

Optimasi Suhu Annealing qRT-PCR Gen WRKY45 Sebagai Deteksi Gen Ketahanan Terhadap Infeksi *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* pada Padi Hitam Cempo Ireng

Optimization of qRT-PCR Annealing Temperature of WRKY45 Gene for Detection of Resistance Genes Against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* on Black Rice Cempo Ireng

Triyaningsih¹, Tri Rini Nuringtyas^{1,2*}, Yekti Asih Purwestri^{1,2}, Alfino Sebastian²

¹Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada

²Pusat Studi Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada

*E-mail: tririni@ugm.ac.id

ABSTRACT

Plant pathogens constrain the development of black rice farming. One of these pathogens is *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*), causing a bacterial leaf blight disease. The disease disrupts crop growth and reducing yields. Cempo ireng is a local pigmented rice cultivar from Yogyakarta, Indonesia, which is reported for its high resistance to *Xoo*. One of the rice resistance mechanisms to *Xoo* infection is a molecular defense employing plant resistance genes such as *WRKY45*. Comparing the expression of resistance-related genes of the resistant cultivar to the susceptible ones is needed to elucidate the resistance mechanism of the black rice to *Xoo*. For this purpose, the expression of *WRKY45* gene at the level of mRNA can be performed using qRT-PCR. The success of qPCR analysis is greatly influenced by the accuracy of the annealing primer temperature of the corresponding gene. This study aimed to optimize the primer's annealing temperature for *WRKY45* gene. The optimization was done by a temperature gradient PCR. Determination of the optimal annealing temperature was selected based on the profile of the amplification curve, melt curve, melt temperature and the Ct value obtained. The annealing temperature gradient used in this study was ranging from 52°C to 60°C. The results showed that the best annealing temperature for *WRKY45* gene primers is 58.3°C based on the amplification curve, melt curve, melt peak and Ct value of 29.21.

Keywords: *Xoo*, Cempo ireng, qRT-PCR, primer optimization, annealing temperature.

PENDAHULUAN

Pertanian padi hitam di Indonesia mulai banyak diminati setelah diketahui bahwa beras hitam memiliki kandungan gizi yang lebih baik daripada beras putih. Budidaya padi hitam sedang gencar dilakukan untuk dikembangkan sebagai pangan fungsional. Pengembangan budidaya padi hitam, sebagaimana halnya padi putih, masih terkendala oleh berbagai patogen. Salah satu patogen yang sering menyerang padi adalah *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*), penyebab penyakit hawar daun (*bacterial leaf blight*). *Xoo* dapat menginfeksi tanaman padi pada tahap anakan hingga masa reproduktif. Selain dapat mengganggu pertumbuhan tanaman, penyakit ini dapat memengaruhi kualitas biji dengan mengganggu proses pemasakan dan akhirnya menyebabkan penurunan hasil (Niño-Liu *et al.*, 2006)

Pengendalian penyakit hawar daun menggunakan bakterisida dan antibiotik dalam jangka waktu lama menimbulkan resistensi terhadap infeksi *Xoo* dan dapat menyebabkan

pencemaran lingkungan yang membahayakan kesehatan manusia (Rodriguez *et al.*, 1997) Salah satu upaya alternatif yang lebih ramah lingkungan dan ekonomis yaitu dengan mengembangkan kultivar tahan terhadap hawar daun. Cempo Ireng merupakan padi hitam kultivar lokal Yogyakarta yang dilaporkan memiliki ketahanan yang tinggi terhadap hawar daun (Sutrisno *et al.*, 2018). Untuk menunjang pengembangan kultivar padi tahan patogen, maka perlu diketahui mekanisme ketahanan padi Cempo Ireng ini terhadap *Xoo*. Studi ketahanan padi Cempo Ireng secara molekular dapat dilakukan melalui ekspresi gen yang berkaitan dengan sistem pertahanan tanaman. Salah satu gen pertahanan terhadap *Xoo* adalah gen *WRKY45*, yang memiliki peran sebagai faktor transkripsi yang mengatur pertahanan tanaman terhadap berbagai cekaman biotik dan abiotik (Tao *et al.*, 2009). Deteksi molekuler ekspresi gen *WRKY45* dapat dilakukan dengan *quantitative Real Time-Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR). Faktor penting untuk mengukur kualitas ekspresi gen dengan qRT-

PCR adalah memperhatikan kualitas *template* untuk transkripsi terbalik (mRNA) dan *template* untuk PCR (cDNA) (Hewajuli & Dharmayanti 2014). Metode qRT-PCR memiliki kelebihan yaitu sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi, dan *high dynamic range* sehingga cocok untuk tindakan kuantifikasi (Schwarzenbach *et al.*, 2014, Kartika, 2018). Selain memiliki sensitivitas lebih tinggi, kelebihan pengujian qRT-PCR jika dibandingkan dengan PCR konvensional adalah lebih dinamis, resiko kontaminasi silang lebih sedikit, kemampuan aplikasi penggunaannya untuk pengujian lebih banyak (Black *et al.*, 2020). Pada metode *real-time PCR*, produk langsung dapat diukur pada setiap siklus melalui deteksi floresen.

Penggunaan qRT-PCR sangat memerlukan optimasi penggunaan untuk mendapatkan kondisi optimum (Raymaekers *et al.*, 2009). Optimasi diperlukan untuk memastikan bahwa pengujian cukup sensitif dan spesifik pada target yang diinginkan. Terdapat sejumlah faktor yang dapat dilakukan untuk mendapatkan kinerja pengujian yang optimal sehingga dapat meningkatkan sensitivitas, spesifisitas dan presisi, yaitu konsentrasi primer, suhu *annealing*, dan konsentrasi cDNA (Zhao *et al.*, 2021). Suhu *annealing* merupakan faktor utama yang perlu diperhatikan dalam analisis qRT-PCR. Penentuan suhu *annealing* yang tepat penting untuk mengetahui seberapa efisien primer menempel pada *template*, dan mencegah *annealing* nonspesifik dan pembentukan dimer (Taylor *et al.*, 2010). Jika suhu *annealing* tidak sesuai terlalu rendah atau tinggi, reaksi menjadi tidak spesifik sehingga diperoleh produk amplifikasi DNA lebih dari satu target. Referensi suhu *annealing* untuk gen *WRKY45* sudah banyak dipublikasi namun belum ada yang spesifik untuk varietas Cempo Ireng. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan kondisi suhu *annealing* primer yang optimal untuk deteksi gen *WRKY45*, sehingga pengukuran ekspresi gen *WRKY45* sensitif dan tepat.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental pra-analitik studi. Sampel daun padi menggunakan daun padi Cempo Ireng umur 21 hari setelah pindah tanam yang telah diinfeksi *Xoo*. Padi Cempo Ireng ditumbuhkan dalam *green house*, Pusat Studi Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada.

Isolasi RNA

Isolasi RNA total dilakukan dengan menggunakan RNA *FavoprepTM Plant Total RNA Purification Mini*

Kit. Prosedur isolasi RNA total yang digunakan dalam penelitian ini mengacu pada petunjuk protokol kit dengan modifikasi. Sampel daun sebanyak 100 mg digerus dengan mortar dan nitrogen cair. Setelah menjadi serbuk, sampel dimasukkan dalam *microtube* 1,5 ml yang berisi 500 μ l buffer FARB (sudah ditambahkan β -mercaptoetanol). Sampel dihomogenisasi dan didiamkan pada suhu ruang selama 5 menit kemudian sampel dipindahkan ke dalam *filter column* yang telah ditempatkan pada tabung koleksi berukuran 1,5 ml. Selanjutnya tabung disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 13.000 rpm. *Supernatant* yang terbentuk dipindahkan ke tabung 1,5 ml baru, dan ditambahkan EtOH 70% sebanyak 1 volume *supernatant*-nya. Sampel dihomogenisasi selama 5-10 detik dan dipindahkan ke dalam *FARB column* yang telah ditempatkan dalam tabung koleksi ukuran 1,5 ml. Selanjutnya sampel disentrifugasi selama 30 detik dengan kecepatan 13.000 rpm. Cairan yang terbentuk dalam tabung koleksi dibuang dan *FARB column* dipasangkan dengan *microtube* baru. Sebanyak 500 μ l *wash buffer 1* ditambahkan ke dalam kolom yang sama dan disentrifugasi selama 1 menit 30 detik pada kecepatan 13.000 rpm. Cairan yang terbentuk di dalam tabung koleksi dibuang.

Sebanyak 700 μ l *Wash buffer II* ditambahkan ke dalam kolom, dan disentrifugasi selama 1 menit 30 detik dengan kecepatan 12.000 rpm. Cairan yang terbentuk di dalam tabung koleksi dibuang. *FARB column* dan pasangan koleksi tube disentrifugasi selama 1 menit 30 detik dengan kecepatan 12.000 rpm. *FARB column* dipindahkan ke *tube* 1,5 ml baru dan ditambahkan 40 μ l buffer *RNAse Free Water*. *Tube* kembali disentrifugasi selama 1 menit 30 detik dengan kecepatan 13.000 rpm. Sebanyak 40 μ l larutan pada koleksi tube diambil dan dikembalikan ke *FARB column* untuk dilakukan sentrifugasi ulang. Cairan yang terbentuk mengandung RNA hasil isolasi. Kualitas RNA dievaluasi dengan mengukur konsentrasi dan kemurniannya menggunakan spektrofotometer nanodrop. Sampel RNA hasil isolasi kemudian disimpan pada suhu -80°C.

Sintesis cDNA

Complementary DNA (cDNA) disintesis dengan menggunakan kit *ReverTraAce[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover* (Toyobo). Sebelum Reagen 4 \times DN Master Mix digunakan, reagen tersebut ditambahkan *gDNA Remover* dengan perbandingan 88 μ l 4 \times DN Master Mix dan 1,8 μ l *gDNA Remover*. *Template* RNA ditambahkan dengan 4 \times DN Master Mix dan *nuclease free water* dengan komposisi seperti pada Tabel 1. ke dalam *tube* PCR. *Tube* PCR kemudian disentrifugasi dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit. Komponen pada *tube* PCR ditambahkan reagen 5 \times RT Master Mix II sebanyak 2 μ l sehingga total komponen menjadi 10 μ l dan dilakukan *spin-down*. Kemudian tube diinkubasi kembali selama 15 menit pada suhu 37°C. Inkubasi dilanjutkan pada suhu 50°C selama 5 menit dan dipanaskan pada suhu 98°C selama 5 menit dengan

menggunakan mesin PCR dengan jumlah satu kali siklus.

Tabel 1. Komposisi mix *DNase treatment*

Komponen	1 x reaksi
4x DN Master Mix	2 µl
RNA <i>template</i>	5 µl
<i>Nuclease-free water (NFW)</i>	1 µl
Total	8 µl

Setelah sintesis cDNA selesai, sampel cDNA dicek kualitasnya dengan melakukan amplifikasi gen *Ubiquitin (Ubq)* sebagai *housekeeping gene* menggunakan PCR. Sekuen Primer *Ubq* adalah *forward* 5'CQCAGGCQCCGTGGTGGTATAG3', *reverse* 5'GTGATAGTTTTCCCAGTCAACGTC3'. Hasil PCR dievaluasi dengan elektroforesis pada gel agarosa 1,2 %. Marker yang digunakan adalah marker 100 bp.

Optimasi Primer qRT-PCR

Proses pencampuran bahan qPCR dilakukan tanpa menggunakan pencahayaan yang tinggi dan dalam suhu rendah. *Exceltaq™ 2x Fast Q-PCR Mater mix (SYBR, no ROX)* diambil sebanyak 5 µL dalam tube q-PCR. Primer *forward WRKY45* 5'TTTAAGCQGCAGACATGCQA3' ditambahkan sebanyak 1 µL, kemudian ditambah dengan primer *reverse WRKY45* dengan sekuens 5' CQTCQCQTGCQTGTCACACA 3' sebanyak 1 µL. cDNA *template* yang telah digabungkan dari setiap sampel ditambahkan sebanyak 1 µL. Terakhir, NFW ditambahkan sebanyak 2 µL, selanjutnya dihomogenisasi dan *spindown*.

Tube PCR strip yang berisi mix sampel dimasukkan dalam mesin *Biorad CFX 96*. Program q-PCR yang digunakan pada penelitian ini mengikuti protokol *Exceltaq™ 2X Fast Q-PCR Master mix (SYBR, no ROX)* optimasi suhu bertingkat pada tahap *annealing* (Tabel.2) sebanyak 39 siklus. Data yang telah didapatkan dianalisis melalui kurva amplifikasi. Optimalitas reaksi ditentukan dengan mengamati nilai Ct yang dihasilkan dari masing-masing suhu. Untuk memperkuat hasil nilai Ct, dilakukan elektroforesis sampel hasil qPCR menggunakan agar 1,2%.

Tabel 2. Program qRT-PCR optimasi suhu *WRKY45*

Tahapan	Suhu (°C)	Durasi
Pre-denaturasi	95	2 (menit)
Denaturasi	95	15 (detik)
<i>Annealing</i>	52	1 (menit)
	53,9	
	56,3	
	58,3	
	59,4	
	60	

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tahapan optimasi suhu *annealing* primer gen *WRKY45* dilakukan dengan isolasi RNA, sintesis cDNA, dan analisis profil suhu

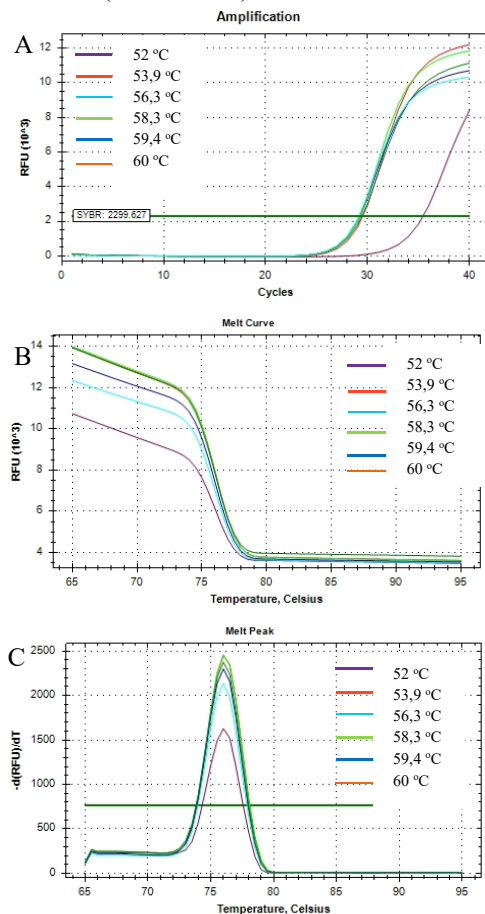
annealing hasil qRT-PCR. RNA bersifat sangat mudah rusak dan membutuhkan ketelitian yang tinggi dalam pengerjaannya, sehingga pada penelitian ini mRNA diubah menjadi cDNA terlebih dahulu sebelum dianalisis dengan qRT-PCR. Hasil isolasi RNA disintesis menjadi cDNA dengan metode *Reverse Transcriptase PCR*. Hasil cDNA dievaluasi dengan amplifikasi *house keeping gen Ubq* menggunakan PCR konvensional. Hasil PCR *Ubq* pada setiap sampel teramplifikasi dengan ukuran 200 bp pada semua sampel (Gambar 1). Salah satu faktor penting yang memengaruhi keberhasilan proses qRT-PCR adalah suhu *annealing*. Suhu *annealing* yang sesuai diperoleh melalui optimasi menggunakan gradien suhu dengan rentang yang ditentukan. Hal yang diperhatikan dalam optimasi primer adalah profil suhu *annealing* meliputi kurva amplifikasi, *melt curve*, *melt peak*, nilai Ct dan hasil visualisasi menggunakan elektroforesis.



Gambar 1. Hasil elektroforesis gen *Ubq* untuk uji kualitas cDNA pada Cempo Ireng, Gen *Ubq* terdeteksi pada semua sampel dengan ukuran 200 bp. Keterangan: notasi huruf sebagai ulangan biologis, notasi angka sebagai ulangan teknik ukuran marker 100 bp.

Profil optimasi suhu *annealing* harus memiliki pola *melt curve* dan *melt peak* yang sama, dan membentuk satu *peak* yang menandakan spesifisitas target. Jika terjadi *double peak*, maka akan dihasilkan dua target dalam satu cDNA yang diartikan primer tidak dapat mengenali spesifik *template* (Kartika, 2018). Optimasi primer untuk mendapatkan suhu *annealing* yang sesuai pada qRT-PCR gen *WRKY45* menunjukkan hasil suhu terbaik pada 58,3°C. Kurva amplifikasi optimasi suhu *annealing* pada suhu 52°C menunjukkan kenaikan amplifikasi setelah siklus ke 30, sedangkan suhu lainnya menunjukkan titik kenaikan amplifikasi kurang dari 30 siklus (Gambar 2A.). Profil kurva amplifikasi akan berkaitan dengan nilai Ct pada qRT-PCR, semakin rendah siklus kenaikan pada kurva, maka menghasilkan nilai Ct yang lebih rendah, seperti nilai Ct pada Tabel 3. Profil *melt curve* dan *melt peak* seragam untuk semua suhu

optimasi. *Melting temperature* primer pada semua sampel menunjukkan nilai *melting temperature* yang sama pada suhu 78°C (Gambar 2B.). *Melt peak* yang terbentuk menunjukkan hasil yang spesifik, satu puncak/*peak* dan semua kurva melebihi nilai *threshold* (Gambar 2C.)



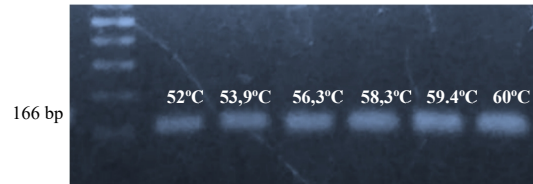
Gambar 2. Profil optimasi suhu *annealing* qRT-PCR gen *WRKY45*. (A). Kurva amplifikasi, (B). *Melt curve*, (C). *Melt peak*

Tabel 3. Nilai Ct hasil optimasi suhu pada qRT-PCR

Suhu <i>annealing</i> (°C)	Nilai Ct
52	34,44
53,9	29,52
56,3	29,14
58,3	29,21
59,4	29,23
60	29,41

Optimasi suhu *annealing* dengan menggunakan qRT-PCR dikonfirmasi dengan elektroforesis untuk mengetahui primer memiliki ukuran target yang diharapkan. Primer

spesifik ditunjukkan dengan pita tunggal pada kisaran 166 bp (Gambar 3.) dan tidak ada primer dimer pada hasil visualisasi.



Gambar 3. Elektroforesis hasil optimasi suhu *annealing* primer *WRKY45*. marker: 100 bp

Nilai Ct (*Threshold cycle*) diartikan sebagai Jumlah siklus yang diperlukan untuk mencapai *threshold*. Nilai Ct merupakan prinsip dasar dari qRT-PCR dan sebagai bagian yang sangat penting untuk memperoleh data yang akurat (Higuchi *et al.*, 1993). Nilai Ct qRT-PCR sangat berkorelasi dengan kuantitas urutan DNA target (Giglio *et al.*, 2003, Hewajuli & Dharmayanti, 2014). Penentuan nilai Ct dapat dilihat dari profil kurva amplifikasi yang dihasilkan pada optimasi primer. Profil kurva amplifikasi optimasi suhu *annealing* pada suhu 52°C dengan 40 siklus menunjukkan titik kenaikan amplifikasi lebih dari siklus ke 30, yang artinya amplifikasi tidak efisien pada suhu 52°C, sehingga primer memerlukan waktu lebih lama untuk dapat mengamplifikasi produk. Sedangkan pada suhu 53,9°C, 56,3°C, 58,3°C, 59,4°C, dan 60°C menunjukkan titik kenaikan amplifikasi kurang dari 30 siklus, yang artinya pada kelima suhu tersebut primer mampu mengamplifikasi lebih efisien pada siklus yang lebih pendek, seperti pada Gambar 1A.

Berdasarkan nilai Ct yang dihasilkan pada masing-masing suhu *annealing* dengan rentang 34,44 sampai 29,41 (Tabel 3), kurva yang memiliki rentang nilai Ct yang terlalu jauh menandakan bahwa pada suhu tersebut *annealing* tidak dapat dilakukan secara optimum. Nilai Ct pada penelitian ini pada suhu 53,9°C, 56,3°C, 58,3°C, 59,4°C, dan 60°C secara berurut memiliki nilai Ct 34,44, 29,52, 29,14, 29,21, 29,23, dan 29,41. Semakin rendah Ct artinya semakin cepat terjadinya amplifikasi untuk dapat melewati *threshold* (Siswanto *et al.* 2019). Berdasarkan nilai Ct, dua suhu dengan nilai Ct terendah yaitu suhu 56,3°C memiliki nilai Ct terendah yaitu 29,14 dan suhu 58,3°C dengan nilai Ct 29,21. Selain nilai Ct, *melt curve* dan *melt peak* hasil optimasi primer menjadi penentu lain dalam pemilihan suhu *annealing* yang sesuai. Berdasarkan *melt curve* dan *melt*

peak yang terbentuk pada optimasi suhu 58,3°C memiliki *melt curve* dan *melt peak* tertinggi dibandingkan dengan suhu 56,3°C (Gambar 2B dan 2C). Berdasarkan nilai Ct, *melt curve* dan *melt peak* hasil optimasi menunjukkan bahwa suhu *annealing* 58,3°C sebagai suhu optimal primer gen *WRKY45* pada qRT-PCR padi Cempo Ireng.

Setelah memperoleh nilai Ct, *melt curve* dan *melt peak*, dilakukan konfirmasi hasil optimasi suhu *annealing* untuk mengetahui primer yang memiliki target spesifik atau tidak. Uji konfirmasi dilakukan dengan menggunakan elektroforesis. Berdasarkan hasil elektroforesis diperoleh *band* tunggal dan sejajar pada kisaran 109 bp (Gambar 3), menandakan bahwa optimasi yang dilakukan dapat memiliki target yang spesifik tanpa ada bias *smear* dan kontaminasi lainnya.

KESIMPULAN

Optimasi suhu *annealing* primer gen *WRKY45* sebagai deteksi ketahanan padi Cempo Ireng terhadap infeksi *Xoo* menggunakan qRT-PCR dengan gradien suhu *annealing*, menunjukkan suhu *annealing* terbaik yang dapat digunakan untuk analisis ekspresi gen adalah suhu 58,3 °C berdasarkan kurva amplifikasi, *melt curve*, *melt peak* dan nilai Ct yang diperoleh.

DAFTAR PUSTAKA

- Black, E. M., Lowings, J. P., Smith, J., Heaton, P. R & Mcelhinney, L. M. 2020. A Rapid RT-PCR Method to Differentiate Six Established Genotypes of Rabies and Rabies-related Viruses Using TaqMan™ Technology. *Journal of Virological Methods*, **105**: 25-35
- Giglio, S., Monis, P. T & Saint, C. P. 2003. Demonstration of Preferential Binding of SYBR Green I to Specific DNA Fragments in Real-time Multiplex PCR. *Nucleic Acids Research*, **31**(22): 1-5.
- Hewajuli, D. A & Dharmayanti, N. 2014. The Advance of Technology of Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction in Identifying the Genome of Avian Influenza and Newcastle Diseases. *Indonesian Bulletin of Animal and Veterinary Sciences*, **24**(1): 16-29.
- Kartika, A. I. 2018. Optimasi Annealing Temperature Primer mRNA RECK dengan Metode One Step qRT-PCR. *Jurnal Labora Medika Vol*, **2**(1): 22-33.
- Niño-Liu, D. O., Ronald, P. C & Bogdanove, A. J. 2006. *Xanthomonas Oryzae* Pathovars: Model Pathogens of A Model Crop. *Molecular Plant Pathology*, **7**(5): 303-324.
- Raymaekers, M., Smets, R., Maes, B & Cartuyvels, R. 2009. Checklist For Optimization and Validation of Real-time PCR Assays. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, **23**(3): 145-151.
- Rodríguez, H., Aguilar, L & Lao, M. 1997. Variations in Xanthan Production by Antibiotic-resistant Mutants of *Xanthomonas Campestris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **48**(5): 626-629.
- Siswanto, Y. P., Merdekawati, F., Ernawati, E., Hardiana, A. T & Kurniawan, E. 2019. Optimasi Suhu Annealing Dan Konsentrasi Primer Untuk Deteksi *Brugia malayi* Menggunakan Real-Time Pcr. *Jurnal Riset Kesehatan Poltekkes Depkes Bandung*, **11**(1): 314.
- Sutrisno, Susanto, F. A., Wijayanti, P., Retnoningrum, M. D., Nuringtyas, T. R., Joko, T & Purwestri, Y. A. 2018. Screening of Resistant Indonesian Black Rice Cultivars Against Bacterial Leaf Blight. *Euphytica*, **214**(11): 199-211.
- Tao, Z., Liu, H., Qiu, D., Zhou, Y., Li, X., Xu, C & Wang, S. 2009. A Pair of Allelic *WRKY* Genes Play Opposite Roles in Rice-Bacteria Interactions. *Plant Physiology*, **151**(2): 936-948.
- Taylor, S., Wakem, M., Dijkman, G., Alsarraj, M & Nguyen, M. 2010. A Practical Approach to RT-qPCR-Publishing Data That Conform to The MIQE Guidelines. *Methods*, **50**(4): 1-5005
- Zhao, F., Maren, N. A., Kosentka, P. Z., Liao, Y.-Y., Lu, H., Duduit, J. R., Huang, D., Ashrafi, H., Zhao, T., Huerta, A. I., Ranney, T. G & Liu, W. 2021. An Optimized Protocol For Stepwise Optimization of Real-time RT-PCR Analysis. *Horticulture Research*, **8**(1): 1-21.

