Jurnal Bioteknologi Pertanian, Vol. 7, No. 2, 2002, pp. 37-42

Keragaman ketahanan aksesi *Capsicum* terhadap antraknose (*Colletotrichum capsici*) berdasarkan penanda RAPD

Resistance diversity of Capsicum *accessions to anthracnose (*Colletotrichum capsici*) based on RAPD markers*

Lia Sanjaya[1], G.A. Wattimena[2], E. Guharja[2], M. Yusuf[2], H. Aswidinnoor[2], dan Piet Stam[3]

[1]*Balai Penelitian Tanaman Hias, Jalan Raya Ciherang, Segunung-Pacet, Kotak Pos 8 Sdl, Cianjur 43253, Indonesia*
[2]*Institut Pertanian Bogor, Jalan Kampus Darmaga, Bogor 16680, Indonesia*
[3]*Laboratory of Plant Breeding, Wageningen University, The Netherlands, PO Box 386, 6700 AJ, Wageningen, NL*

ABSTRACT

The genetic distance of eight *Capsicum* accessions was studied using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. The accessions were grouped into four clusters, which corresponded to the four species, i.e., *Capsicum annuum*, *C. chinense*, *C. baccatum*, and *C. frutescens*. The clusters of *C. annuum*, *C. frutescens*, and *C. chinense* were more closely linked to each other than to *C. baccatum*. One RAPD marker, OPG_{11} (1350 bp), correlated with resistance to *C. capsici* as determined in a laboratory test. Parental supposed for make segregation population were Jatilaba (*C. annuum*) and PI 315023 (*C. chinense*).

[*Keywords*: *Capsicum*, *Colletotrichum capsici*, disease resistance, RAPD]

ABSTRAK

Jarak genetik delapan aksesi cabai telah dipelajari dengan menggunakan markah RAPD. Aksesi dikelompokkan ke dalam empat kelompok yang berhubungan dengan empat spesies, yaitu *Capsicum annuum*, *C. chinense*, *C. baccatum*, dan *C. frutescens*. Kelompok *C. annuum*, *C. frutescens*, dan *C. chinense* lebih terpaut satu sama lain dibandingkan terhadap *C. baccatum*. Berdasarkan hasil pengujian di laboratorium, terdapat satu markah RAPD yang berkorelasi dengan sifat ketahanan terhadap *C. capsici*, yaitu OPG_{11} (1350 pb). Calon tetua yang direkomendasikan untuk pembentukan populasi segregasi adalah Jatilaba (*C. annuum*) dan PI 315023 (*C. chinense*).

[*Kata kunci*: *Capsicum*, *Colletotrichum capsici*, ketahanan terhadap penyakit, RAPD]

PENDAHULUAN

Cabai (*Capsicum* spp.) merupakan sayuran dan rempah paling penting di dunia (Bosland, 1996). Genus *Capsicum* berasal dari dunia baru, spesies *C. annuum* dari Meksiko dan spesies lain (*C. frutescens*, *C. baccatum*, *C. chinense*, dan *C. pubescens*) dari Amerika Selatan. Oleh pedagang Portugis dan Spanyol, cabai diintroduksikan ke Asia pada abad ke-16, dan spesies cabai pedas tersebar paling luas di Asia Tenggara (Pickersgill, 1971; Siemonsma dan Piluek, 1994).

Lebih dari 100 spesies *Capsicum* telah diidentifikasi. Lima spesies di antaranya telah dibudidayakan, yaitu *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. pubescens*, dan *C. baccatum* (Pickersgill, 1988). Klasifikasi spesies-spesies ini didasarkan pada karakter morfologi, terutama morfologi bunga, dapat dilakukan persilangan antarspesies, dan biji hibrida antarspesies fertil (Heiser dan Smith, 1953). *C. annuum* berbunga tunggal dengan petal berwarna putih bersih. *C. chinense* berbunga dua atau lebih per *node* dengan warna bunga putih kehijauan dan penyempitan kelopak yang mencolok. *C. frutescens* membentuk 1-3 bunga per *node*, warna bunga putih kehijauan tanpa penyempitan pada kelopak. *C. baccatum* mempunyai bercak kuning pada petal yang berwarna putih, dan *C. pubescens* mempunyai petal ungu dan biji hitam (Pickersgill, 1988). Penelitian persilangan interspesifik menunjukkan bahwa *C. frutescens*, *C. pubescens*, dan *C. chinense* dapat disilangkan dengan *C. annuum* dan menghasilkan biji yang fertil.

Pemuliaan cabai pertama dilakukan di Amerika tropis untuk kultivar cabai manis (Siemonsma dan Piluek, 1994). Untuk cabai pedas, pemuliaan baru berkembang akhir-akhir ini. Informasi keragaman genetik merupakan dasar untuk mengembangkan strategi pemuliaan tanaman (Pickersgill, 1997). Dalam kasus pembentukan hibrida baru yang tahan terhadap hama dan penyakit, informasi keragaman genetik dapat digunakan untuk seleksi plasma nutfah dan pengambilan contoh yang efisien (Prince *et al.*, 1995).

Penanda molekuler seperti markah DNA merupakan alat yang sesuai untuk menentukan jarak genetik, karena markah yang polimorfik dapat diperoleh lebih cepat dan lebih banyak daripada penanda morfologi (Posch *et al.*, 1995). Isozim dan protein terlarut telah digunakan untuk menentukan jarak genetik dalam spesies *Capsicum*, namun markah yang polimorfik relatif sedikit (Jensen *et al.*, 1979; Panda *et al.*, 1986).

Analisis *random amplified polymorphic* DNA (RAPD) telah berhasil digunakan untuk menguji polimorfisme intraspesifik dalam spesies tanaman (Williams *et al.*, 1990). Analisis RAPD dengan primer tunggal R291, R306, R353, atau R370 telah cukup untuk membedakan empat aksesi dari *C. annuum* (Prince *et al.*, 1995). Markah yang terpaut erat dengan galur isogenik telah dihasilkan dari penanda RAPD secara efisien dengan menggunakan populasi *back-cross*. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan markah RAPD yang diduga terpaut dengan sifat ketahanan terhadap antraknose yang disebabkan oleh *Colletotrichum capsici* dan menetapkan calon tetua persilangan untuk pembentukan populasi segregasi.

BAHAN DAN METODE

Bahan tanaman

Delapan aksesi *Capsicum* diseleksi dari sekumpulan aksesi yang lebih besar untuk program persilangan. Seleksi didasarkan pada ketahanan dan kepekaannya terhadap busuk buah antraknose (Sanjaya dan Voorrips, 2002). Aksesi yang digunakan dan ketahanannya terhadap *C. capsici* disajikan pada Tabel 1.

Isolasi DNA

DNA diisolasi menggunakan prosedur miniprep yang dikembangkan oleh Heusden *et al.* (2000). Amplifikasi DNA didasarkan pada metode Williams *et al.* (1990) dengan sedikit modifikasi. Seratus delapan primer (10-mer) oligonukleotida yang diperoleh dari Operon Technologies, Inc, Alameda, California, Amerika Serikat, digunakan sebagai primer tunggal untuk reaksi *polymorphic chain reaction* (PCR). Campuran reaksi PCR terdiri atas 25 ng total DNA genom sebagai *template*, 0,2 μM dekanukleotida tunggal sebagai primer, dan 1 unit enzim *Taq polymerase* (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, Ind). Selanjutnya ditambahkan bufer reaksi (20 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris HCl pH 8,3, 0,01% gelatin, dan 2,5 mM masing-masing *d*ATP, *d*CTP, *d*GTP, dan *d*TTP) hingga volume menjadi 25 μl. Amplifikasi dilaksanakan dalam mesin *Omnigen Thermocycler* dengan program sebagai berikut: 1 menit pada 92°C untuk denaturasi, 2 menit pada 35°C untuk hibridisasi, dan 2 menit pada 72° C untuk sintesis. Siklus diulang 45 kali. Waktu untuk proses pemanjangan basa-basa nukleotida yang terakhir diperlama menjadi 10 menit pada 72°C. Produk amplifikasi dipisahkan secara elektroforesis pada 1,5% gel agarose dalam bufer TAE (1 x TAE = Tris, 100 mM asam asetat/2 mM EDTA) pada voltase konstan 80 V selama 4 jam. Selanjutnya gel direndam dalam 0,01% etidium bromida. Visualisasi fragmen dilakukan dengan *transilluminator* sinar ultraviolet dan difoto.

Tabel 1. Koefisien matrik kesamaan genetik di antara delapan aksesi *Capsicum* spp.
Table 1. Coefficient of genetic similarity matrix among eight accessions of Capsicum *spp.*

Aksesi / *Accession*	Spesies[1] / *Species*	1	2	3	4	5	6	7	8
Jatilaba[2]	*C. annuum**	1,000							
Buketen-3[3]	*C. annuum***	0,924	1,000						
Fiesta[3]	*C. annuum**	0,936	0,917	1,000					
Pallagi[3]	*C. annuum***	0,921	0,993	0,914	1,000				
PI 281428[3]	*C. chinense***	0,647	0,664	0,629	0,667	1,000			
PI 315023[3]	*C. chinense***	0,668	0,684	0,638	0,687	0,983	1,000		
Tabasco[3]	*C. frutescens**	0,767	0,759	0,745	0,761	0,733	0,733	1,000	
PI 260580[3]	*C. baccatum***	0,652	0,681	0,595	0,687	0,599	0,605	0,652	1,000

Keterangan/*Notes*:
[1]Derajat ketahanan terhadap *C. capsici* berdasarkan pengujian di laboratorium/*Resistance based* C. capsici *isolates on laboratory tests*: * = rentan/*susceptible*, ** = resisten/*resistant*.
[2]Diperoleh dari PT EWINDO, Indonesia/*Obtained from East West Seed Co. Purwakarta, Indonesia.*
[3]Diperoleh dari Pusat Sumber Genetik, Belanda/*Obtained from Centre for Genetic Resources (CGN), Plant Research International, The Netherlands.*

Data dari amplifikasi PCR terhadap delapan aksesi cabai dianalisis sebagai berikut. Ada dan tidak ada pita polimorfik diskor sebagai 1 dan 0. Koefisien kesamaan genetik dihitung dengan formula Nei (1979), yaitu $S = 2n_{xy}/(n_x + n_y)$; n_{xy} adalah jumlah pita yang umum ditemukan pada aksesi x dan y, n_x adalah jumlah total pita pada aksesi x, dan n_y adalah jumlah total pita pada aksesi y. Analisis pita polimorfik juga dilakukan terhadap pasangan aksesi tahan dan rentan (15 pasang), dengan skor 1 pada aksesi tahan dan skor 0 pada aksesi rentan. Pita yang polimorfik tersebut kemudian dijumlahkan. Berdasarkan jumlah pita polimorfik dari primer RAPD terpilih, ditentukan rekomendasi calon tetua persilangan untuk membentuk populasi segregasi. Dendogram dibuat berdasarkan analisis grup *the unweighted pairgroup mean arithmetic* (UPGMA) dengan piranti lunak NTSys 2.1.

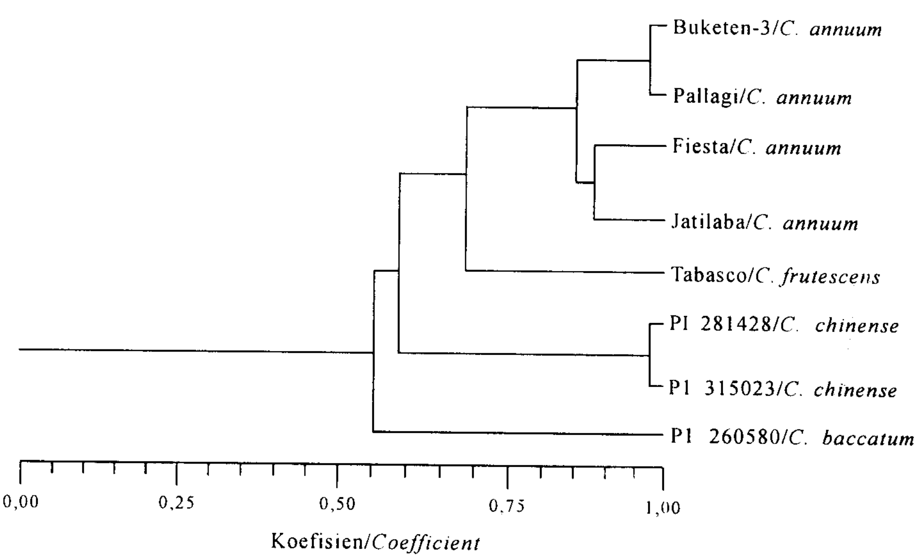
HASIL DAN PEMBAHASAN

Koefisien kesamaan genetik

Seratus delapan dekamer primer dari sekuen acak digunakan pada delapan aksesi cabai dalam suatu reaksi RAPD. Sebanyak 78 primer mengamplifikasi sekuen DNA pada semua aksesi. Hasil amplifikasi dari 30 primer lainnya diabaikan untuk mencegah kesalahan penentuan polimorfisme yang disebabkan oleh kegagalan reaksi PCR. Dengan menggunakan 78 primer ini, dihasilkan 415 produk amplifikasi yang berbeda. Masing-masing primer menghasilkan 2-8 fragmen per aksesi. Dari 415 fragmen, 102 fragmen (24%) terdapat pada semua aksesi dan 313 fragmen sisanya adalah polimorfik. Enam puluh dari 313 pita yang polimorfik memiliki keunikan untuk satu aksesi. Lima puluh lima dari 60 fragmen yang unik terjadi pada PI 260580 (*C. baccatum*), 3 fragmen pada Tabasco (*C. frutescens*), dan 1 fragmen masing-masing pada Pallagi dan Fiesta (*C. annuum*).

Tabel 1 menyajikan koefisien kesamaan genetik delapan aksesi *Capsicum*. Nilai tengah indeks kesamaan dari semua perbandingan ini adalah 0,7443. Aksesi PI 260580 (*C. baccatum*) menunjukkan nilai indeks kesamaan yang rendah (rata-rata 0,6385) dalam semua perbandingan dengan aksesi-aksesi lainnya, dan nampaknya merupakan aksesi yang paling berbeda. Nilai jarak genetik tidak ditampilkan, karena rumusnya merupakan inversi dari formula koefisien kesamaan. Nilai jarak genetik yang lebih kecil menunjukkan koefisien kesamaan yang lebih besar.

Berdasarkan pohon filogenetik yang dibangun dengan markah RAPD, hubungan antara spesies *C. annuum*, *C. chinense*, dan *C. frutescens* lebih erat satu sama lain daripada dengan *C. baccatum* (Gambar 1). Hasil ini sesuai dengan klasifikasi cabai berdasarkan pada morfologi (Pickersgill, 1988), analisis variasi alozim (Jensen *et al.*, 1979) maupun keberhasilan persilangan (Zijlstra *et al.*, 1991).



Gambar 1. Pohon filogenetik delapan aksesi *Capsicum* berdasarkan polimorfisme DNA (RAPD). Koefisien kesamaan genetik di antara aksesi/kelompok dengan kisaran nilai 0-1.

Fig. 1. *Phylogenetic tree of eight accessions of* Capsicum *based on genomic RAPD data. Genetic similarity coefficient among accessions/cluster with 0-1 range.*

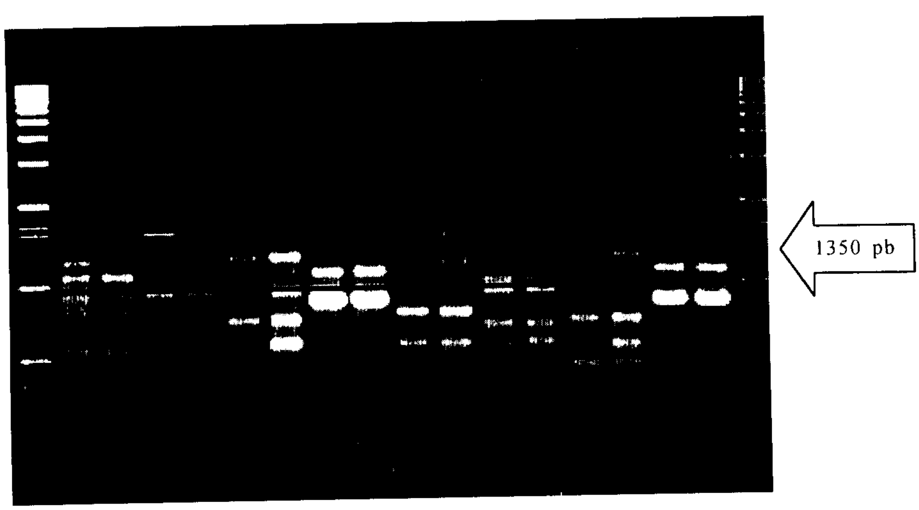
Keterpautan markah RAPD dan sifat ketahanan terhadap *C. capsici*

Berdasarkan seleksi delapan aksesi cabai terhadap *C. capsici*, diketahui tiga aksesi tergolong peka, yaitu Jatilaba dan Fiesta (*C. annuum*) serta Tabasco (*C. frutescens*). Tidak terdapat hubungan antara sifat ketahanan dan spesies pada setiap aksesi. Gambar 2 memperlihatkan bahwa satu markah RAPD, yaitu pita yang teramplifikasi oleh primer OPG_{11} pada 1350 pb, berhubungan dengan sifat ketahanan tersebut. Markah RAPD yang diduga terpaut dengan gen tahan bisa dipastikan, dan mungkin diwariskan kepada ketiga spesies tersebut secara identik dari moyangnya (keluarga Solanaceae). Dari delapan aksesi cabai, peluang markah yang diharapkan menunjukkan pola kosegregasi dengan OPG_{11} sebesar 1/254. Dengan jumlah 415 markah yang polimorfik, diperkirakan didapatkan 2 markah yang memiliki pola yang sama dengan OPG_{11}.

Markah OPG_{11} (1350 pb) sebagai penanda sifat ketahanan terhadap antraknose perlu dibuktikan dengan analisis keterpautan genetik karena tingkat *artefactual variation* dari penanda RAPD yang sangat tinggi, yaitu adanya pita yang *nonparental* (Ellsworth *et al.*, 1993; Micheli *et al.*, 1993). Hasil RAPD yang kurang konsisten bisa disebabkan oleh tipe mesin PCR (Penner *et al.*, 1993) atau enzim *Taq polymerase* yang digunakan (Ridout dan Donini, 1999), perbandingan yang tidak seimbang antara primer dan *template* (Neal dan Harry, 1994), serta rendahnya suhu *(annealing)* dan pendeknya primer RAPD yang digunakan (Yang *et al.*, 1996). Suhu *annealing* di bawah 50-60° C dapat menyebabkan terjadinya *annealing* primer yang tidak spesifik dan eksistensi terhadap primer ini dalam PCR akan menghasilkan produk yang spesifitasnya rendah. Oleh karena itu, perlu dilakukan pengulangan untuk mendapatkan pita yang konsisten (Kantety *et al.*, 1995). Menurut Qi dan Lindhout (1997), resolusi dan reliabilitas pola pita RAPD bukan saja ditentukan oleh primer dalam PCR, tetapi juga dipengaruhi oleh kualitas gel, kondisi *running gel*, lamanya separasi fragmen pada gel, serta prosedur laboratorium selanjutnya. Berkaitan dengan fungsinya sebagai *marker assisted selection* (MAS), markah RAPD yang telah terbukti terkait dengan sifat tertentu dapat dikonversi menjadi *sequence characterize amplified regions* (SCARs) (Paran dan Michelemore, 1993; Paran *et al.*, 1998).

Pembentukan populasi segregasi (*mapping population*)

Untuk analisis keterpautan diperlukan pembentukan populasi yang bersegregasi. Calon tetua terpilih harus memiliki tingkat keragaman yang besar. Berdasarkan data pita polimorfisme antara pasangan aksesi tahan dan rentan, diperoleh 27 primer dengan jumlah pita $\geq$ 4. Primer-primer tersebut adalah OPA (7, 9, 12, 16, 18, dan 20); OPB (5 dan 8); OPC (1, 7, 10, 11, 13, dan 14); OPD (1, 3, 9, 13, 14, 15, dan 19); OPF (7, 10, 14, dan 15); dan OPG (7 dan 11). Hasil analisis pola sidik jari RAPD antara individu aksesi tahan dan rentan menunjukkan adanya variasi polimorfisme antara berbagai pasangan aksesi (Tabel 2).



Gambar 2. Pola pita yang teramplifikasi oleh primer OPG_{11} pada delapan aksesi *Capsicum*. Pita pada 1350 pb berhubungan dengan sifat tahan terhadap antraknose.
Fig. 2. *Amplified bands pattern of eight* Capsicum *accessions by OPG_{11} primer. Bands on 1350 bp was associated with resistance character to anthracnose.*