

Marka SSR Polimorfik pada Tetua dan Galur-galur Hasil Persilangan Cabai Tahan PYLCV

Polymorphics SSR Markers of Chilli Parents and Breeding Lines in Chilli Resistance to Pepper Yellow Leaf Curl Virus (PYLCV)

Ifa Manzila^{1*}, M. Syukur², Tri Puji Priyatno¹, Reflinur¹, Chotimatul Azmi³, Astri Windia
Wulandari³, Neni Gunaeni³, dan Nur Azizah¹

Diterima 19 Januari 2021/Disetujui 19 Agustus 2021

ABSTRACT

Chili genotype (IPBC12 accession) has been known to carry a dominant resistance gene against PYLCV. It could be used as a gene donor for the assembly of PYLCV resistant chili varieties. PYLCV is one of the important pathogenic viruses in chili cultivation in Indonesia. Identification of polymorphic SSR markers in crossing populations between IPBC12 and Yuni variety was performed to obtain the markers that can be used for progenies selection and linked with chili resistance to PYLCV. A total of 20 SSR markers were used for polymorphis analysis on two parents, then the polymorphic markers were tested on F1 and F2 populations. The research obtained four polymorphic markers in the two parentals, and among these four polymorphic markers, three markers (CaBR61, CaBR64, and CaBR98) showed consistently polymorphic on segregated populations. Based on polymorphic marker analysis, 14 of F1 progenies were confirmed as breeding lines between IPBC12 accessions and Yuni varieties. The marker that consistently detects allele inheritance from both parents in the F1 progenies is CaBR61 which is a potential selection marker for F1 progenies. Marker analysis of the F2 lines did not found linked-marker with PYLCV-resistance trait. Further analysis is needed using sufficient and evenly distributed markers in the chili genome to map PYLCV resistance genes in breeding populations of IPBC12-Yuni varieties.

Keywords: Capsicum annum, IPBC12 accession, marker-assisted selection, Yuni variety

ABSTRAK

Aksesi cabai IPBC12 telah diketahui memiliki gen ketahanan dominan terhadap PYLCV dan dapat dimanfaatkan sebagai donor gen untuk perakitan varietas cabai tahan PYLCV. PYLCV merupakan salah satu virus patogen penting pada pertanaman cabai di Indonesia. Identifikasi marka SSR polimorfik pada populasi persilangan antara IPBC12 dan varietas Yuni dilakukan untuk mendapatkan marka yang dapat digunakan untuk seleksi progeni hasil persilangan dan terpaut dengan sifat ketahanan terhadap PYLCV. Sebanyak 20 marka SSR dianalisis polimorfismenya pada dua tetua persilangan, kemudian marka yang polimorfik diuji pada galur generasi F1 dan F2. Hasil penelitian menunjukkan ada empat marka polimorfik pada kedua tetua persilangan, tetapi ketika diuji pada galur-galur keturunannya hanya 3 marka (CaBR61, CaBR64, dan CaBR98) yang polimorfik. Berdasarkan analisis marka, 14 galur F1 terkonfirmasi hasil persilangan antar aksesi IPBC12 dan varietas Yuni. Marka yang secara konsisten mendeteksi penurunan alel dari kedua tetua pada progeni F1 adalah CaBR61. Marka tersebut berpotensi sebagai marka seleksi galur-galur hasil persilangan pada tanaman cabai. Analisis molekuler pada galur-galur F2 tidak mendapatkan keterpautan antara marka dengan sifat ketahanan. Perlu analisis lebih lanjut menggunakan jumlah marka yang mencukupi dan tersebar merata dalam genom cabai untuk memetakan gen ketahanan terhadap PYLCV pada populasi persilangan antara aksesi IPBC12 dan varietas Yuni.

Kata kunci: aksesi IPBC12, *Capsicum annum*, seleksi berpandu marka, varietas Yuni

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian
Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor, 16111

²Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor
Jl. Meranti Kampus IPB Dramaga, Bogor

³Balai Penelitian Tanaman Sayuran
Jl. Tangkuban Perahu 517, Kotak Pos 8413, Lembang 40391
E-mail : ifamanzila@gmail.com (*penulis korespondensi)

PENDAHULUAN

Masalah serangan *pepper yellow leaf curl virus* (PYLCV) pada pertanaman cabai di Indonesia semakin mengkhawatirkan. Ketiadaan varietas cabai tahan PYLCV di lapang menyebabkan prevalensi PYLCV terus meningkat dari tahun ke tahun. Laporan pertama serangan PYLCV di Indonesia terjadi pada pertanaman cabai di daerah Jawa Barat pada tahun 1999 (Hidayat *et al.*, 1999), empat tahun kemudian serangan sudah menyebar hingga Jawa Tengah, Daerah Istimewa Yogyakarta (DIY), dan Lampung (Sulandari *et al.*, 2006). Informasi Direktur Jenderal Hortikultura (2020) menyebutkan bahwa pada tahun 2007 virus Gemini sudah menyebar di 14 provinsi di sentra produksi cabai dan menimbulkan kerugian mencapai 20 miliar rupiah. Bahkan pada akhir tahun 2009, luas tanaman cabai yang terserang PYLCV di Kediri mencapai 650 ha dengan kerugian petani sekitar 16 miliar rupiah. Saat ini, PYLCV menjadi OPT cabai paling penting di Indonesia setelah antraknosa dan Thrips. Tetapi upaya pengendaliannya masih terbatas pada sanitasi lingkungan, perlindungan bibit, dan pengendalian serangga vektornya karena ketiadaan varietas cabai tahan PYLCV.

Penggunaan varietas tahan adalah salah satu strategi pengendalian PYLCV yang efektif dan efisien. Pengembangan varietas cabai tahan PYLCV memerlukan ketersediaan sumber gen untuk perbaikan genetik varietas elit cabai yang ada di lapang. Hasil penelitian Ganefianti *et al.* (2008) telah mengidentifikasi aksesori IPBC12 asal AVRDC sebagai salah satu genotipe cabai tahan PYLCV. Gen ketahanan yang dimiliki oleh aksesori IPBC12 merupakan gen yang bersifat dominan sehingga sangat potensial sebagai donor gen untuk perbaikan sifat ketahanan sejumlah varietas cabai (Ganefianti *et al.* (2015), termasuk varietas cabai lokal Kopay atau Yuni terhadap PYLCV. Varietas Yuni merupakan varietas cabai merah keriting lokal yang sangat berkembang di Sumatera Barat. Varietas lokal ini memiliki beberapa keunggulan dibanding varietas cabai merah keriting lainnya, yaitu panjang buahnya berukuran 30-40 cm dan berkadar air rendah sehingga mudah digerus, umur panen 80-90 hari setelah tanam, dan rata-rata produksinya yang mencapai 18-2 ton ha⁻¹ lebih tinggi dibanding potensi hasil tanaman cabai merah

keriting yang berkisar 7-8 ton ha⁻¹ (Iswari dan Srimaryati, 2014).

Untuk mendukung percepatan program pemuliaan cabai merah keriting tahan PYLCV, identifikasi marka molekuler polimorfik sangat diperlukan untuk proses seleksi galur-galur hasil persilangan yang lebih cepat dan akurat. Pada tahap awal persilangan, setiap pemulia harus memastikan kebenaran progeni hasil persilangan sebelum melakukan uji keragaman genetiknya. Setiap progeni hasil persilangan akan membawa alel kedua tetuanya yang dapat dideteksi secara molekuler dengan marka kodominan, seperti *single sequence repeat* (SSR) (Bredemeijer *et al.*, 2002; Yan *et al.*, 2011; Ved *et al.*, 2013). Lokus SSR dalam genom diapit oleh nukleotida terkonservasi yang dapat dijadikan sebagai marka molekuler (Mandal *et al.*, 2016). Kelimpahan SSR dalam genom disebabkan oleh tingginya tingkat mutasi SSR yang mencapai 10^{-2} – 10^{-6} kejadian/lokus/generasi dibandingkan tingkat mutasi titik pada gen pengkode lokus (Li *et al.*, 2002).

Penggunaan marka SSR dalam program pemuliaan cabai telah dilaporkan keberhasilannya oleh banyak peneliti untuk berbagai analisis genetik, sidik jari DNA, dan seleksi hasil pemuliaan (Buso *et al.*, 2016; Thakur *et al.*, 2020; Mangal *et al.*, 2017; Dhaliwal *et al.*, 2014; Sharmin *et al.*, 2018, Terryana *et al.*, 2018, Nugroho *et al.*, 2019, Wartono *et al.*, 2019). Keunggulan marka SSR adalah tingkat polimorfisme yang tinggi dan reproduibel (Becher *et al.*, 2000) sehingga informasi genetik yang diperoleh dapat menjadi petunjuk untuk seleksi hasil persilangan (Asmono *et al.*, 2005). Thakur *et al.* (2020) berhasil menggunakan marka SSR untuk memetakan gen ketahanan terhadap PYLCV pada galur-galur F2 hasil persilangan antara aksesori MS-341 (tetua rentan) dengan aksesori S-343 (tetua tahan). Dua marka SSR yang terpaut dengan sifat ketahanan terhadap PYLCV mampu memetakan posisi gen di kromosom ke-6 pada jarak total 15.7 cM (Thakur *et al.*, 2020). Gen ketahanan tersebut merupakan gen tunggal yang bersifat dominan (Jindal *et al.*, 2019; Thakur *et al.*, 2019).

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi marka SSR polimorfik pada populasi persilangan antara aksesori IPBC12 dan varietas Yuni. Marka polimorfik yang

diperoleh diharapkan dapat digunakan untuk seleksi progeni hasil persilangan dan terpaut dengan sifat ketahanan terhadap PYLCV.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia dan Rumah Kaca Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian bulan Maret 2020 – Juli 2021.

Bahan Penelitian

Dua tetua cabai (aksesi IPBC12 dan varietas Yuni) diperoleh dari koleksi plasma nutfah Departemen Agronomi dan Hortikultura, Institut Pertanian Bogor. Marka SSR (20 pasang primer) diadopsi dari hasil penelitian Buso *et al.* (2016), Thakur *et al.* (2019), Mangal *et al.* (2017) (Tabel 1). Primer dengan kualitas PCR *grade* disintesis oleh *Ist Base* melalui PT. Genetika Science.

Penyiapan Materi Tanaman

Aksesori IPBC12 (genotipe tahan) sebagai tetua betina disilangkan dengan varietas Yuni (varietas rentan) dan menghasilkan 14 progeni F1. Galur-galur F1 ditanam dalam pot plastik (diameter 30 cm), dipelihara dalam kurungan kasa kedap serangga, dan dibiarkan menyerbuk sendiri untuk menghasilkan populasi galur F2. Populasi galur F2 (1 500 nomor galur) ditanam dalam *plastic tray* dan dipelihara dalam kurungan kasa kedap serangga untuk skrining ketahanan terhadap PYLCV.

Skrining Ketahanan Galur-galur F2 Cabai terhadap PYLCV

Skrining ketahanan galur-galur F2 cabai terhadap PYLCV dilakukan dengan metode *Bulk Seedling Test*. Sebanyak 1 500 nomor galur F2 yang diperoleh dari 14 progeni F1 ditanam pada *plastic tray* yang berisi media tanam. Tanaman dipelihara dalam kurungan kasa kedap serangga hingga berumur satu bulan setelah tanam. Selanjutnya tanaman cabai diinfestasi dengan kutu kebul (*Bemisia tabaci*) yang sebelumnya telah diinkubasikan pada tanaman cabai bergejala PYLCV strain Brebes selama 48 jam. Setiap tanaman diinfestasi dengan ± 2 ekor serangga per tanaman. Proses infestasi dilakukan secara

pelahan dengan memotong daun atau bagian tanaman cabai yang kutu kebulnya, lalu memasukkannya ke dalam kurungan. Serangga dibiarkan untuk menularkan virus selama 48 jam. Setiap pagi dan sore, tanaman dan kurungan digerakan agar serangga menyebar merata ke seluruh tanaman. Setelah 48 jam inkubasi, serangga dimatikan dengan penyemprotan insektisida. Satu minggu setelah penularan virus, tanaman dipindahkan ke *polybag* (10 cm x 15 cm) yang berisi tanah dan pupuk kandang. Perkembangan gejala PYLCV diamati setiap minggu hingga terseleksi tanaman yang tahan.

Analisis Molekuler

a. Ekstraksi DNA

Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan *Genomic DNA Mini Kit Plant* dari Geneaid sesuai protokol yang diberikan. Sebanyak 100 mg daun cabai digerus dengan nitrogen cair. Sampel dipindahkan ke tabung mikro 2 ml, ditambah 400 μ l buffer GPX1 yang sudah ditambah 5 μ l RNase, divortek, dan diinkubasi dalam penangas air pada suhu 60°C selama 10 menit. Kemudian sampel ditambah 100 μ l buffer GP2, divortex, dan diinkubasi dalam es selama 3 menit. Suspensi dipindah ke *filter column*, disentrifugasi 1 000 x g selama 1 menit. Supernatan dipindah ke tube baru dan ditambah 750 μ l buffer GP3. Suspensi dipindah ke *GD column*, disentrifugasi 16 000 x g selama 2 menit. Supernatan dibuang, lalu *GD column* dicuci dengan 400 μ l buffer W1 dan disentrifugasi 16 000 x g selama 1 menit. serta dengan 600 μ l wash buffer dan disentrifugasi 16 000 x g selama 1 menit. Selanjutnya *GD column* dipindah ke tube baru, ditambah 25 μ l *elution buffer*, didiamkan selama 5 menit, lalu disentrifugasi 16 000 x g selama 1 menit. Kuantitas dan kualitas DNA diukur dengan nanodrop.

b. PCR dan Elektroforesis

Reaksi PCR dibuat dalam 20 μ l yang mengandung 1x PCR mix (Bioline. Jerman), 0.5 μ M primer (F dan R), dan 200 ng DNA. PCR dijalankan dengan program sebagai berikut: 5 menit pada suhu 94 °C untuk denaturasi permulaan, selanjutnya dilakukan 35 siklus yang terdiri dari: 60 detik pada suhu 94 °C untuk denaturasi, 60 detik pada suhu 55 °C untuk penempelan primer, dan 2 menit pada suhu 72 °C untuk perpanjangan primer.

Perpanjangan primer terakhir selama 7 menit pada suhu 72 °C. Hasil PCR kemudian dielektroforesis dengan gel agarosa 1.5% dalam buffer TAE 1x dan voltase 60 volt serta

gel poliakrilamida 6% untuk analisis lebih lanjut. Pewarnaan DNA dilakukan dengan *gel red*.

Tabel 1. Primer-primer yang diuji polimorfismenya pada tetua dan galur hasil persilangan antara aksesori aksesori IPBC12 dan varietas Yuni

No	Nama Primer	Sekuen 5'...3'	Ukuran amplikon target (bp)
1	C2At5g11550	ATTGCCCTCTGTTTTGTACAC CACCGGATTCGGAACAAGTGAATG	183
2	C2At5g23060	ACTTAGAGCTTCTTCAGCCACCGC ATGCCAGCACTCTGCATTGCCTC	315
3	C2At3g55800	ATGCTTGTTCTGAGGAAGTTCCTGAG AGTTCGTGTCCACAATACTAGAACCATC	210
4	C2At5g17170	TTCAAGGGCTATCATTACAAGAGGC CTTGCGAGAAATTCTCTAATAAGTGGT	189
5	CA 516044	ATTTTCTTTTCATTTCCCCCTTT TGCTCAGCATTAACGACGTC	194
6	PAU-LC-343-1	TGTGTGTGTGTAATCTCCAA ACGGCATGTAAATAAAGTTCA	171
7	CaBR23	GGCTCCTAGGTATGCACCAG AATGTGATGCACAGTGCACC	162-174
8	CaBR40	TCAGACACCAAGCCATCAA GCAAGCTAATGGCATGGTA	124-142
9	CaBR61	GAAGAGTCCTACTCAATCTA CTATATGGTTTCACTCCTTC	84-134
10	CaBR63	GAGTGCCTATCGATGTCTTT AGCTATCTAATTGCACCAAG	146-172
11	CaBR64	AGAGTGTCCCATGCATAC GCTTATTCCAAAGGTCTC	114-184
12	CaBR82	GCACATGCACGTACAACC GGGGTAAAAGGCATTGTG	172-190
13	CaBR88	AATGGATGTCCCTTGCTTT CAACTGATCAACCATTCCGT	148-164
14	CaBR93	GCAATATGTTGAGTAGCTGT ACCCATACAAATCATCCAC	160-182
15	CaBR98	CCGTAAAGAAATCAAACCAC GCATGCACACATAAAACTC	132-146
16	CaBR100	ATGGCATGGTACTTCTTAGCA CCAAGCCATCAATTATGCAA	138-152
17	CaBR116	GCATGGTACTTCTTAGCATT GACACCAAGCCATCAATTA	118-130
18	Hpms 1-5	CCAAACGAACCGATGAACACTC GACAATGTTGAAAAAGGTGGAAGAC	311
19	Hpms 2-21	TTTTTCAATTGATGCATGACCGATA CATGTCATTTTGTGATTGATTGG	295
20	AGi030	CGAGGCTTTTCTTCCCTATC GCCCGTTTGATTCTTTGA	310-344

Analisis Data

Analisis data dilakukan berdasarkan skoring pita DNA yang muncul pada tetua persilangan dan galur-galur hasil persilangan. Setiap pita DNA yang muncul pada gel dengan ukuran yang sama seperti yang ditargetkan merupakan alel tertentu pada satu lokus yang sama dari sampel cabai yang dibandingkan. Setiap alel dianggap mewakili satu karakter dan diberi nilai berdasarkan ada tidaknya suatu alel, nilai 0 untuk yang tidak ada pita dan 1 untuk yang ada pita. Berdasarkan ada atau tidaknya pita, profil pita diterjemahkan kedalam data biner. Persentase penurunan dan rekombinasi alel dihitung dengan rumus Nei (1987):

$$\% \text{ penurunan alel} = \frac{\sum \text{ alel yang sama dan sejajar dari setiap tetua}}{2 \times \text{ Jumlah tanaman yang diamati}} \times 100\%$$

$$\% \text{ rekombinasi alel} = \left(1 - \frac{\sum \text{ alel yang sama dan sejajar dari setiap tetua}}{2 \times \text{ Jumlah tanaman yang diamati}}\right) \times 100\%$$

Nilai PIC (*Polymorphic Information Content*) yang digunakan untuk mengetahui kekuatan masing-masing primer pada genotipe yang diuji dihitung dengan rumus:

$$PIC = 1 - \sum_i f_i^2 \quad i = 1, 2, 3 \dots n$$

di mana f_i^2 adalah frekuensi alel ke-i.

Diversitas genetik diukur dengan rumus Lowe *et al.* (2004):

$$GST = \frac{D_{ST}}{H_T}$$

$$H_T = 1 - \sum p^2$$

$$D_{ST} = H_T - H_S$$

$$H_S = \frac{\sum(1 - \sum pi^2)}{s}$$

Dimana:

H_S = keanekaragaman genetika dalam populasi

D_{ST} = keanekaragaman genetika antar populasi

H_T = total keanekaragaman genetika

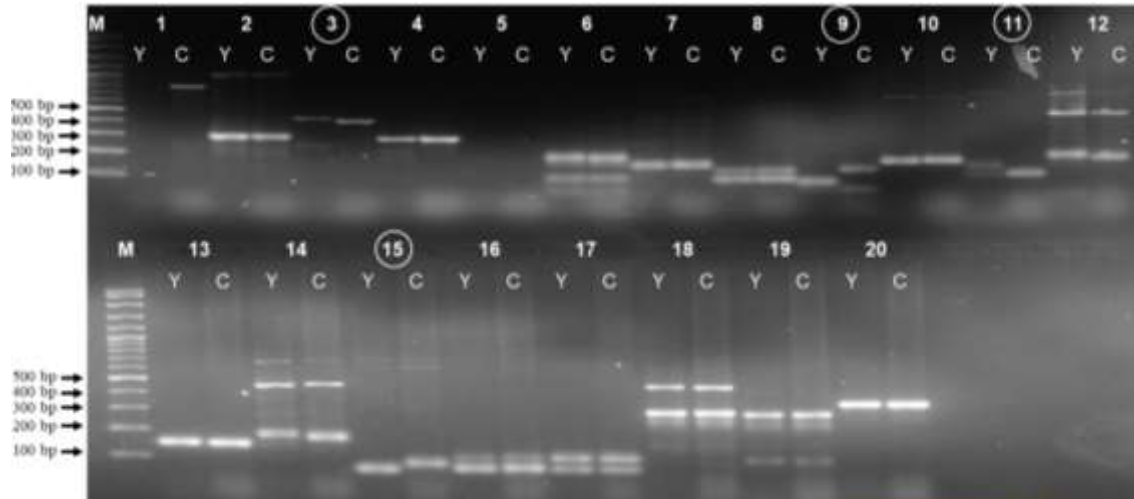
GT = koefisien diferensiasi genetika
 s = jumlah populasi
 p = rata-rata frekuensi alel
 pi = frekuensi alel ke i

HASIL DAN PEMBAHASAN

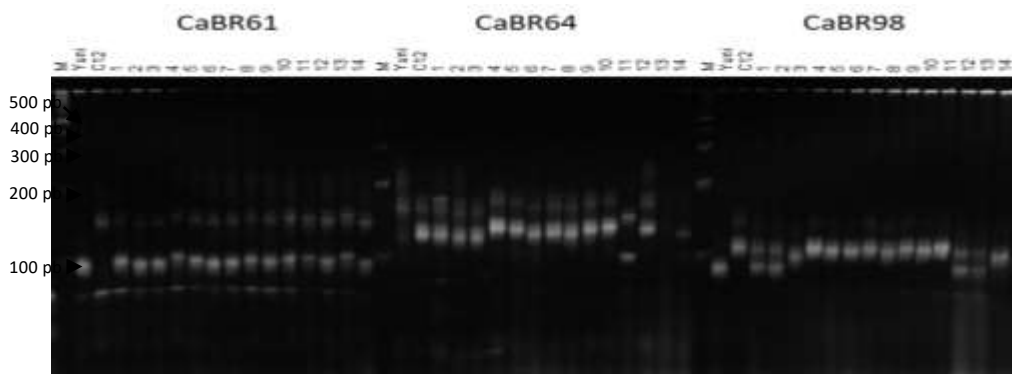
Identifikasi Marka Polimorfik pada Tetua Persilangan

Identifikasi marka molekuler polimorfik pada tetua persilangan sangat diperlukan untuk menentukan primer-primer yang dapat digunakan dalam seleksi progeni hasil persilangan. Marka SSR yang bersifat polimorfik dapat membedakan asal penurunan alel dari setiap tetua persilangan pada progeninya. Keberhasilan persilangan ditentukan oleh keberadaan alel yang secara genetik diturunkan oleh tetua persilangan pada generasi F1-nya (Lestari *et al.*, 2017).

Berdasarkan hasil skrining polimorfisme dari 20 marka SSR yang diuji, terseleksi empat primer yang bersifat polimorfik pada aksesi IPBC12 dan varietas Yuni (Gambar 1). Semua pasangan primer mampu mengamplifikasi target DNA sesuai ukuran berat molekul yang diharapkan, kecuali primer CA516044. Tidak adanya produk PCR dari primer CA516044 mungkin disebabkan oleh tidak komplemennya sekuens DNA primer dengan sekuens DNA pada kedua tetua cabai tersebut. Optimasi kondisi PCR sudah dilakukan tetapi tetap tidak menghasilkan amplikon. Ukuran amplikon target dari 20 primer berkisar antara 84-344 bp. Setiap amplikon yang dihasilkan oleh masing-masing primer merupakan alel tertentu pada satu lokus yang sama dari tetua cabai yang dibandingkan. Empat pimer yang bersifat polimorfik antara aksesi IPBC12 dan varietas Yuni adalah C2At3g55800, CaBR61, CaBR64, dan CaBR98. Polimorfisme keempat primer tersebut pada genotipe cabai dari spesies *C. annuum* sudah dilaporkan oleh beberapa peneliti sebelumnya (Buso *et al.*, 2016; Thakur *et al.*, 2019; Mangal *et al.*, 2017). Polimorfisme merupakan refleksi dari nilai frekuensi dan keragaman alel antara tetua persilangan (Mandal *et al.*, 2016).



Gambar 1. Pola pita DNA hasil PCR 20 primer SSR dari dua tetua persilangan cabai pada gel agarosa (aksesi IPBC12 dan varietas Yuni). (Keterangan gambar: M = DNA ladder 100 bp; Nomor 1 – 20 = primer SSR, Y = varietas Yuni; C = genotipe IPBC12; nomor primer yang dilingkari menunjukkan polimorfik antara kedua tetua).



Gambar 2. Pola pita DNA hasil PCR pada gel akrilamid menggunakan empat jenis primer (C2At3g55800, CaBR61, CaBR64, dan CaBR98) pada generasi F1 hasil persilangan aksesori IPBC12 dan varietas Yuni (Keterangan gambar: M = DNA ladder 100 bp; 1A...5C = nomor galur F1 cabai hasil persilangan aksesori IPBC12 dan varietas Yuni)

Konfirmasi Progeni F1 Hasil Persilangan

Dari 37 persilangan yang dilakukan hanya ada 14 bunga yang berkembang menghasilkan buah dan biji cabai. Buah yang dihasilkan dari persilangan tersebut tidak berbeda dengan tipe buah aksesori IPBC12. Untuk memastikan ke-14 nomor progeni tersebut berasal dari hasil persilangan antara aksesori IPBC12 dan varietas Yuni, tanaman cabai generasi F1 diidentifikasi secara molekuler dengan empat primer polimorfik. Gambar 2 menunjukkan hasil konfirmasi 14 nomor progeni menggunakan empat marka polimorfik. Hasil elektroforesis memastikan tiga primer (CaBR61, CaBR64, dan CaBR98) tetap konsisten bersifat polimorfik, dan hanya

primer C2At3g55800 yang monomorfik. Primer CaBR61 mendeteksi semua penurunan alel tetua persilangan pada 14 progeni yang diuji. Demikian juga dengan primer CaBR64 yang dapat mendeteksi penurunan alel tetua pada progeni nomor 1-10, 12, dan 14, tetapi alel yang terdeteksi pada progeni nomor 11 dan 13 memiliki berat molekul DNA yang berbeda dengan tetuanya. Perbedaan ukuran pita yang terjadi pada kedua progeni tersebut diduga karena adanya perubahan genomik yang dapat terjadi dari alel yang bersifat homozigot (satu pita) menjadi heterozigot (dua pita) atau sebaliknya (Megia dan Djuita, 2010). Sementara primer CaBR98 hanya mampu mendeteksi penurunan alel tetua pada empat

nomor progeni saja, yaitu nomor 1, 2, 12, dan 13.

Progeni hasil persilangan terkonfirmasi oleh adanya segregasi alel yang ditunjukkan oleh pita DNA berasal dari kedua tetua. Persentase penurunan alel dari masing-masing tetua disajikan pada Tabel 2. Ketiga marka polimorfik menunjukkan kemampuan yang berbeda dalam mendeteksi pewarisan alel. Marka CaBR61 mendeteksi secara sempurna alel-alel dari tetua pada semua progeni yang membawa 50% alel dari setiap tetuanya. Marka CaBR64 dan CaBR98 tidak mampu mendeteksi keberadaan alel-alel yang sudah berekombinasi pada beberapa progeni. Persentase rekombinasi alel yang tidak mampu terdeteksi oleh marka CaBR64 dan CaBR98 adalah 14.4% dan 39.3%. Persentase rekombinasi yang berbeda antar marka molekuler berkaitan erat dengan nilai heterozigositas dan PIC yang dihasilkan dari skoring pita DNA target (Dea *et al.*, 2020) (Tabel 3). Berdasarkan hasil penelusuran alel dengan marka molekuler menunjukkan bahwa semua nomor individu F1 merupakan hasil rekombinasi kedua tetua persilangan. Primer CaBR61 yang secara konsisten mampu mendeteksi penurunan alel dari kedua tetua pada progeninya dapat dijadikan marka seleksi hasil persilangan pada tanaman cabai. Seleksi populasi persilangan menggunakan marka SSR sudah banyak diaplikasikan pada sejumlah pemuliaan tanaman, seperti kedelai (Santana *et al.*, 2014; Lestari *et al.*, 2017), jagung (Elci dan Hancer, 2015), singkong (Vincent *et al.*, 2014), kapas (Dongre *et al.*, 2011), *Eucalyptus* (Subashini *et al.*, 2013), dan pisang (Dea *et al.*, 2020). Hasil penelitian ini juga menunjukkan efektivitas marka SSR dalam menyeleksi individu-individu hasil persilangan. Konfirmasi selanjutnya perlu didukung data karakter morfologi atau keragaan fenotipe lainnya untuk memastikan generasi awal hasil persilangan dapat digunakan untuk tahap pemuliaan berikutnya.

Disamping itu, jumlah marka yang diskriminatif juga perlu ditambah agar proses seleksi menjadi lebih efektif dan efisien dalam program pemuliaan.

Ketahanan Galur-galur F2 terhadap Virus Gemini

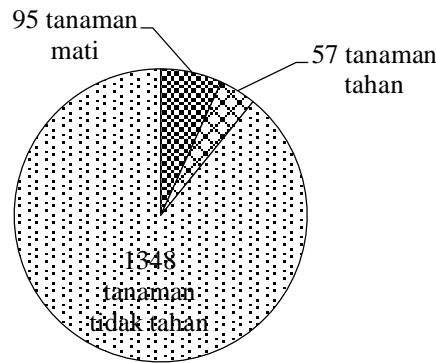
Dari hasil uji ketahanan 1 500 nomor galur F2 terhadap PYLCV diperoleh 57 nomor galur yang menunjukkan reaksi tahan, 1 348 galur tidak tahan, dan 95 tanaman mati (Gambar 3). Galur-galur yang dikategorikan tahan ditunjukkan oleh tidak adanya gejala infeksi PYLCV, baik berdasarkan gejala visual maupun deteksi dengan PCR. Tabel 4 menunjukkan nomor-nomor galur yang bersifat tahan. Setiap progeni F1 yang menghasilkan galur F2 tahan PYLCV dengan jumlah yang berbeda-beda. Progeni F1 nomor 4 dan 14 menghasilkan galur-galur F2 tahan PYLCV yang paling tinggi, diikuti oleh progeni F1 nomor 13 dan 1. Hasil pengujian ini hanya mendapatkan sekitar 3.8% galur F2 yang tahan PLCV dari populasi F2 yang berhasil diuji, dengan perbandingan antara galur tidak tahan dan tahan adalah 25:1. Ganefianti *et al.* (2015) menyatakan bahwa gen ketahanan terhadap PYLCV pada IPBC12 tidak tersebar secara merata dalam genom induknya. Hal ini menunjukkan bahwa gen ketahanan terhadap PYLCV memiliki heritabilitas yang rendah. Menurut Mendoza (1972), karakter ketahanan terhadap virus umumnya dikendalikan oleh sedikit gen (*oligogenic*). Bahkan hampir 50% gen-gen yang mengendalikan sifat ketahanan terhadap virus berupa gen-gen resesif (Kang *et al.*, 2005), meski gen ketahanan terhadap PYLCV pada IPBC12 diduga bersifat dominan (Ganefianti *et al.*, 2015). Dengan persentase penurunan potensi genetik yang rendah, seleksi sifat ketahanan terhadap PYLCV pada galur-galur persilangan dengan aksesi IPBC12 perlu dilakukan dengan metode yang lebih mudah, cepat, dan akurat.

Tabel 2. Persentase pewarisan alel pada generasi F1.

Primer	Aksesi IPBC12 x varietas Yuni		
	Persentase alel tetua donor (A), resipien (B), rekombinasi (H)		
	A	B	H
CaBR61	50	50	0
CaBR64	42.8	42.8	14.4
CaBR98	14.3	46.4	39.3

Tabel 3. Ringkasan statistik polimorfisme yang diobservasi pada total progeni F1 berdasarkan pita DNA target yang dihasilkan dari tiga marka SSR.

Primer	Jumlah alel	Diversitas gen	Heterozigositas	PIC
CaBR61	2	0.84	0.53	0.5
CaBR64	2	0.86	0.68	0.63
CaBR98	2	0.87	0.82	0.76



Gambar 3. Hasil uji ketahanan galur F2 cabai terhadap virus gemini

Tabel 4. Nomor-nomor galur F2 yang teridentifikasi bersifat tahan terhadap PYLCV

Nomor progeni F1	Nomor galur F2 yang tahan	% galur F2 yang tahan
1	F2.1.70, F2.1.72, F2.1.76, F2.1.89, F2.1.90, F2.1.94, F2.1.95, F2.1.100	5.6
2	F2.1.214, F2.1.241	1.4
3	0	0
4	F2.2.495, F2.2.504, F2.2.507, F2.2.508, F2.2.509, F2.2.512, F2.2.514, F2.2.520, F2.2.538, F2.2.549, F2.2.551	7.8
5	F2.2.620, F2.2.628, F2.2.632	3.8
6	F2.3.686, F2.3.703	2.9
7	F2.3.763	1.7
8	F2.3.819, F2.3.866, F2.3.872, F2.3.881	2.6
9	F2.3.972, F2.3.974, F2.3.976, F2.3.983, F2.3.989	6.7
10	F2.4.1054	1.4
11	F2.4.1124, F2.4.1161	1.6
12	F2.5.1249	1.3
13	F2.5.1303, F2.5.1308, F2.5.1316, F2.5.1321	6.7
14	F2.5.1398, F2.5.1399, F2.5.1400, F2.5.1403, F2.5.1407, F2.5.1414, F2.5.1416, F2.5.1417, F2.5.1426, F2.5.1427, F2.5.1471, F2.5.1473, F2.5.1487	8.0

Analisis Molekuler Galur-galur F2 Tahan dan Tidak Tahan PYLCV

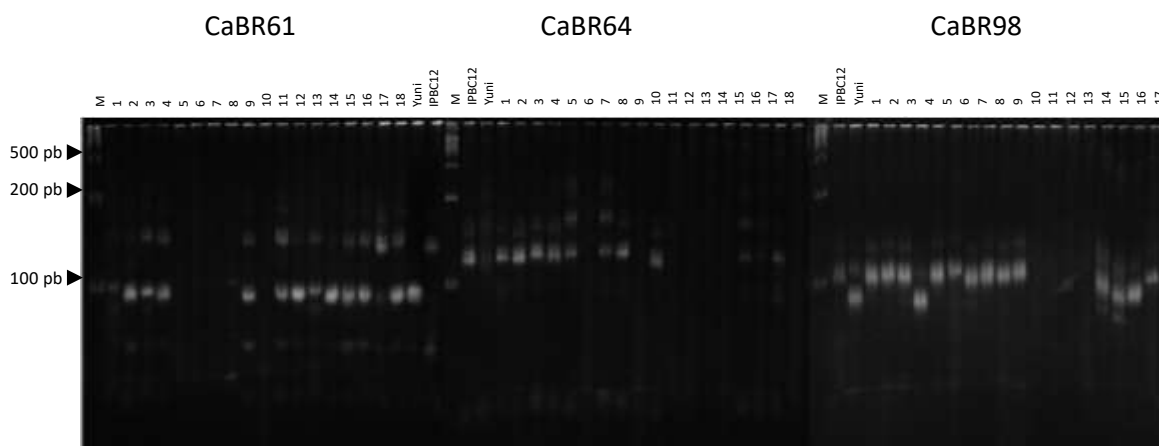
Untuk memastikan apakah polimorfisme marka molekuler juga terkait dengan sifat ketahanan terhadap PYLCV, 57 galur F2 tahan dan 15 galur F2 tidak tahan dianalisis dengan tiga marka polimorfik

(CaBR61, CaB64 dan CaBR98). Elektroforesis hasil PCR dengan ketiga marka polimorfik pada populasi F2 disajikan pada Gambar 4, sedangkan Tabel 5 menunjukkan persentase pewarisan dan rekombinasi alel pada galur-galur generasi F2 yang bersifat tahan dan tidak tahan. Persentase rekombinasi

alel yang dihasilkan oleh ketiga marka tersebut berkisar 21.4%-66.7%. Rekombinasi alel pada galur-galur yang tahan lebih tinggi daripada galur-galur yang tidak tahan. Alel yang terdeteksi oleh CaBR61 menunjukkan peningkatan rekombinasi paling tinggi pada galur-galur yang tahan (50%) dibanding pada galur-galur tidak tahan (21.4%). Alel dari marka CaBR98 menunjukkan rekombinasi terendah, yaitu 50% pada galur tidak tahan dan 63.4% pada galur tahan.

Tingkat polimorfisme ketiga marka pada populasi F2 tahan dan tidak tahan PYLCV disajikan pada Tabel 6. Nilai PIC ketiga marka berkisar antara 0.82 (CaBR61) pada galur tidak tahan dan 0.94 (CaBR64) pada galur tahan. Marka-marka yang memiliki nilai PIC tinggi (>0.70) dikategorikan sebagai marka yang informative (Hildebrand *et al.*, 1992). Namun hasil analisis *Chi-Square* menunjukkan bahwa ketiga marka polimorfik

tersebut tidak mampu membedakan antara populasi F2 tahan dan tidak tahan (Tabel 7). Rasio alel dari setiap marka molekuler yang bersegregasi pada populasi F2 tahan dan tidak tahan memiliki X^2 hitung lebih rendah dari X^2 tabel. Tidak terpautnya marka molekuler dengan sifat ketahanan terhadap PYLCV dapat disebabkan oleh posisi marka dan gen saling berjauhan sehingga frekuensi pewarisan marka/gen pada keturunannya sangat rendah (Reflinur dan Lestari, 2015) dan rekombinasi gen yang dapat menyebabkan keterpautan antara marka dengan gen menjadi hilang (Datta *et al.*, 2011). Oleh karena itu, marka yang ideal untuk pemetaan genetik memiliki beberapa kriteria, yaitu a) tingkat polimorfisme yang tinggi, b) terdistribusi merata dalam genom, c) memberikan resolusi perbedaan genetik yang jelas, d) bersifat kodominan, dan e) netral (Reflinur & Lestari, 2015; Zufahmi, 2013; Datta *et al.*, 2011).



Gambar 4. Contoh pola pita DNA hasil PCR pada gel akrilamid menggunakan tiga jenis primer (CaBR61, CaBR64, dan CaBR98) pada generasi F2 hasil persilangan aksesi IPBC12 dan varietas Yuni (Keterangan gambar: M = DNA ladder 100 bp; 1A...5C = nomor galur F2 cabai hasil persilangan aksesi IPBC12 dan varietas Yuni)

Tabel 5. Persentase pewarisan alel pada generasi F2.

Tanaman F2	Primer	Aksesi IPBC12 x varietas Yuni		
		Persentase alel tetua donor (A), resipien (B), rekombinasi (H)		
		A	B	H
Tidak tahan	CaBR61	42.9	35.7	21.4
	CaBR64	42.9	14.3	42.8
	CaBR98	14.3	35.7	50.0
Tahan	CaBR61	30.0	20.0	50.0
	CaBR64	23.3	10.0	66.7
	CaBR98	13.3	23.3	63.4

Tabel 6. Ringkasan statistik polimorfisme yang diobservasi pada total progeni F2 berdasarkan pita DNA target yang dihasilkan dari tiga marka SSR.

Tanaman F2	Primer	Jumlah alel	Diversitas gen	Heterozigositas	PIC
Tidak tahan	CaBR61	2	0.71	0.69	0.82
	CaBR64	2	0.72	0,8	0.90
	CaBR98	2	0.72	0.85	0.91
Tahan	CaBR61	2	0.87	0.93	0.87
	CaBR64	2	0.87	0.99	0.94
	CaBR98	2	0.87	0.99	0.93

Tabel 7. Hasil analisis *Chi-Square* pada tiga marka SSR yang digunakan untuk diskriminasi galur-galur F2 tahan dan rentan PYLCV

Primer	X ² _{hitung}	X ² _{tabel}	Nilai P _{0,05}
CaBR61	0.078	3.841	0.779
CaBR64	0.169	3.841	0.684
CaBR98	0.543	3.841	0.515

Marka SSR yang digunakan dalam penelitian ini termasuk jenis marka molekuler yang banyak digunakan sebagai penanda genetik pada berbagai organisme. Marka SSR juga sering digunakan sebagai penanda pilihan dalam keterkaitan dan konstruksi peta genetik (El-Rodeny *et al.*, 2014), keragaman genetik dan analisis struktur populasi (Yoon *et al.*, 2012), identifikasi plasma nutfah (Hong *et al.*, 2015), dan pemetaan QTL (Collard dan MacKill, 2008; Varshney *et al.*, 2009).

Penggunaan marka SSR untuk pemetaan sifat ketahanan terhadap PYLCV pada cabai sudah dilaporkan oleh Thakur *et al.* (2020) dengan menguji 685 marka SSR dan memperoleh dua marka yang terpaut dengan gen ketahanan terhadap PYLCV pada jarak genetik masing-masing 6.8 cM dan 8.9 cM dari gen resisten. Mangal *et al.* (2017) juga pernah menggunakan beberapa marka ortolog yang terkait QTL sifat ketahanan terhadap *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) untuk pemetaan gen ketahanan terhadap PYLCV pada cabai, tetapi tidak ada marka yang terpaut. Marka-marka tersebut ketika digunakan untuk pemetaan gen ketahanan terhadap PYLCV pada tetua dan progeni persilangan aksesi IPBC12 dan varietas Yuni ternyata juga tidak bersifat polimorfik. Oleh karena itu, skrining marka masih perlu dilakukan untuk memetakan gen resisten PYLCV pada galur-galur hasil persilangan IPBC12 dan varietas Yuni.

KESIMPULAN

Sebanyak tiga dari 20 marka SSR yang diuji bersifat polimorfik dan mampu membedakan genotipe tetua dan progeni F1 hasil persilangan. Hasil analisis marka polimorfik memastikan bahwa 14 nomor progeni F1 yang diuji merupakan hasil persilangan antara aksesi IPBC12 dan varietas Yuni. Marka CaBR61 yang secara konsisten mampu mendeteksi penurunan alel kedua tetua pada progeni F1 berpotensi sebagai marka seleksi hasil persilangan. Namun ketiga marka polimorfik tersebut tidak menunjukkan keterpautan dengan sifat ketahanan terhadap PYLCV pada populasi F2 cabai yang tahan dan rentan. Oleh karena itu, pemetaan gen ketahanan terhadap PYLCV perlu dilakukan lagi dengan menggunakan jumlah marka yang mencukupi dan tersebar merata dalam genom cabai.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP) dan Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) dengan nomor kontrak 33 /E1/PRN/2020.

DAFTAR PUSTAKA

- Asmono, D., A.R. Purba, Y. Yenni, M. Kobar, H. Zaelani, T. Liwang, A.B. Beng. 2005. Peta dan prospek pemuliaan dalam industry pembenihan kelapa sawit di Indonesia. Simposium Nasional dan Kongres V PERIPI. Puwokerto: Perhimpunan Ilmu Permuliaan Indonesia. Hal 25-27.
- Becher, S.A., K. Steinmetz, K. Weising, S. Boury, D. Peltier, J.P. Renou, G. Kahl, K. Wolff. 2000. Microsatellites for cultivar identification in *Pelargonium*. *Theoretical and Applied Genetics*. 101: 643–651.
- Bredemeijer, M., J. Cooke, W. Ganal, R. Peeters, P. Isaac, Y. Noordijk, S. Rendell, J. Jackson, S. Roder, K. Wendehake, M. Dijcks, M. Amelaine, V. Wickaert, L. Bertrand, B. Vosman. 2002. Construction and testing of a microsatellite containing more than 500 tomato varieties. *Theoretical and Applied Genetics*. 105: 1019-1026.
- Buso, G.S.C., A.M.M. Reis, Z.P.S. Amaral, M.E. Ferreira. 2016. Novel and highly informative *Capsicum* SSR markers and their cross-species transferability. *Genetics and Molecular Research*. 15(3): 1-13. Doi: <http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15038689>
- Rosalia, D., P. Lestari, A. Soegiant, D. Saptadi, A. Sutanto, K. Nugroho, R.T. Terryana, I.M. Tasma, I. Roostika. 2020. Konfirmasi pewarisan alel pada generasi F1 hasil persilangan Calcutta-4 (*Musa acuminata* ssp. *burmannicoides*) dan *Musa acuminata* ssp. *Microcarpa* berdasarkan marka SSR. *J. AgroBiogen*. 16(1): 17–24.
- Dhaliwal, M.S., Yadav, A., Jindal, S.K. 2014. Molecular characterization and diversity analysis in chilli pepper using simple sequence repeats (SSR) markers. *African J. Biotechnol*. 13(31): 3137–3143.
- Direktur Jenderal Hortikultura 2020. Data serangan organisme pengganggu tanaman. <http://ditlin.hortikultura.pertanian.go.id>. diakses 17 November 2020.
- Ganefianti, D.W., S.H. Hidayat, M. Syukur. 2015. Genetic study of resistance to Begomovirus on chili pepper by Hayman's diallel analysis. *Intl. J. on Advanc. Sci*. 5(6): 426-432.
- Ganefianti, D.W., S. Sujiprihati, S.H. Hidayat, M. Syukur. 2008. Metode penularan dan uji ketahanan genotipe cabai terhadap *Begomovirus*. *Akta Agrosia*. 11(2): 162– 169.
- Gersten, D.M., K.E. Bijwaard. 1992. Polyacrylamide gel electrophoresis in vertical, inverse and double-crossing gradients of soluble polymers. *Electrophoresis*. 13(5): 282–286.
- Hidayat, S.H., E.S. Rusli, N. Aidawati. 1999. Penggunaan primer universal dalam *polymerase chain reaction* untuk mendeteksi virus gemini pada cabe. *Di dalam: Prosiding Kongres Nasional XV dan Seminar Ilmiah Perhimpunan Fitopatologi Indonesia*. Purwokerto. 16-18 September 1999. pp. 355-359
- Hildebrand, C.E., D. Torney, R.P. Wagner. 1992. Informativeness of polymorphic DNA markers. *Los Alamos Sci*. 17 (3): 233–238.
- Iswari, K., Srimaryati, 2014. Pengaruh giberelin dan jenis kemasan untuk menekan susut cabai kopay selama pengangkutan jarak jauh. *J. Pascapanen* 11(2): 89 – 100.
- Khanh, T.D., T.Q. Anh, B.C. Buu, T.D. Xuan. 2013. Applying molecular breeding to improve soybean rust resistance in Vietnamese elite soybean. *American J. Plant Sci*. 4:1-6.

- Li, Y.C., Korol, A.B., Fahima, T., Beiles, A., Nevo, E. 2002. Micro satellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol Ecol.* 11: 2453–2465.
- Lowe, A., Haris, S., Ashton, P., 2004. *Ecological Genetics: Design, Analysis, and Application.* Blacwell Publishing. United Kingdom.
- Mandal, R., S. Nag, J. Tarafdar, S. Mitra. 2016. A comparison of efficiency parameters of SSR markers and genetic diversity analysis in *Amaorphophallus paenifolius* (Dennst.) Nicolson. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 59: 1-16.
- Mangal, M., A. Srivastava, R. Sharma, P. Kalia. 2017. Conservation and dispersion of genes conferring resistance to tomato begomoviruses between tomato and pepper genomes. *Frontiers in Plant Sci.* 8(1): 1-10. Doi: 10.3389/fpls.2017.01803
- Megia, R., N.R. Djuita. 2010. Deteksi integritas genomik pisang hasil iradiasi in vitro berdasarkan penanda mikrosatelit. *Makara Sains.* 14 :151-157.
- Nugroho, K., R.T. Terryana, Reflinur, P. Lestari. 2017. Keragaman genetik dua puluh aksesori plasma nutfah *Jatropha* spp. menggunakan marka *simple sequence repeat*. *J. AgroBiogen.* 13(1): 17–24.
- Reflinur, P. Lestari. 2015. Penentuan lokus gen dalam kromosom tanaman dengan bantuan marka DNA. *J. Litbang Pertanian.* 34(4): 177-186.
- Sharmin, A., Md.E. Hoque, Md.M. Haque, F. Khatun. 2018. Molecular diversity analysis of some chilli (*Capsicum* spp.) genotypes using SSR markers. *American J. Plant Sci.* 9: 368–379.
- Sulandari, S., R. Suseno, S.H. Hidayat, J. Harjosudarmo, S. Sosromarsono. 2006. Deteksi dan kajian kisaran inang virus penyebab penyakit daun keriting kuning cabai. *Hayati.* 1(13): 1–6.
- Tennyana, R.T., K. Nugroho, H. Rijzaani, P. Lestari. 2018. Karakterisasi keragaman genetik 27 genotipe cabai berdasarkan marka *ssr (simple sequence repeat)*. *Berita Biologi* 17(2). Doi: 10.14203/beritabiologi.v17i2.3313.
- Thakur, H., S.K. Jindal, A. Sharma, M.S. Dhaliwal. 2019. A monogenic dominant resistance for leaf curl virus disease in chilli pepper (*Capsicum annuum* L.). *Crop Prot.* 116:115–120.
- Thakur, H., S.K. Jindal, A. Sharma, M.S. Dhaliwal. 2020. Molecular mapping of dominant gene responsible for leaf curl virus resistance in chilli pepper (*Capsicum annuum* L.). *Biotech.* 10(182): 1-10. Doi: <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02168-7>
- Wartono, S. Wiyono, M. Syukur, Giyanto, K. Nugroho, P. Lestari. 2019. Analisis keragaman genetik 41 genotipe cabai (*Capsicum annuum* L.) berdasarkan marka SSR. *J. AgroBiogen.* 15(2): 65–74.
- Ved, P.R., R. Kumar, S. Kumar, A. Rai, S. Kumar, M. Singh, S.P. Singh, A.B. Rai, R. Paliwal., 2013. Genetic diversity in *Capsicum* germplasm based on microsatellite and random amplified microsatellite polymorphism markers. *Physiology and Molecular Biology of Plants.* 19(4): 575–586.
- Yan, W., Maoying, Y., Wenyu, Y., Weiguo, L., Taiwen, Y., 2011. Multivariate analysis on isoflavone content for soybean land races in sichuan basin. *J. Animal and Plant Sciences.* 11: 1380–1393.