBC 153 yaitu 0,13 cM.

SARAN

Masih diperlukan penelitian lebih lanjut terhadap primer yang lain.

DAFTAR PUSTAKA

- Asadi, B, D M Arsyad, H Zahara dan Darmijati. 1997. Pemuliaan kedelai untuk toleran naungan. *Buletin Agrobio 1(2): 15-20.*
- Blakhall, N.M., N. Hammatt, and M. R. Davey. 1991. Analysis of variation in the DNA content of Glycine species: A flow cytometric study. *Soybean Genetics Newsletter 18:194-200.*
- Crowder, L. V. 1993. Genetika Tumbuhan. Terjemahan Lilik K. dan Soetarso. *Cetakan ke-4. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. 499 hal.*
- Elfarisna. 2000. Adaptasi Kedelai terhadap Naungan: Studi Morfologi dan Anatomi. *Tesis Magister Sains, Pascasarjana IPB.*
- Gresshoff, P.M. 1993. Molecular genetic analysis of nodulation genes in soybean. *Plant Breeding Reviews 11:275-318.*
- Gurley, W.B., A.G. Hepburn, J.L. Key. 1979. Sequence organization of the soybean genome. *Biochimica et Biophysica Acta 561:167-183.*
- Keim, P., B.W. Diers, T.C. Olson, and R.C. Shoemaker. 1990. RFLP mapping in soybean: Association between marker loci and variation in quantitative traits. *Genetics 126:735-742.*
- Lorenzen LL, Boutin S, Young N, Specht JE, Shoemaker RC (1995) Soybean pedigree analysis using map-based molecular markers: I. Tracking RFLP markers in cultivars. *Crop Sci 35:1326-1336*
- Rafalski, A., S. Tingey. 1993. RFLP map of soybean (*Glycine max* = 2n = 40). In: O. Brien S.J. (ed) Genetic map: Locus Maps of Complex Genomes *Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor N.Y.*
- Saghai-marooof, M.A., R.M. Biyashev, G.P. Yang, Q. Zhang, R.W. Allard. 1994. Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in Barley: Species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. *Broc Nate Acad. Sci. USA 91:5466-5470.*
- Shoemaker, R.C., L.L. Lorenzen, B.W. Diers, and T.C. Olson. 1994. Genome mapping and agriculture. In: Gresshoff, P.M. (ed) Plant Genome Analysis. *Current Topics in Plant Molecular Biology Vol. 3, chapter 1. CRC Press. Boca Raton. Florida.*
- Tingey, S.V., J.A. Rafalski, and J.G.K. Williams. 1992. Genetics analysis with RAPD markers, p. 3-8. In: Application of RAPD technology to plant breeding. Joint Plant Breeding Symposium Series, Minneapolis, Minnesota. 1 Nov. 1992. *CSSA. Am.Soc. Horticul. Sci., and Am. Genet. Assoc.*
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J. A. Rafalski, and S.V. Tingey. 1990. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Res. 18:6531-6535.*

Tabel Lampiran 1. Primer acak dan urutan nukleotida penyusunnya yang digunakan dalam penelitian ini.

No.	Kode primer	Urutan nukleotida 5' – 3'
1	ROTH-270.01	5'-GTCTCGTCCG-3'
2	ROTH-270.02	5'-GGCTCACTCG-3'
3	ROTH-270.03	5'-GTGTAGGGCG-3'
4	ROTH-270.06	5'-CAGGGGCATC-3'
5	ROTH-270.10	5'-TGCACGGACG-3'
6	ROTH-280.01	5'-GCAGCAGCCG-3'
7	ROTH-280.02	5'-CGACGCGTGC-3'
8	ROTH-280.09	5'-ACGCCCTGGC-3'
9	ROTH-480.01	5'-CACCCCTGCG-3'
10	ROTH-480.02	5'-GCCCCATGCG-3'
11	ROTH-480.03	5'-GCCCCATGCG-3'
2	UBC-30	5'-CCGGCCTTAC-3'
13	UBC-100	5'-ATCGGGTCCG-3'
14	UBC-101	5'-GCGGCTGGAC-3'
15	UBC-150	5'-GAAGGCTCTG-3'
16	UBC-153	5'-GAGTCACGAC-3'
17	UBC-171	5'-TGACCCCTCC-3'
18	UBC-178	5'-CCGTCATTGG-3'
19	UBC-184	5'-CAAACGGCAC-3'
20	UBC-199	5'-GCTCCCCAC-3'