

STRATEGI PENYIAPAN POPULASI PADA IDENTIFIKASI *QUANTITATIVE TRAIT LOCI* YANG TERKAIT PENYAKIT GUGUR DAUN *CORYNESPORA* PADA TANAMAN KARET

Fetrina Oktavia^{1*}

¹Balai Penelitian Sembawa, Pusat Penelitian Karet, Jl. Raya Palembang – Betung
Km 29 Palembang PO BOX 1127, Tlp 0711 7439493, fax 0711 7439282

*Penulis untuk korespondensi: fetrina_oktavia@yahoo.com

ABSTRACT

The availability of segregated populations is an important component in the success of genetic mapping studies and QTL identification. This is a major problem on rubber plants and other annual crops due to the length of the life cycle resulting in difficulties to obtain progeny. This study reports the strategy to prepare of population for QTL studies associated with *Corynespora* leaf fall disease (CLFD) in rubber plants. Some populations that can be prepared are F2 population selected through pedigree of parent clones and F1 *pseudotestcross* population from controlled crosses of parents clones having contrasting characters. Base on the pedigree was selected clone of PR 107 (resistant) x TJIR 1 (susceptible) which obtain F1 PR 255 clone (resistant). 72 plants of 113 PR 255 seeds were used as a F2 population. Parental analysis using SSR markers is used to ensure that F2 seeds are selfing. The analysis showed that only 58% of the F2 plants obtained are selfing of PR 255. Preparation of the F1 *pseudotestcross* population is generated through several crossing combinations of BPM 1 x RRIM 600, PB 260 x Tjir 1 and RRIC 100 x RRIM where the female parents are resistant clone and male parents are susceptible clone to CLFD. The highest percentage of successful crosses was found in a combination of BPM 1 x RRIM 600, followed by PB 260 x Tjir 1 and RRIC 100 x RRIM 600 with crossed success of 0.005%, 0.004% and 0.001%, respectively. Based on the number individual in population availability can be selected the population will be used in the construction of the genetic map for QTL identification linked to CLFD resistance.

Keywords: CLFD, *Corynespora cassiicola*, genetic map, *Hevea brasiliensis*, QTL

ABSTRAK

Ketersediaan populasi bersegregasi merupakan salah satu komponen penting dalam keberhasilan studi pemetaan genetik dan identifikasi QTL. Hal ini menjadi permasalahan utama pada tanaman karet dan tanaman tahunan lainnya karena lamanya siklus hidup sehingga kesulitan dalam menghasilkan turunan. Penelitian ini melaporkan strategi persiapan populasi yang dapat dilakukan untuk studi identifikasi QTL yang terkait dengan penyakit gugur daun *Corynespora* (PGDC) pada tanaman karet. Beberapa populasi yang dapat disiapkan yaitu populasi F2 yang dipilih melalui penelusuran silsilah klon tetua dan populasi F1 *pseudotestcross* hasil persilangan terkontrol dari pasangan tetua yang memiliki karakter kontras. Melalui penelusuran silsilah dipilih klon tetua PR 107 (tahan) dengan TJIR1 (rentan) yang menghasilkan F1 PR 255 (tahan). Dari 113 biji PR

255 diperoleh 72 tanaman polybag yang digunakan sebagai populasi F2. Analisis tetua menggunakan marka SSR digunakan untuk memastikan bahwa biji F2 adalah selfing. Hasil menunjukkan bahwa hanya 58% tanaman F2 yang diperoleh yang merupakan selfing PR 255. Penyiapan populasi F1 *pseudotestcross* dihasilkan melalui beberapa kombinasi persilangan yaitu BPM 1 x RRIM 600, PB 260 x Tjir 1 dan RRIC 100 x RRIM dimana tetua betina adalah klon tahan dan tetua jantan adalah klon rentan terhadap PGDC. Persentase tertinggi keberhasilan persilangan ditemukan pada kombinasi persilangan BPM 1 x RRIM 600, diikuti oleh PB 260 x Tjir 1 dan RRIC 100 x RRIM 600 dengan keberhasilan persilangan 0,005%, 0,004% dan 0,001%. Berdasarkan jumlah populasi yang tersedia dapat dilakukan pemilihan populasi yang akan digunakan dalam penyusunan peta genetik untuk identifikasi QTL yang terkait dengan ketahanan terhadap PGDC.

Kata kunci: *Corynespora cassiicola*, *Hevea brasiliensis*, peta genetik, PGDC, QTL

PENDAHULUAN

Salah satu kendala utama dalam program pemuliaan tanaman karet (*Hevea brasiliensis*) untuk menghasilkan klon-klon unggul baru adalah lamanya waktu yang dibutuhkan untuk proses seleksi. Hal ini karena tanaman karet merupakan tanaman tahunan dengan siklus hidup yang panjang. Salah satu alternatif untuk mengatasi permasalahan tersebut adalah dengan memanfaatkan kemajuan di bidang biologi molekuler, yaitu *Marker Assisted Selection* (MAS). Untuk mendapatkan MAS yang tepat dan akurat maka diperlukan informasi dan ketersediaan peta pautan genetik (Lee, 1995). Identifikasi lokus-lokus yang terkait dengan suatu karakter kuantitatif atau Quantitative Trait Loci (QTL) dapat dilakukan apabila sudah diperoleh peta pautan genetik yang bisa mencerminkan kondisi genom dari suatu tanaman.

Berbagai studi genetik terutama yang terkait dengan identifikasi dan pemetaan QTL berbagai karakter agronomis penting sudah banyak dilaporkan. Identifikasi QTL yang merupakan bagian genom atau beberapa gen yang mempengaruhi ekspresi suatu karakter fenotipik dilakukan berdasarkan prinsip adanya keterkaitan antara karakter tersebut dengan marka genetik. Informasi yang diperoleh dari analisis QTL tersebut dapat digunakan untuk mempercepat proses seleksi dengan bantuan marka molekuler (Veerasha *et al.*, 2015), di mana seleksi dapat dilakukan ditahap awal pertumbuhan tanaman dan hasil seleksi bebas dari pengaruh faktor lingkungan.

Ketersediaan populasi bersegregasi yang tepat dan sesuai dengan tujuan yang ingin dicapai merupakan komponen utama terpenting dalam keberhasilan studi pemetaan dan identifikasi QTL serta studi genetik lainnya. Berbagai jenis populasi hasil persilangan yang dapat digunakan dalam penyusunan peta genetik yaitu populasi turunan kedua (F2), *backcross* (BC), *recombinant inbred line* (RIL), *double haploid* (DH) dan *near isogenic line* (NIL). Setiap populasi memiliki kelebihan dan kelemahan masing-masing sehingga perlu berbagai pertimbangan dalam pemilihan jenis populasi yang sesuai dengan tujuan dan ketersediaan sarana dan prasarana (Collard *et al.*, 2005; Semagn *et al.*, 2006). Menurut Haley dan Anderson (1997) penggunaan populasi F2 lebih *powerful* dalam mendeteksi QTL dengan efek aditif dan dapat digunakan untuk memperkirakan tingkat

dominansi dari QTL yang terdeteksi. Selain itu popuasi F2 juga lebih sederhana dalam proses penyiapannya (Collard *et al.* 2005).

Semua populasi tersebut dapat dihasilkan pada tanaman semusim dan menyerbuk sendiri dari tetua yang keduanya homozigot. Namun pada tanaman tahunan yang memiliki siklus hidup yang panjang, penyiapan semua jenis populasi tersebut cukup sulit dilakukan (Vinod, 2009). Berbagai alternatif strategi yang dapat dilakukan adalah menggunakan populasi F2 dengan penelusuran silsilah tetua atau populasi F1 *pseudotestcross* dari persilangan terkontrol. Populasi pseudo-testcross adalah populasi F1 yang memiliki konstitusi genetik seperti populasi testcross yang dihasilkan dari hasil persilangan terkontrol dari dua tetua heterozigot dan memiliki karakter yang kontras (Grattapaglia & Sederoff, 1994). Penggunaan populasi pseudo-testcross tersebut sudah berhasil digunakan dalam penyusunan peta genetik pada tanaman Eucalyptus (Grattapaglia & Sederoff 1994; Brondani *et al.*, 2006), kopi (Paillard *et al.*, 1996), teh (Hackett *et al.*, 2000), coklat (Risterucci *et al.*, 2000), chestnut (Casasoli *et al.*, 2001), apel (N'Diaye *et al.*, 2008; Le Roux *et al.*, 2010), singkong (Hadi & Hartana; Kunkeaw *et al.*, 2011) dan pada tanaman karet (Seguin *et al.*, 1997; Lespinasse *et al.*, 2000; Le Guen *et al.*, 2003; Le-Guen *et al.*, 2007; Rattanawong *et al.*, 2009; Novalina & Sagala 2013). Artikel ini melaporkan strategi penyiapan populasi bersegregasi yang dapat dilakukan untuk studi genetik identifikasi QTL (*Quantitativ Trait Loci*) yang terkait dengan ketahanan terhadap penyakit gugur daun *Corynespora* (PGDC) pada tanaman karet.

BAHAN DAN METODE

Penyiapan populasi dilakukan melalui dua pendekatan yaitu populasi F1 *pseudotestcross* melalui persilangan terkontrol dan populasi F2 melalui pengumpulan biji berdasarkan penelusuran silsilah klon tetua dan.

Penyiapan Populasi F1 melalui Persilangan Buatan

Persilangan buatan untuk menghasilkan populasi F1 *pseudotestcross* dilakukan menggunakan tiga pasangan tetua yaitu PB 260 x Tjir 1, BPM 1 x RRIM 600, RRIC 100 x RRIM 600 dan BPM 24 x RRIM 600. Pemilihan tetua dilakukan berdasarkan sifat ketahanan yang kontras dimana klon-klon yang digunakan sebagai tetua betina (PB 260, BPM 1, RRIC 100 dan BPM 24) adalah klon-klon yang tergolong sangat tahan terhadap PGDC, dan klon-klon yang dipilih sebagai tetua jantan (Tjir 1 dan RRIM 600) adalah klon-klon yang tergolong sangat rentan terhadap PGDC. Selain sifat kontras, pertimbangan lain adalah jarak genetik antar klon, di mana berdasarkan silsilah tetua (Tabel 1) dan analisis genetik (Oktavia *et al.*, 2011) diketahui bahwa klon-klon yang disilangkan memiliki hubungan kekerabatan yang jauh.

Tabel 1. Daftar tetua klon-klon yang digunakan dalam persilangan

No	Klon	Tetua
1	PB 260	PB 5/51 x PB 49
2	Tjir 1	Klon primer
3	BPM 1	AVROS 163 x AVROS 308
4	RRIM 600	Tjir 1 x PB 86
5	RRIC 100	RRIC 42 x PB 85
6	BPM 24	GT 1 x AVROS 1734

Persilangan buatan dilakukan pada bunga betina dari 50 pohon masing-masing klon tetua betina dengan sumber serbuk sari yang diambil dari 50 pohon klon tetua jantan yang terdapat pada kebun persilangan yang dibangun dengan cara pemendekan. Persilangan buatan dilakukan berdasarkan SOP persilangan tanaman karet. Tingkat keberhasilan persilangan dihitung berdasarkan persentase buah yang terbentuk dibandingkan jumlah persilangan yang dilakukan. Biji yang dihasilkan disemai di pembibitan dan biji yang berkecambah dibiarkan tumbuh sekitar satu bulan di bak perkecambahan untuk selanjutnya dipindah serta ditumbuhkan di dalam polybag.

Penyiapan Populasi F2

Pemilihan klon tetua dilakukan berdasarkan perbedaan sifat ketahanan terhadap PGDC. Berdasarkan penelusuran silsilah dan informasi tingkat ketahanan terhadap PGDC (Hadi dan Hartana 2004), dipilih tetua klon PR 107 (tahan) dan Tjir 1 (rentan) yang menghasilkan F1 klon PR 255 (tahan). Tanaman F2 dihasilkan dengan mengumpulkan biji dari klon PR 255. Pengumpulan biji yang berasal dari buah tua yang dipanen secara langsung dari pohon dilakukan pada areal pertanaman klon PR 255 di kebun produksi PT. Pinago, Banyuasin Sumatera Selatan pada musim buah tahun 2013. Biji yang diperoleh di semai dan bibit yang tumbuh di tanam dalam polybag.

Untuk memastikan apakah biji yang dikoleksi adalah benar hasil selfing atau hasil dari persilangan terbuka maka dilakukan analisis tetua (*parental analysis*) melalui analisis molekuler menggunakan 2 primer SSR yang bersifat polimorfik. Analisis dilakukan pada DNA F2 yang berasal dari biji PR 255, PR 255 sebagai tetua betina sumber biji dan beberapa klon yang terdapat disekitar areal pengumpulan biji yaitu klon GT 1, PB 260 dan BPM 24 yang diduga dapat merupakan sumber polen atau jantan. Analisis tetua dilakukan secara visual berdasarkan pola pewarisan alel yang dihasilkan pada masing-masing tanaman F2. Tanaman yang memiliki pola pewarisan alel dari tetua klon PR 255 merupakan tanaman yang berasal dari selfing dan dapat digunakan sebagai populasi dalam pemetaan genetik sedangkan tanaman F2 yang memiliki pola pewarisan alel bukan dari PR 255 merupakan biji hasil silang luar sehingga tidak dapat digunakan untuk analisis selanjutnya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penyiapan Populasi F1 *Pseudotestcross* Melalui Persilangan Terkontrol

Untuk menghasilkan populasi bersegregasi yang akan digunakan dalam identifikasi QTL yang terpaut ketahanan tanaman karet terhadap PGDC telah dilakukan persilangan terkontrol terhadap 3 pasangan klon tetua yaitu PB 260 x Tjir 1, BPM 1 x RRIM 600 dan RRIC 100 x RRIM 600. Berdasarkan persilangan buatan klon tetua BPM 1 dan RRIM 600 yang dilakukan dari tahun 2013–2015 terlihat bahwa persentase buah jadi yang dihasilkan pada masing-masing kombinasi persilangan berbeda dimana persentase tertinggi dihasilkan dari kombinasi persilangan BPM 1 x RRIM 600 sebesar 1.92% yang diikuti oleh kombinasi persilangan PB 260 x Tjir 1 sebesar 0.03%, dan terendah dari kombinasi RRIC 100 x RRIM 600 sebesar 0.57% (Tabel 2). Persentase keberhasilan ini masih lebih rendah jika dibandingkan dengan rata-rata tingkat keberhasilan persilangan buatan tanaman karet secara umum yaitu 3.2%

(Woelan & Tistama, 2006). Rendahnya persentase keberhasilan persilangan ini dapat disebabkan oleh berbagai macam faktor baik yang terkait dengan genetik tanaman maupun kondisi iklim dan lingkungan.

Tabel 2. Tingkat keberhasilan persilangan pada 3 kombinasi tetua persilangan selama periode persilangan 2013-2015

Kombinasi persilangan	Jumlah persilangan	Jumlah buah terbentuk	Keberhasilan persilangan (%)
PB 260 x Tjir 1	30643	926	0.03
BPM 1 x RRIC 600	6031	116	1.92
RRIC 100 x RRIC 600	15004	85	0.57

Secara umum program persilangan buatan pada tanaman karet menghadapi berbagai kendala baik yang terjadi pada tahap awal sebelum dilakukannya persilangan maupun setelah persilangan. Sebelum proses persilangan, hambatan dan kendala utama adalah terkait dengan ketersediaan bunga yang akan disilangkan, dimana waktu pembungaan antar klon penghasil bunga betina tidak serentak dengan klon penghasil bunga jantan sehingga persilangan sulit untuk dilakukan. Keterbatasan ketersediaan bunga juga dipengaruhi oleh waktu musim bunga yang hanya terjadi dua kali dalam setahun. Berbagai upaya yang sudah dilakukan untuk meningkatkan ketersediaan bunga yaitu pemotongan tunas ortotrop dan penyemprotan hormon auksin IAA (*Indol Acetic Acid*) untuk menginduksi pembungaan serta penyimpanan polen (*cryopreservation*) yang akan digunakan pada saat bunga betina tersedia.

Serbuk sari bunga jantan memegang peranan yang cukup penting dalam hibridisasi. Beberapa aspek serbuk sari yang menentukan keberhasilan persilangan adalah jumlah dan viabilitas serbuk sari yang jatuh dikepala putik. Menurut Woelan dan Tistama (2006) jumlah serbuk sari dalam satu bunga jantan diduga ada kemungkinan kurang mencukupi untuk menyerbuki satu bunga betina karena ada kemungkinan serbuk sari sudah terlepas dari tangkai sari sebelum dilakukannya persilangan. Meskipun jumlah serbuk sari mencukupi, namun terkadang serbuk sari tersebut tidak mampu membuahi kepala putik (tidak viabel) (Esekhade *et al.*, 1996) dan pembuahan baru akan berhasil apabila viabilitas serbuk sari diatas 50% (Harihar *et al.*, 1984). Selain itu ketersediaan bunga juga dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti iklim, curah hujan dan serangan penyakit terutama oidium (Esekhade *et al.*, 1996) yang dapat menyebabkan bunga gugur sebelum dilakukan persilangan seperti yang pernah terjadi pada musim bunga tahun 2014. Dibandingkan tahun-tahun sebelumnya, jumlah bunga yang dapat disilangkan menurun drastis pada tahun 2014. Pada musim bunga besar pada bulan September–Desember terjadi pada saat curah hujan cukup tinggi dan kelembaban udara tinggi sehingga bunga yang terbentuk banyak mengalami keguguran. Hal-hal yang terkait dengan keterbatasan ketersediaan dan kondisi bunga tersebut seringkali menghambat program-program persilangan yang sudah direncanakan.

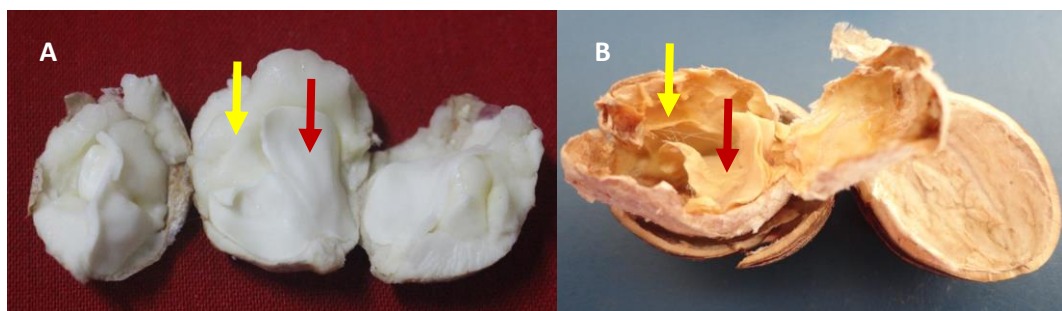
Setelah proses hibridisasi, kegagalan persilangan dapat disebabkan karena tidak terjadinya pembuahan yang ditandai dengan layu dan gugurnya bunga, pembuahan terjadi namun tidak berkembangnya bunga setelah disilangkan, gugurnya putik yang terbentuk, matinya buah muda yang dihasilkan dan tidak berkecambahnya biji yang diperoleh. Hal ini dapat terjadi karena pengaruh berbagai faktor seperti genetik yang terlihat dari perbedaan kompatibilitas dari

pasangan klon yang disilangkan, faktor fisiologis terutama disebabkan oleh kandungan hormon tumbuh seperti kekurangan auksin dalam endosperm yang dapat mengakibatkan gugurnya buah sebelum matang serta faktor iklim dan curah hujan yang sering mengakibatkan terjadinya serangan penyakit *Oidium* pada buah (Woelan & Azwar, 1996).

Pemanenan hasil persilangan dilakukan dengan cara mengumpulkan biji-biji yang berasal dari buah-buah yang sudah matang secara fisiologis yang ditandai dengan warna buah berubah coklat dan kering, serta buah mengalami keretakan dan pecah sendiri. Secara umum pematangan buah terjadi pada bulan ke 5 setelah persilangan. Tabel 3 menunjukkan persentase keberhasilan perkecambahan biji di persemaian dari tiga kombinasi persilangan dimana persentase tertinggi ditemukan pada biji-biji hasil persilangan BPM 1 x RRIM 600 yaitu sebesar 9.77%. Hasil ini menunjukkan bahwa tingkat keberhasilan perkecambahan yang diperoleh masih rendah. Menurut Woelan dan Radite (2006), keberhasilan proses persilangan tidak hanya ditentukan pada saat pemanenan buah, namun juga pada tahap perkecambahan biji menjadi tanaman. Meskipun mampu menghasilkan buah yang matang secara fisiologis, namun biji yang dihasilkan tidak selalu mampu berkecambah. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh tidak berkembangnya embrio akibat kurangnya ketersediaan air pada endosperm yang merupakan sumber makanan bagi embrio sehingga biji mengalami dehidrasi. Hal ini ditandai dengan mengeringnya endosperm dan embrio ketika biji dibelah (Gambar 1).

Tabel 3. Tingkat keberhasilan perkecambahan biji hasil persilangan 3 kombinasi tetua selama periode persilangan 2013-2015

Kombinasi persilangan	Jumlah biji yang disemai	Jumlah biji berkecambah	Keberhasilan perkecambahan (%)
PB 260 x Tjir 1	2778	120	4,32
BPM 1 x RRIM 600	348	34	9,77
RRIC 100 x RRIM 600	255	19	7,45



Gambar 1. Perbandingan biji segar (A) dengan yang sudah kering (B).
 Tanda panah merah menunjukkan embrio, tanda panah kuning menunjukkan endosperm

Biji karet tergolong biji yang bersifat rekalsitran, dimana pada saat tahapan matang fisiologis biji memiliki kandungan air yang tinggi yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkecambahan embrio. Matang fisiologis tersebut merupakan tahap perkembangan dimana berat kering buah sudah mencapai maksimum dan adanya tanda-tanda waktu pengisian biji berakhir. Penentuan puncak matang fisiologis pada berbagai spesies berbeda-beda, seperti pada *Hopea hainanensis*

(Lan *et al.*, 2007) dan *Artocarpus heterophyllus* (Chaudhury & Malik, 2004). Matang fisiologis dapat ditentukan dengan menghitung jumlah hari setelah anthesis atau pembungaan, sedangkan pada *Jatropha curcas* (Dranski Jr. *et al.*, 2010) dan kacang (Silva *et al.*, 2012) matang fisiologis ditentukan dengan melihat perubahan warna buah secara visual. Perubahan warna tersebut juga digunakan pada biji karet, dimana biji yang matang secara fisiologis secara umum ditandai dengan terjadinya perubahan warna buah dari hijau menjadi coklat, buah menjadi kering, retak dan pecah dengan sendirinya (Mydin & Saraswathamma, 2005). Namun menurut Duang-iat *et al.* (2013), matang fisiologis pada biji karet terjadi pada saat buah berwarna coklat namun belum retak dan pecah serta pada saat buah berwarna hijau kekuningan. Hal ini dilihat dari persentase dan kecepatan perkecambahan, berat dan panjang kecambah serta konduktivitas listriknya. Kedua tahap perkembangan buah diatas sama-sama memberikan hasil yang sama, hanya pada saat buah berwarna hijau kekuningan, kecambah yang dihasilkan kurang vigor dibanding kecambah yang diperoleh dari buah yang berwarna coklat. Vigoritas embrio tersebut sangat tergantung kematangan dan kandungan air biji (Lan *et al.*, 2007). Apabila pemanenan biji dilakukan pada saat buah sudah coklat dan pecah, maka tingkat kelembaban biji atau kandungan air sudah menurun sekitar 12.37% dibanding kondisi sebelum buah pecah, sehingga daya tumbuh biji juga akan berkurang dan daya simpannya semakin pendek. Berdasarkan hal tersebut pemanenan buah pada saat buah mulai berwarna coklat dan pemecahan buah untuk mengeluarkan biji secara manual perlu dipertimbangkan untuk dilakukan guna meningkatkan persentase perkecambahan biji terutama biji-biji hasil persilangan buatan yang dilakukan untuk pengembangan klon-klon unggul baru maupun untuk tujuan studi genetik.

Pola Segregasi Populasi F1

Hal terpenting yang harus dilakukan untuk mendapatkan populasi F1 yang memiliki pola segregasi seperti populasi backcross/testcross adalah seleksi marka molekuler yang akan digunakan. Seleksi terdiri dari dua tahap yaitu seleksi primer pada kedua tetua yang digunakan untuk menghasilkan populasi dan seleksi pola segregasi 1:1 pada seluruh populasi yang akan dianalisis. Pada marka kodominan seperti mikrosatelit yang dapat membedakan heterozigositas tanaman, marka yang dapat dipilih pada seleksi tahap pertama adalah marka yang heterozigot pada tetua donor dan homozigot pada tetua resipient atau heterozigot pada kedua tetua namun ukuran salah satu alel berbeda.

	Marker Kodominan								Marker Dominan								
	P1	P2	F1	P1	P2	F1.1	F1.2	P1	P2	F1.1	F1.2	F1.3	F1.3	P1	P2	F1.1	F1.2
Alel	—		—	—		—		—	—	—	—			—		—	
Genotipe	AA	aa	Aa	Aa	aa	Aa	aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	aa	A-	aa	A-	aa
Skoring	a	b	h	h	a	h	a	h	a	h	h	a	a	a	b	a	b
	Populasi A			Populasi B				Populasi C				Populasi D					

Gambar 2. Pola segregasi alel gel elektroforesis populasi F1 pada tanaman tahunan untuk marka kodominan (populasi A, B dan C) serta marka dominan (populasi D)

Marka terpilih selanjutnya digunakan untuk mengamplifikasi seluruh populasi F1 yang akan dianalisis. Seleksi tahap kedua adalah seleksi marka yang memiliki rasio segregasi 1:1. Sedangkan pada marka dominan seperti RAPD, seleksi marka adalah berdasarkan polimorfisme marka pada kedua tetua. Gambar 2 menunjukkan pola pewarisan segregasi pada populasi F1. Pada tanaman tahunan, populasi yang mungkin dihasilkan adalah populasi B dan C, dimana segregasi alel F1 pada populasi tersebut mengikuti pola pada populasi *backcross*.

Penyiapan Populasi F2

Pengumpulan biji F2 pada klon tetua pada penggunaan populasi pemetaan berdasarkan penelusuran silsilah memerlukan informasi waktu pembungaan dan pembentukan biji dari masing-masing klon. Survei waktu pembungaan klon-klon karet menunjukkan bahwa pembungaan pada klon PR 255 sudah dimulai dari bulan Agustus 2011. Namun bunga-bunga yang terbentuk banyak yang tidak berkembang membentuk buah karena gugur akibat curah hujan yang cukup tinggi. Pengaruh curah hujan dan faktor iklim lainnya terhadap pembungaan dan pembentukan buah jadi pada tanaman karet telah dilaporkan oleh (Soman *et al.*, 1996) dan (Woelan, 2006).

Pohon yang dipilih sebagai sumber biji adalah pohon pada lokasi pertanaman klon PR 255 minimal 9 ha dan memiliki jarak minimal 100 m dari klon lain (Hadi *et al.*, 2004). Dari 50 ha pertanaman klon PR 255 tahun tanam 1992, cukup sulit menemukan lokasi pada jarak 100 m yang murni adalah klon PR 255. Secara umum klon PR 255 tercampur dengan klon lain seperti GT 1, PB 260 dan BPM 24. Namun setelah ditelusuri ditemukan satu areal pertanaman PR 255 yang tidak terlalu tercampur dengan klon lain dan beberapa pohon klon PR 255 yang terpisah jauh dari klon-klon lain. Pohon tersebut selanjutnya dijadikan sebagai sumber biji klon PR 255 dan pengambilan buah dilakukan dengan cara mengambil buah matang langsung dari pohon. Dari 113 biji yang disemai diperoleh 72 tanaman polybag. Jumlah tersebut sudah dapat digunakan sebagai populasi pemetaan, karena dalam studi awal pemetaan genetik dapat menggunakan 50-250 individu populasi (Mohan *et al.*, 1997), namun semakin besar jumlah populasi akan semakin akurat peta genetik yang dihasilkan dimana tingkat akurasi rata-rata dengan total 200 individu untuk semua tipe populasi (Ferreira *et al.*, 2006).

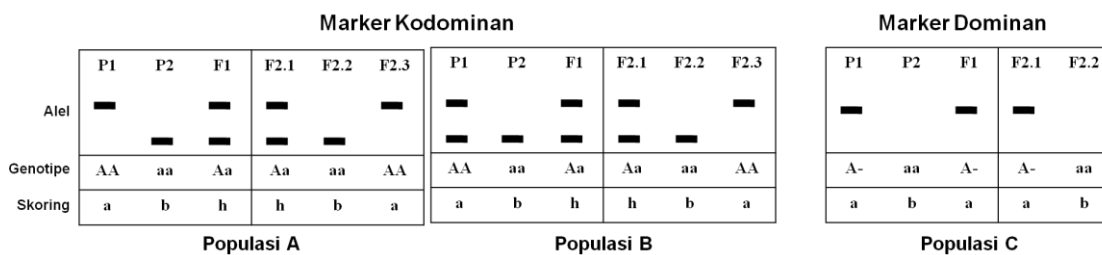
Penggunaan populasi F2 yang berasal dari biji klon PR 255 yang merupakan turunan dari PR 107 x Tjir 1 sebagai populasi pemetaan genetik yang terkait dengan PGDC menggunakan marka dominan RAPD sudah dilaporkan oleh (Hadi & Hartana, 2004). Meskipun menggunakan populasi F2 bersegregasi, namun tidak dilakukan analisis tetua yang memastikan bahwa biji tersebut berasal dari selfing PR 255, sehingga kemungkinan bahwa biji hasil dari penyerbukan klon-klon lain yang ada disekitar pertanaman klon PR 255 besar kemungkinan terjadi. Selain itu pengumpulan biji dilakukan terhadap biji yang sudah pecah secara alami dengan cara mengidentifikasi biji secara morfologi, sehingga kemungkinan kesalahan dalam mengkoleksi biji dapat terjadi. Karena itu untuk memastikan bahwa biji yang diperoleh adalah berasal dari selfing klon PR 255, maka perlu dilakukan analisis tetua dengan menggunakan marka molekuler. Analisis dilakukan pada setiap tanaman F2 yang berasal dari biji PR 255, klon PR 255 sebagai tetua betina dan klon, GT 1, PB 260 dan BPM 24 yang diduga sebagai tetua jantan dengan menggunakan 2 marker SSR yang

polimorfik. Dari 72 tanaman F2 yang diuji terlihat bahwa hanya 58% tanaman yang berasal dari selfing PR 255. Rendahnya persentase selfing ini kemungkinan disebabkan oleh tanaman karet yang bersifat menyerbuk silang (Priyadarshan, 2011) dimana rata-rata persentase penyerbukan silang pada tanaman karet sebesar 79% dan selfing sebesar 21% (Pawsoi *et al.*, 2013). Meskipun pohon induk klon PR 255 sudah dipilih pada areal yang terpisah dari klon lain dan biji sudah dikoleksi langsung dari pohon induk, namun tingkat persilangan luar masih tinggi. Hal ini dapat terjadi karena penyebaran serbuk sari tanaman karet yang dapat mencapai 1.1 km (Yeang & Chevallier, 1999). Tanaman hasil selfing selanjutnya dapat digunakan sebagai populasi untuk pemetaan genetik.

Pemilihan jenis dan jumlah populasi serta jenis dan jumlah marka molekuler yang digunakan sangat menentukan keakuratan QTL yang dihasilkan (Doerge, 2002; Ferreira *et al.*, 2006). Populasi F2 jarang digunakan untuk studi genetik pada tanaman tahunan karena lamanya siklus hidup tanaman sehingga kesulitan dalam penyiapan populasi. Pemilihan populasi yang sudah ada berdasarkan silsilah juga seringkali sulit dilakukan karena keterbatasan karakter yang dipelajari yang dimiliki oleh tetua tidak bersifat kontras. Pemilihan jenis dan jumlah marka yang akan digunakan akan memberikan hasil dan interpretasi yang berbeda juga.

Pola Segregasi Populasi F2

Gambar 3 menunjukkan perbedaan pola segregasi alel populasi F2 pada gel elektroforesis untuk marka kodominan dan marka dominan. Penggunaan marka kodominan dapat menunjukkan heterozigositas suatu individu, dimana individu yang dipilih sebagai tetua adalah individu homozigot (populasi A). Pada tanaman tahunan hal ini akan sulit dilakukan, sehingga pemilihan tetua heterozigot untuk karakter yang dituju dapat dilakukan, namun F1 yang dipilih untuk menghasilkan F2 harus yang heterozigot (populasi B), sedangkan yang homozigot tidak dapat digunakan. Sebaliknya pada marka dominan, heterozigositas individu tetua tidak dapat ditentukan, sehingga seringkali tidak bersifat *reproducible* dan marka tidak diturunkan bersamaan dengan karakter yang dituju (Arcade *et al.*, 2000).



Gambar 3. Pola segregasi alel gel elektroforesis populasi F2 pada tanaman tahunan untuk marka kodominan (populasi A dan B) serta marka dominan (populasi C)

KESIMPULAN

Beberapa strategi yang dapat digunakan dalam penyiapan populasi pada studi genetik yang terkait dengan ketahanan tanaman karet terhadap PGDC yaitu penyiapan populasi F1 *pseudotestcross* dan populasi F2. Rendahnya tingkat keberhasilan persilangan pada tanaman karet untuk menghasilkan tanaan F1

perlu diantisipasi dengan memperbanyak kombinasi tetua persilangan dan jumlah persilangan dari asing-masing kombinasi. Dari tiga kobinasi persilangan yang digunakan, persentase tertinggi keberhasilan persilangan ditemukan pada kombinasi persilangan BPM 1 x RRIM 600, diikuti oleh PB 260 x Tjir 1 dan RRIC 100 x RRIM 600 dengan keberhasilan persilangan 0.005%, 0.004% dan 0.001%. Dari 113 biji PR 255 diperoleh 72 tanaman polybag yang digunakan sebagai populasi F2. Analisis tetua menggunakan marka SSR digunakan untuk memastikan bahwa biji F2 adalah selfing. Hasil menunjukkan bahwa hanya 58% tanaman F2 yang diperoleh yang merupakan selfing PR 255.

DAFTAR PUSTAKA

- Arcade, A., F. Anselin, P.F. Rampant, M.C. Lesage, L.E. Pâques, D. Prat. 2000. Application of AFLP, RAPD and ISSR markers to genetic mapping of European and Japanese larch. *Theoretical and Applied Genetics*. 100(2):299-307.
- Brondani, R.P., E.R. Williams, C. Brondani, D. Grattapaglia. 2006. A microsatellite-based consensus linkage map for species of *Eucalyptus* and a novel set of 230 microsatellite markers for the genus. *BMC Plant Biology*. 6(1):20.
- Casasoli, M., C. Mattioni, M. Cherubini, F. Villani. 2001. A genetic linkage map of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) based on RAPD, ISSR and isozyme markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 102(8):1190-1199.
- Chaudhury, R., S.K. Malik. 2004. Desiccation and freezing sensitivity during seed development in jackfruit. *Seed Science Technology*. 32:785-795.
- Collard, B.C.Y., M.Z.Z. Jahufer, J.B. Brouwer, E.C.K. Pang. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*. 142:169-196.
- Doerge, R.W. 2002. Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. *Nat Rev Genet*. 3(1):43-52.
- Dranski, Jr. J.A.L., A.S. Pinto, F. Steiner, T. Zoz, U.C. Malavasi UC, Malavasi MM, Guimarães VF. 2010. Physiological maturity of seeds and colorimetry of fruits of *Jatropha curcas* L. *Revista Brasileira de Sementes*. 32: 158-165.
- Duang-iat, W., V. Wongvarodom, W. Santipracha, S. Sdoodee. Physiological quality and desiccation sensitivity of rubber (*Hevea brasiliensis*) seeds during fruit maturation. *Kasesart Journal of Natural Science*. 47: 818-827.
- Ferreira, A., M. da Silva, L. e Silva, C. Cruz. 2006. Estimating the effects of population size and type on the accuracy of genetic maps. *Genetics and Molecular Biology*. 29(1): 187-192.
- Grattapaglia, D., R. Sederoff. 1994. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using pseudo-test-cross-mapping strategy and RAPD markers. *Genetics*. 137: 1121-1137.
- Hackett, C.A., F.N. Wachira, S. Paul, W. Powell, R. Waugh. 2000. Construction of a genetic linkage map for *Camellia sinensis* (tea). *Heredity*. 85: 346-355.
- Hadi, H., A. Hartana. 2004. Analisis penanda molekuler sifat ketahanan tanaman karet terhadap penyakit gugur daun *corynespora*. *Jurnal Penelitian Karet*. 22(2): 47-56.

- Hadi, H., A. Hartana, M. Sinaga. 2004. Analisis genetika pewarisan sifat ketahanan tanaman karet terhadap penyakit gugur daun *corynespora*. *Hayati*. 11(1): 1-5.
- Haley, C.S., L. Anderson. 1997. Linkage mapping of quantitative trait loci in plants and animals. *Genoe apping : a practical approach*. Dear, PH. New York, Oxford University Press.
- Kunkeaw, S., T. Yoocha, S. Sraphet, A. Boonchanawiwat, O.Boonseng, D.A. Lightfoot, K. Triwitayakorn, S. Tangphatsornruang. 2011. Construction of a genetic linkage map using simple sequence repeat markers from expressed sequence tags for cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Molecular Breeding*. 27(1): 67-75.
- Lan, Q.Y., X.C. Jiang, S.Q. Song, Y.B. Lei, S.H. Yin. 2007. Changes in germinability and desiccation-sensitivity of recalcitrant *Hopea hainanensis* Merr. et Chun seeds during development. *Seed Science Technology*. 35: 21-31.
- Le-Guen, V., D. Garcia, C. Mattos, F. Doare, D. Lespinasse, M. Seguin. 2007. Bypassing of a phylogenetic *Microcyclus ulei* resistance in rubber tree, analyzed by QTL detection. *New Phytologist*. 173: 335-345.
- Le Guen, V., D. Lespinasse, G. Oliver, M. Rodier-Goud, F. Pinard, M. Seguin. 2003. Molecular mapping of genes conferring field resistance to South American Leaf Blight (*Microcyclus ulei*) in rubber tree. *Theoretical and Applied Genetics*. 108(1): 160-167. doi:10.1007/s00122-003-1407-9
- Le Roux P-MF, Khan MA, Broggin GAL, Duffy B, Gessler C, Patocchi A. 2010. Mapping of quantitative trait loci for fire blight resistance in the apple cultivars 'Florina' and 'Nova Easygro'. *Genome*. 53(9): 710-722.
- Lee, M. 1995. DNA markers and plant breeding programs. *Advance Agronomy*. 55: 265-344.
- Lespinasse, D., M. Rodier-Goud, L. Grivet, A. Leconte, H. Legnate, M. Seguin. 2000. A saturated genetic linkage map of rubber tree (*Hevea* spp.) based on RFLP, AFLP, microsatellite and isozyme markers. *Theor Appl Genet*. 100: 127 - 138.
- Mohan, M., S. Nair, A. Bhagwat, T.G. Krishna, M. Yano, C.R. Bhatia, Sasaki T. 1997. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Molecular Breeding*. 3(2):87-103.
- Mydin, K.K., C.K. Saraswathyamma. 2005. A manual on breeding of *Hevea brasiliensis*. Rubber Research Institute of India. Kerala, India.
- N'Diaye, A., W.E. Van de Weg, L.P. Kodde, B. Koller, F. Dunemann, M. Thiermann, S. Tartarini, F. Gennari, C.E. Durel. 2008. Construction of an integrated consensus map of the apple genome based on four mapping populations. *Tree Genetics & Genomes*. 4(4):727-743.
- Novalina, A.D. Sagala. 2013. Construction of *Hevea brasiliensis* genetic linkage map and Identification of quantitative trait loci using RAPD markers. *International Journal on Advanced Science Engineering Information Technology*. 3(1):71-75.
- Oktavia, F., M. Lasminingsih, Kuswanhadi. 2011. genetic relationship of wickham and IRRDB 1981 rubber population based on RAPD markers analysis. *HAYATI Journal of Biosciences*. 18(1):27-32.
- Paillard, M., P. Lashermes, V. Pétiard. 1996. Construction of a molecular linkage map in coffee. *Theoretical and Applied Genetics*. 93(1):41-47.

- Pawsoi, N., T. Phumichai, K. Teerawatanasuk, A. Wongkaew, C. Phumichai. 2013. Microsatellite paternity analysis used for evaluation of outcrossing rate among five *Hevea* rubber clones in a system seed orchid. *Kasesart Journal of Natural Science*. 47: 407-415.
- Priyadarshan, P.M. 2011. *Biology of Hevea Rubber*. CABI. UK.
- Rattanawong, R., K. Prapan, N. Lekawipat, M. Seguin. Clement-Demange A (2009). Detection of QTLs association with growth, latex production and rubber quality for the development of Marker Assisted Selection (*Hevea brasiliensis*). IRRDB workshop on genome and transcriptome. Montpellier, 3-5 June 2009. France.
- Risterucci, A.M., L. Grivet, J.A.K. N'Goran, I. Pieretti, M.H. Flament, C. Lanaud. 2000. A high-density linkage map of *Theobroma cacao* L. *Theoretical and Applied Genetics*. 101(5):948-955.
- Seguin, M., M. Rodier-Goud, D. Lespinasse. 1997. Mapping SSR markers in rubber tree (*Hevea brasiliensis*) facilitated and enhanced by heteroduplex formation and template mixing. Plant and Animal Genome Conference, 12-16 January 1997. San Diego.
- Semagn, K., A. Bjørnstad, M.N. Ndjondjop. 2006. Principles, requirements and prospects of genetic mapping in plants. *African Journal of Biotechnology*. 5(25): 2569-2587.
- Silva, L.J., D.C.F.S. Dias, C.C. Milagres, L.A.S. Dias. 2012. Relationship between fruit maturation stage and physiological quality of physic nut (*Jatropha curcas* L.) seeds. *Ciênc. Agrotec. Lavras*. 36:39-44.
- Soman, T., M.R. Sethuraj, C.K. Saraswathyamma, M.A. Nazeer. 1996. Improving fruit set in *Hevea*: Some preliminary observation. *Indian Journal Natural Rubber Research*. 9(2):112-116.
- Souza, L., R. Gazaffi, C. Mantello, C. Silva, D. Garcia, V. Le Guen, S. Cardoso, A. Garcia, S. AP. 2013. QTL mapping of growth-related traits in a full-sib family of rubber tree (*Hevea brasiliensis*) evaluated in a sub-tropical climate. *PLoS One*. 8(4):1-10.
- Vinod, K.K. 2009. Genetic mapping of quantitative trait loci and marker assisted selection in plantation crops. In vitro techniques in plantation crops, Kasaragod, India, Central Plantation Crops Research Institute.
- Woelan, S. 2006. Perbaikan karakteristik tanaman melalui rekombinasi genetik. I. Pengaruh faktor iklim terhadap persilangan buatan 2005. *Jurnal Penelitian Karet*. 24(1):17-31.
- Woelan, S., R. Tistama. 2006. Perbaikan karakteristik tanaman melalui rekombinasi genetik. II. Kajian terhadap perkecambahan serbuk sari dalam upaya peningkatan buah jadi tanaman karet. *Jurnal Penelitian Karet*. 24(1):33-45.
- Yeang, H.Y., M. Chevallier. 1999. Range of *Hevea brasiliensis* pollen dispersal estimated by esterase isozyme markers. *Annals of Botany*. 84:681-684.