

Lokus SSR Berasosiasi Karakter Tahan Penyakit Mati-Pohon Durian Berdasarkan Bulk Pseudo-Segregant Analysis (SSR Loci Associated to Resistance Traits to Durian Die-Back based on Bulk Pseudo-Segregant Analysis)

Panca Jarot Santoso¹⁾, I Nyoman Pugeg Aryantha²⁾, Sony Suhandono²⁾, dan Adi Pancoro²⁾

¹⁾Balai Penelitian Tanaman Buah Tropika, Jln. Raya Solok-Aripan KM 8, Solok, Sumatra Barat, Indonesia 27301

²⁾Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung, Jln. Ganeca 10, Bandung, Jawa Barat, Indonesia 40132
E-mail: pancajarot@pertanian.go.id

Diterima: 18 Juli 2019; direvisi: 18 Desember 2019; disetujui: 23 Januari 2020

ABSTRAK. Penyakit mati-pohon disebabkan cendawan *Pythiaceae* khususnya *Phytophthora palmivora*, *Pythium vexans*, dan *Pythium cucurbitacearum* menjadi salah satu kendala utama dalam budidaya durian. Di antara upaya pengendaliannya adalah melalui pemuliaan dan seleksi tanaman tahan berbasis molekuler menggunakan marka SSR. Penelitian untuk mengidentifikasi lokus SSR yang berasosiasi dengan karakter tahan penyakit mati-pohon pada durian telah dilaksanakan di Laboratorium Genetika Tumbuhan SITH-ITB dari bulan April sampai dengan Desember 2014. Penelitian dilaksanakan secara *bulk pseudo-segregant analysis* dua *pool* DNA durian tahan dan rentan. Amplifikasi lokus SSR menggunakan 77 pasang primer mikrosatelit berlabel *fluorescent*. Produk amplifikasi dibaca menggunakan *GeneMarker v.2.4.0.*, setiap puncak pancaran *fluorescent* yang memiliki nilai intensitas tinggi dipilih sebagai alel. Perbandingan panjang alel dilakukan di antara dua *pool* dan perbandingan aksesori tahan. Lokus yang memiliki alel berbeda antara dua *pool* tetapi memiliki alel sama dengan perbandingan dianggap sebagai marka yang berasosiasi dengan sifat tahan durian terhadap *Pythiaceae*. Hasil analisis ditemukan tiga lokus mDz03F10, mDz4B2, dan mDz3B1 dengan motif berturut-turut (GAA)₃, A(GA)₄, (GAGT)₂ttGAGT, dan (TTTTATG)₂(GCCC)₂ teridentifikasi sebagai marka yang berasosiasi dengan karakter tahan *Pythiaceae*. Hasil analisis ini memerlukan satu langkah validasi untuk meyakinkan keterpautan marka dengan karakter target sebelum digunakan sebagai marka molekuler.

Kata kunci: Durian; SSR; BpSA; Tahan; *Pythiaceae*

ABSTRACT. Die-back disease caused by *Pythiaceae* especially *Phytophthora palmivora*, *Pythium vexans*, and *Pythium cucurbitacearum* is one of the obstacles in durian cultivation. An effort to control this disease is through breeding and selection of resistant plants based on molecular assays such as SSR markers. Research to identify SSR loci associated with durian die-back resistance was done at Plant Genetics Laboratory, SITH-ITB from April to December 2014. The research was conducted through bulk pseudo-segregant analysis of two DNA pools, resistance, and susceptible durians. Amplification of SSR loci was carried out by using 77 fluorescent labeled primers. Amplification products were analyzed using *GeneMarker v.2.4.0.* Fluorescent peak with high intensity was considered as a selected allele. Comparison of allele length was executed amongst two pools and resistance reference. A locus showed different allele between two pools, while it given the same allele to reference was considered as SSR marker associated with *Pythiaceae* resistance. The analysis was found three loci, mDz03F10, mDz4B2, and mDz3B1 with motif of (GAA)₃, A(GA)₄, (GAGT)₂ttGAGT, and (TTTTATG)₂(GCCC)₂ respectively identified as SSR markers associated to die-back resistance. This result, therefore, requires further validation to convince markers association to target traits before they are used as molecular markers.

Keywords: Durian; SSR; BpSA; Resistance; *Pythiaceae*

Durian (*Durio* sp.) merupakan tanaman buah asli Indonesia (Santoso et al. 2017). Budidaya durian yang telah mengakar pada sebagian masyarakat Indonesia meninggalkan jejak pada berbagai produk budaya, di antaranya digunakan untuk nama desa atau kampung, relief di dinding candi, berbagai olahan makanan, sampai produk sastra (Santoso, Purnomo & Djatnika 2014). Pusat-pusat produksi durian di Indonesia umumnya masih bergantung pada tanaman non-budidaya berupa pekarangan dan tegalan semi hutan yang diwarisi secara turun-temurun, berasal dari biji, varietas campur, dan tidak dilakukan pemeliharaan secara baik (Santoso & Hermanto 2017).

Pergeseran cara budidaya dari subsisten ke arah intensif saat ini memberikan harapan pada peningkatan kualitas dan produksi buah di masa depan. Namun demikian, budidaya intensif secara monokultur dapat meningkatkan kejadian serangan penyakit yang disebabkan oleh cendawan, di antaranya dari famili *Pythiaceae*, yaitu *Phytophthora palmivora*, *Pythium vexans*, dan *Pythium cucurbitacearum* (Santoso et al. 2015; Suksiri et al. 2018; Vawdrey, Langdon & Martin 2005a).

Belum ada laporan terbaru terkait tingkat serangan dan kerugian akibat penyakit ini di Indonesia. Pada dekade sebelumnya dilaporkan kerugian

akibat serangan *P. palmivora* pada durian di Asean diperkirakan rata-rata 20–25% dengan nilai mencapai US\$ 5,34 Milyar (Drenth & Guest 2004). Patogen ini telah dilaporkan merusak 30% durian di Penang, Malaysia dan menyerang 54% koleksi durian di Australia (Hasan & Siew 2000; Zappala, Zappala & Diczbalis 2002). Penyakit ini juga menjadi masalah di Thailand (Somsri *et al.* 2008), Vietnam (Thanh, Binh, & Chau 2002), Filipina (Abad & Cruz 2012), dan Brunai Darussalam (Sivapalan, Hamdan & Junaidy 1997). Tingkat serangan yang tinggi terutama terjadi pada kebun durian yang dikelola secara intensif seperti penerapan monokultur, penggunaan pupuk buatan terutama N, dan jarak tanam rapat (Drenth & Guest 2004).

Tidak seperti pada *P. palmivora*, sedikit sekali tersedia laporan tentang serangan *P. vexans* dan *P. cucurbitacearum* pada tanaman durian. Lim (1990) mendeskripsikan cendawan *Pythium* merupakan patogen durian terutama pada fase pembibitan, sedangkan (Vawdrey, Langdon & Martin 2005a) melaporkan kehadiran *P. vexans* bersama-sama dengan *P. palmivora* di kebun durian di Queensland, Australia. Perbedaan kedua patogen ini di lapangan ditunjukkan oleh gejala yang ditimbulkan pada tanaman durian. *Phytophthora* menunjukkan gejala *gummosis* warna cokelat kemerahan, sedangkan pada serangan *Pythium* tidak terdapat gejala *gummosis* dan batang tetap kering (Thompson 1934; Thompson 1938).

Program pemuliaan durian yang terstruktur dan berkesinambungan perlu dilakukan untuk mendapatkan varietas unggul yang ideal dan memenuhi kebutuhan pasar dan industri di masa depan (Indriyani, Santoso & Hermanto 2012; Somsri 2014). Namun demikian, pemuliaan secara konvensional membutuhkan waktu yang lama dan biaya yang besar (Sani *et al.* 2015; Somsri *et al.* 2008). Di sisi lain, perakitan varietas baru dengan cara transgenik belum memungkinkan karena beberapa kendala antara lain belum tersedianya teknologi kultur jaringan pada tanaman durian (Efendi, Sukma & Pusparani 2017).

Agar diperoleh hasil yang maksimal dan lebih cepat, strategi dan teknik pemuliaan dengan pemanfaatan marka molekuler (*marker-assisted selection*/MAS) merupakan pilihan yang tepat (Collard *et al.* 2005). Prinsip dasar dari teknologi ini adalah memetakan atau mendeteksi marka genetik yang berasosiasi dengan karakter penting (*traits of interest*) bersifat kuantitatif yang diwariskan secara bebas (Abdurakhmonov & Abdulkarimov 2008). Penggunaan MAS untuk memetakan marka genetik yang berasosiasi dengan karakter tahan terhadap penyakit didasarkan pada anggapan bahwa sifat ketahanan terhadap infeksi

patogen ditentukan salah satunya oleh kehadiran ‘gen ketahanan’ pada inang (Huang *et al.* 2008). Gen ini diturunkan kepada progeninya melalui rekombinasi kromosom (segregasi) selama proses meiosis (Paterson 1996).

Marka *simple sequence repeats* (SSR) atau mikrosatelit merupakan marka molekuler yang telah banyak digunakan untuk program MAS berupa pemetaan *quantitative trait locus* (QTL). Marka mikrosatelit memiliki kelebihan karakter lokus *codominant* dan tingkat polimorfik yang tinggi, mudah diulang, dan stabil (Ritschel *et al.* 2004). Marka ini telah digunakan dalam kegiatan *breeding* untuk memperoleh tanaman tahan penyakit di antaranya fusarium pada gandum (Bernousi *et al.* 2009), parasit *scarce* pada kacang tunggak (Kouakou *et al.* 2009) dan *downey mildew* pada bunga matahari (Mulpuri *et al.* 2009). Pada tanaman durian, beberapa peneliti telah berhasil mengembangkan marka SSR (Santoso *et al.* 2017; Nuchuchua *et al.* 2008) dan sebagian lokusnya telah diaplikasikan untuk analisis keragaman (Tan *et al.* 2018; Sales 2015; Hafizah *et al.* 2018).

Pemetaan lokus SSR terpaut karakter tahan penyakit secara QTL klasik menghadapi kendala dalam penyediaan materi tanaman, yaitu belum tersedianya populasi pemuliaan berasal dari hibridisasi dua genotipe induk yang mengandung karakter tahan dan rentan (Wu *et al.* 2007). Jalan keluar yang ditempuh adalah melakukan pendekatan *association mapping*, yaitu mengganti bahan tanaman hasil persilangan biparental dengan koleksi plasma nutfah (Goldstein & Weale 2001; Al-Maskri, Sajjad & Khan 2012). Penggunaan sampel individu dari koleksi plasma nutfah ini mempunyai kelebihan pada variasi genetik lebih luas dan lebih hemat waktu serta biaya (Kraakman *et al.* 2004; Kraakman *et al.* 2006; Hansen *et al.* 2001). Kendala selanjutnya yang dihadapi adalah teknik pengujian ketahanan yang terpercaya, karena idealnya sampel yang digunakan merupakan tanaman-tanaman yang tahan dan rentan terhadap penyakit melalui pengujian di lapang. Kaidah ini diketahui memerlukan waktu yang relatif lama dan biaya yang mahal (O’Gara *et al.* 2004). Selain itu, tanaman yang teruji rentan bisa mati dan tidak dapat lagi digunakan sebagai sampel. Sebagai alternatif, pada kegiatan ini dipilih plasma nutfah durian yang telah diuji menggunakan teknik *detached leaf bioassay*. Teknik ini, walaupun lebih cepat, hemat tempat, dan lebih murah dibandingkan uji lapang, tetapi telah terbukti efektif (O’Gara *et al.* 2004; Vawdrey *et al.* 2005; Emilda 2007; Brooks 2008).

Identifikasi lokus spesifik umumnya dilakukan dengan membandingkan polimorfisme marka genetik

antarindividu. Kaidah ini memerlukan waktu dan biaya yang tidak sedikit. Untuk menyiasati kendala ini, telah tersedia suatu metode yang disebut *bulk segregant analysis* (BSA) (Abdurakhmonov & Abdurakhmonov 2008; Gómez, Alvarez & Mosquera 2011). *Bulk segregant analysis* adalah suatu kaidah yang digunakan untuk mendeteksi marka dengan membandingkan polimorfisme dua *pool deoxyribo nucleic acid* (DNA) yang memiliki karakter berlawanan, misalnya karakter tahan vs. rentan terhadap penyakit (Johnson & Cullis 2012). *Pool* DNA diperoleh dari sekelompok individu (10–20 tanaman) dari hasil segregasi (progeni) (Collard et al. 2005) atau dari koleksi plasma nutfah (Abdurakhmonov & Abdurakhmonov 2008). Dua *pool* DNA ini kemudian diamplifikasi menggunakan semua marka yang tersedia. Marka-marka yang polimorfik antara dua *pool* menunjukkan sebagai marka yang terpaut terhadap gen yang dituju (*gene of interest*).

Bulked pseudo-segregant analysis (BpSA) merupakan pendekatan alternatif dengan menggabungkan kelebihan BSA dengan kelebihan menggunakan populasi plasma nutfah. *Bulked segregant analysis* merupakan pendekatan secara sederhana untuk pemetaan marka yang berasosiasi dengan karakter target (Michelmore, Paran & Kesseli 1991), sedangkan koleksi plasma nutfah merupakan sumber polimorfisme yang luas dari karakter yang kompleks dan berpotensi sebagai populasi pemetaan *association mapping* (Abdurakhmonov & Abdurakhmonov 2008; Al-Maskri, Sajjad & Khan 2012). *Association mapping* pada awalnya digunakan untuk

analisis genetik pada manusia, pada dekade terakhir juga digunakan pada tanaman karena memiliki potensi lebih menjanjikan untuk pemetaan sifat yang lebih kompleks daripada QTL klasik (Al-Maskri, Sajjad & Khan 2012), di antaranya untuk pemetaan *frost tolerant* pada barley (Visioni et al. 2013), analisis LD gandum tetraploid (Laido et al. 2014), pemetaan karakter kompleks pada padi (Zhao et al. 2011), dan pada tanaman jagung (Yan, Warburton & Crouch 2011).

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh lokus SSR yang berasosiasi dengan karakter tahan terhadap penyakit mati-pohon yang disebabkan *Pythiaceae* pada durian, khususnya *P. palmivora*, *P. vexans*, dan *P. cucurbitacearum* menggunakan pendekatan BpSA. Hipotesis penelitian adalah BpSA dapat digunakan untuk analisis lokus SSR yang terpaut dengan karakter tahan terhadap penyakit mati pohon yang disebabkan *Pythiaceae* pada tanaman durian.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan dari bulan April sampai dengan Desember 2014 di Laboratorium Genetik Tumbuhan, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung.

Bahan Penelitian

Bahan tanaman untuk BpSA terdiri atas dua *pool* DNA tahan dan rentan yang masing-masing terdiri

Tabel 1. Plasma nutfah durian untuk membuat ‘pool’ DNA tahan dan rentan* (*Durian germplasm to create resistant and susceptible DNA pool*)

Nama aksesori (<i>Accession name</i>)	Spesies (<i>Species</i>)	Asal sampel (<i>Sample origin</i>)	Keterangan (<i>Remark</i>)
Pool DNA 1			
1. Putri Dewa	<i>D. zibethinus</i>	Bangka	Sangat tahan
2. Siradio	<i>D. zibethinus</i>	Banten	Sangat tahan
3. Lokad	<i>D. zibethinus</i>	Kalbar	Sangat tahan
4. Dahlan	<i>D. zibethinus</i>	Lampung	Tahan
5. Lai Mas	<i>Durio</i> sp.	Jawa barat	Tahan
6. Kani	<i>D. zibethinus</i>	Thailand	Tahan
7. Montong daun pendek.	<i>D. zibethinus</i>	Thailand	Tahan
Pool DNA 2			
8. Montong daun panjang	<i>D. zibethinus</i>	Thailand	Sangat rentan
9. Musang King	<i>D. zibethinus</i>	Malaysia	Sangat rentan
10. Lai Batuah	<i>D. kutejensis</i>	Kaltim	Sangat rentan
11. Bintana	<i>D. zibethinus</i>	Sumut	Sangat rentan
12. Lodong	<i>D. zibethinus</i>	Banten	Sangat rentan
13. Bantal Mas	<i>D. zibethinus</i>	Sumsel	Sangat rentan
14. Hortimart	<i>D. zibethinus</i>	Jabar	Sangat rentan
15. Petruk	<i>D. zibethinus</i>	Jateng	Sangat rentan

*sumber: (Santoso et al. 2015)

atas tujuh dan delapan plasma nutfah dari tiga spesies durian (Tabel 1). Tanaman tahan dan rentan yang digunakan merupakan hasil seleksi dari pengujian yang dilaksanakan secara *bioassay* (Santoso, Purnomo & Djatnika 2014).

Metode Penelitian

Deoxyribo nucleic acid dari kelompok tanaman tahan dan rentan masing-masing diisolasi secara individual dari pucuk daun yang belum membuka menggunakan metode berdasarkan kit isolasi *Genomic DNA Isolation Kit (plant)* dari *Geneaid™* dengan modifikasi pada perpanjangan masa inkubasi dari 20 menit menjadi 180 menit, serta penambahan PVP-40 sebanyak 10% dari berat sampel. *Deoxyribo nucleic acid* yang diperoleh kemudian disetarakan konsentrasinya satu sama lain. Pembuatan *pool* dilakukan dengan cara mencampurkan DNA dalam jumlah yang sama untuk tiap-tiap individu ke dalam satu *microtube*.

Amplifikasi lokus SSR menggunakan 77 pasang primer mikrosatelit (Tabel 2) yang telah dikembangkan dari genom durian cv. Matahari (Santoso *et al.* 2017). *Polymerase chain reaction* (PCR) menggunakan mesin *Thermocycler GenAmp* dengan reagen PCR *ready mix* KAPA 2G. Sebagai penanda *fluorescent* digunakan *probe* FAM/HEX. *Polymerase chain reaction* dilaksanakan secara *touch-down* yang diawali dengan predenaturasi pada suhu 94°C selama 3 menit, kemudian dilanjutkan siklus awal PCR sebanyak 10 kali dengan denaturasi dilakukan pada suhu 94°C selama 15 detik, diikuti *annealing* pada suhu 62°C selama 30 detik, dan diakhiri elongasi pada suhu 72°C selama 20 detik. Proses selanjutnya adalah siklus *touch-down* dengan suhu *annealing* menurun 0,5°C setiap satu siklus. Pada siklus ini, denaturasi pada suhu 94°C selama 15 detik, *annealing* primer dari suhu 62 – 54°C selama 15 detik dalam 16 siklus, serta elongasi pada suhu 72°C selama 20 detik. Kemudian dilanjutkan siklus PCR sebanyak 15 kali dengan denaturasi pada

Tabel 2. Daftar 77 lokus mikrosatelit yang digunakan dalam penelitian (*List of 77 microsatellite loci used in the study*)

No	Lokus (Loci number)	Motif (Motive)	Primer forward /reverse (5'-3')
1.	mDz1G3	(AACCC)2	f-TACGCGTGGACTACTCAAA r-GTTAGTTCGTCGTTTCGGCT
2.	mDz3D11	(AAGTG)2, (TCTT)2	f-CAGCCCTGACATATCCTGGT r-GCTTACGCGTGGACTAGACT
3.	mDz03H9	(ACA)3gcg(AGAA)2	f-AGCCTCCGTATCTTTACATGT r-CATTTCGATGCTACCACACCG
4.	mDz78B2	(ACCC)2(GATT)2	f-GCGTGGACTAACAAGTGGTA r-ATATCAAGGGCAGTCTCGTG
5.	mDz6A11	(ACCC)2(GATT)2, (GCCAC)2	f-GCACAACCATAGCACCCTC r-TGTTATTCTCGTGCCAAGCG
6.	mDz2E2	(ACT)3,(AGG)2A	f-ACACTCTTCGTCCGATAACAGATAT r-CTCCAATCCTCCACTTATCAG TAGA
7.	mDz1D1	(ACT)3, (TTTTG)2, T12	f-GCTTACGCGTGGACTACTAC r-GGTCCTCCAAATTCCCTTGAG
8.	mDz4F9	(AGAAG)2, (AG)4, (ACT)3A	f-TCTCTGCATCAATTGGCACG r-GCTTACGCGTGGACTACTAA
9.	mDz6H10	(AGGG)2, (TTGG)2gc (CCT)2C, (CTG)3C, (TGAA)2	f-CTACTCAGCCGGCCAGAG r-CACCTGCTTGTTTCGTCAGT
10.	mDz03A31	(ATT)3, (GA)4	f-TGTGGAGTCTTGTTCCGGAA r-AGCAACAAACAGAACCACCG
11.	mDz3G731	(CA)4, (CA)4	f-CCCTTCTCCCCACCTTAT r-AGTGGGAGAGCGCAATGTAT
12.	mDz03D2	(CA)4C, (GTC)2G	f-GCACCCATCGCACATCATG r-TCATTTCCAGTCTAAGATCGGA
13.	mDz4A7	(CAGA)2(GTGA)2	f-CAGGTTCTGGACTGAGTTGT r-GACTACTTTGGCCAGTCCCT
14.	mDz1F2	(CAGC)2CA, T(CCCT)2	f-CTACGCCAACCCACGAAAT r-ACGCGTGGACTAGACTTAGG
15.	mDz1G1	(CAGCAC)2	f-CACCCATCGGACATCATGTG r-CGACAGAGGGTTTCGACAGA
16.	mDz4A10	(CAGCAC)2	f-CCCAATGCCTCCGGTCAG r-AGATCGGACCAAATCGAGGG

Lanjutan Tabel 2.

No	Lokus (<i>Loci number</i>)	Motif (<i>Motive</i>)	Primer forward /reverse (5'-3')
17. mDz03A1	(CAR)33		f-CGTGGACTACTTTTATTGCAGAGG r-CAAGTCCATTCGTATTGCCATT TAG
18. mDz2G7	(CAR)33		f-GCTTACGCGTGGACTACTTT r-ATGAGACCCATCCCTTCGC
19. mDz03C6	(CATAACT)2, (GGAA)2		f-CGCGTGGACTAACAGATGAA r-GCTTACGCGTGGACTACTTC
20. mDz3G72	(CCCCG)2, (CCCCT)2, (CCCCT)2, (CCCA)2, (CA)4		f-AGTTAAGGGTTGGAGCCGAT r-TACGTGTGAGGTCAAGCTGT
21. mDz3G73	(CCCCT)2, C8, (CCCA)2, (CA)4		f-CACCCCTCCCCTACACAAAA r-CCGGCTGGTATGTTGTGTG
22. mDz1H32	(CG)3, (ACCC)2, (CGAG)2CG, (GCCAC)2, (TGGCC)2		f-AGCACCCTCATATGCCCAT r-TTGGCCGATTCTCTTGCTT
23. mDz4H8	(CGAG)2CG, (ACC)2A, (TGGCC)2		f-ACCCACCCGATCGATTACTC r-CATCGTCCTCTTGCTTACGC
24. mDz1C12	(CGCT)3, (GGGT)2		f-CGTTGTTGCCTGTTCGGAT r-CACAACCATAGCACCCTCA
25. mDz1E12	(CGCT)3, (GGGT)2		f-TGTTATTCTCGTGCCAAGCG r-AGCACCCTCATATGCCCAT
26. mDz03H2	(CTCTGT)2, (CAAA)2, (CGGC)2		f-TACAAACCTCTTCCCTCGCC r-AACCCGACAACAGGCTTAGT
27. mDz2F8	(CTTT)2..(TTCC)2		f-ACGCGTGGACTAAACTACCA r-GTGGACTACTGTTCCGGGAT
28. mDz03F10	(GAA)3, A(GA)4		f-GGACTAGACAACCAAGCAGAG r-GCGTGGACTACTTCAAACCC
29. mDz2B5	(GAA)3, A(GA)4		f-CGTGGACTAGACAACCAAGC r-AACCCGATCTTCACCGTTCA
30. mDz4B2	(GAGT)2ttGAGT		f-AAGCCAAGGTAGTGTAGCCT r-CACCACCCACAATAGACCCT
31. mDz43G7	(GAT)2GA, (GTA)2G		f-GCGTGATTGGCGACTAGTAA r-ATACTGGCTCCATCGTCAGC
32. mDz6F092	(GCA)2GC, G(TGG)2, A(GAA)2		f-ACCCGGTAAGACACGACTTA r-TTTGCCGGCTCAAGAGCTAC
33. mDz3E9	(GCC)2C, (GAGG)2, (AC)4, (TGTT)2		f-GTGGACTAACGGTAGCAACT r-GCTTACGCGTGGACTACTTC
34. mDz1C41	(GCC)2g, (CGT)2c (GAT)2		f-TGGACTAGACCCAGGC r-GGAGTACACGCTGGAATACC
35. mDz2A71	(GGACAG)2, (GTGGC)2		f-GTATCGCACCGTTGTTGCC r-GAGCGAGCGGAGGAAACG
36. mDz2G1	(GGC)2, (GGC)3, (GGC)2		f-GGATCGAAATACAGCGGGTT r-ATGATCGATAACAACCGCCC
37. mDz3D1	(GGCC)2, (TGC)2TG		f-GTGCAGAGTTCTTTGGCCAA r-AATGCCCTAGGAAAGCAGGA
38. mDz3H12	(GGGA)2, (AG)5		f-CTTACGCGTGGACCAAAACA r-TTCTCCTCCTTCCCTCTCTC
39. mDz2C4	(GGGC)2G		f-GGCTGTAGGATCATGCACAA r-GACTACTTGATGCCAGGCC
40. mDz2A72	(GGGCAG)2, (GTGGC)2, (CGCT)3, (GGGT)2		f-CGTTGTTGCCTGTTCGGAG r-GCACAACCATAGCACCCTC
41. mDz6D08	(GTGGC)2, (CGCT)2CG, (GGGT)2		f-TGTTATCTCGTGCCAAGCG r-GCACGAGGGGAGATTGAAGA
42. mDz4D4	(GTT)2G, (AG)3A		f-ATTCCTTCTCCGAGAGCAC r-TCCTTTTCTATCCCGGTCGC
43. mDz6F06	(TAAA)2, (AGG)3		f-GGTTACAACCTTG CCC CAC TG r-GACCACCAACACAAACGGAA
44. mDz2F2	(TAG)3T		f-CAGGTGCTAGTGAGTGGTGT r-TTGAGTGAGCTGATACCCT
45. mDz3A9	(TCA)2T, (AATA)2A, (TGG)2T		f-GGACTAACCTTCAGCCACT r-GCTTACGCGTGGACTACTC
46. mDz1C3	(TCTA)2TC, (ATGAAG)2AT, (CTTT)2C		f-CAAAGATGACGGAGGACCCT r-TTACGCGTGGACTACTCACT
47. mDz1G101	(TG)5CG(TG)5CG(TG)7		f-TCTTTTGTGTGTGTGCGTGT r-GCATCCAAAGTGTTCTCGTGT

Lanjutan Tabel 2.

No	Lokus (<i>Loci number</i>)	Motif (<i>Motive</i>)	Primer <i>forward</i> / <i>reverse</i> (5'-3')
48. mDz6A01		(TGAC)2, (GGGA)2	f-TAACTTCTGCCTGCTCGTGA r-CTCTTGCAAAGGATCCAAGAGG
49. mDz4H10		(TGC)3	f-ACTAACCAGCACCCATCACA r-AAGATCTAACC GGACCGAGG
50. mDz3A3		(TGC)3	f-ACTAACCAGCACCCATCACA r-TCATACTGGACCGAGTGCTG
51. mDz1F5b		(TGG)2T, (GTT)2G, (GTGGC)2, (CGCT)3	f-GTGGACTACTCGCGCGTG r-ACAACCCACCCGATCGAT
52. mDz53H51		(TGG)2T, (TGG)2T, (ATGTGT)2	f-ACTAGCATAAAGGGCCAGCA r-GCTTACGCGTGGACTACTTAG
53. mDz6A09		(TGG)n	f-GATGGTGGAATTGGTGGTGG r-CCACCTACACCTCCACCTTT
54. mDz3G71		(TGG)6	f-GATGGTGGAATTGGTGGTGG r-ATCGGCTCCAACCCTTAACT
55. mDz2G111		(TTGGA)2, (TGA)2TG, (GAAAG)2	f-ACAATAGCATAGAGGATTGGCT r-ACCACTCGACTCCCATTCAA
56. mDz03D1		(TTTC)2T8(TG)4	f-GGGTGGCCGTGT GTAATTTT r-CACGGGGGCTAATTGTCATCG
57. mDz3B1		(TTTTATG)2, (GCCC)2	f-GACTAGACACTCTTCGTCCGA r-ACTCCTCCAATCCTCCACTT
58. mDz03D7		(TTTTG)2, T12	f-ATCAACACCTGGCTTGATCC r-AGAGAAGTTCGTTTAGGAGCCA
59. mDz6F093		A(GAA)2, (TTTG)2 ca(AGC)2AG	f-AGAGTTCTTGAAGTGGTGGC r-CGTCAGACCCCGTAGAAAAG
60. mDz2A5		A(GAA)2G, G(AGG)2	f-GAACAATTGATGATAAAGCGCG r-AGACTACAACCTCACTCGGCT
61. mDz4A6		A12, (CAAAA)2	f-AGAGAAGTTCGTTTGGAGCCA r-ATCAACACCTGGCTTGATCC
62. mDz13E1		C(GCC)2GC, (GCC)2G, (GCC)3G	f-AACCCGCTTTATTGACCCTG r-CCAACAATGAAGGCCAGTCC
63. mDz3B72		C12, C8	f-TGAACGTTCTCCACCCCTC r-GAAGTTGGTTTCTTGCGGTT
64. mDz6F094		G(TTG)2, G7, (TTCA)2	f-GTTGCCGGGAAGCTAAAGTA r-GGTTGCCCATACCCATAGTG
65. mDz2C32		T8, (CGG)2C, G7, (GAT)2G, (CAT)2CA	f-AAGATAGGGTCGAGCATGTG r-GGGTGTGAGTTCTCAAGGTT
66. mDz2C31		T8, (CGG)2C, G7, (GAT)2G	f-CAGCACAAGATGGGTGCGAG r-CCAAGTATGAGCACCCATCG
67. mDz16		(CCCT)3, A15	f-ACGCACCCGTGCCCGATTTT r-GGAGGACCACCCGACCACCA
68. DzMTa005		(TG)8	f-TGGGATTTGGATGATGGGTTGTTTTCA r-CGGCCGCGGGAATTCGATTGAT
69. DzMTa006		(AT)11	f-ACCTTCTCCCCATTTACCAAACCA r-AGGGCACACTCATTTTGCTTTGTTTC
70. DzMTa007		(AG)13	f-TCCCCAGCACTTGCAAATTTCCCT r-ACCCTAGCCTTTTATGCAACAC
71. DzMTb021		(TC)6	f-ATTGACCCATTCGAAATGTCCCCTTT r-TGCGCGGGAAATTGGTGTTC
72. Dz621		(CTGG)3	f-ACCGGACCGAGGGTTGTGGT r-GCAAGCCGGGGATCGACCAG
73. Dz535		(CTGG)3	f-GACTGAGCGCCCGTATGCCC r-GTCCCCCTCTGCGTGCTGTCTG
74. Dz504		(CCAA)3	f-CTCGGTCCGGCTGGGGCTTA r-CCTCTCCGGTTGGCTGAGCG
75. Dz844		(CAG)3	f-TGGTTGAATGCCCGCACGCT r-TCGGACCGATCCACCCCTGC
76. DzGCCG01		(GCCG)2	f-GGTGGGTTCAAGCACATCTT r-TCAAACCAGACCGAGGGTTA
77. DzGCAG01		(CAG)2GAC(CAG)3	f-GTTGAGCACCCGTACACTCA r-GAGAGGCCAAAATACGCAAGC

Tanda koma (,) pada motif mikrosatelit menunjukkan adanya jeda lebih dari 3 nukleotida;

'f' = *forward*; 'r' = *reverse*

suhu 94°C selama 15 detik, diikuti *annealing* pada suhu 54°C selama 15 detik, dan diakhiri elongasi pada suhu 72°C selama 20 detik. Siklus terakhir adalah penempelan label dilakukan sebanyak delapan kali siklus, yaitu denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik diikuti proses *annealing probe* FAM/HEX pada suhu 53°C selama 20 detik, dan elongasi pada suhu 72°C selama 30 detik. Reaksi PCR kemudian diakhiri dengan elongasi pada suhu 72°C selama 7 menit.

Elektroforesis dilaksanakan guna memastikan keberhasilan proses amplifikasi. Setiap 1 µl ampikon ditambah 1 µl *loading dye* dan 4 µl dH₂O dimasukkan ke dalam sumur gel agarose 2% di dalam *chamber* elektroforesis yang dipasang pada daya listrik 50 volt selama 30–45 menit. Setelah elektroforesis, gel direndam dalam larutan 0,01% *ethidium bromide* selama 10–15 menit kemudian dipindai di atas *UV-transilluminator*.

Produk amplifikasi yang sudah berlabel *fluorescence* kemudian dikirim ke Macrogen Inc. Korea untuk analisis fragmen (*gene-scanning*). Hasil *scan* berupa grafik elektroferogram dari puncak pancaran penanda M13 berlabel *fluoresence* pada panjang alel tertentu yang dapat membedakan panjang sekuens DNA yang teramplifikasi. Produk analisis fragmen diterima dalam

bentuk data *Fasta*. Data ini kemudian dibaca dan dianalisis menggunakan *software GeneMarker v.2.4.0*. Setiap fragmen hasil amplifikasi DNA dihitung sebagai alel (Duval *et al.* 2009). Setiap puncak yang memiliki nilai intensitas tinggi dipilih sebagai alel. Kemudian dilakukan perbandingan panjang alel masing-masing lokus antara *pool* tahan dan rentan dengan perbandingan. Lokus yang memiliki alel berbeda antara dua *pool* tetapi memiliki alel sama dengan perbandingan tahan dianggap sebagai alel yang berasosiasi dengan karakter tahan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis hasil PCR dua *pool* tanaman durian tahan dan rentan serta satu perbandingan durian tahan penyakit *Pythiaceae* ditampilkan pada Tabel 3. Dari 77 marka SSR yang diuji, sebanyak 13 marka SSR menghasilkan lokus monomorfik dan 64 marka SSR menghasilkan lokus polimorfik antar-*pool*. Di antara lokus polimorfik antar-*pool*, terdapat 50 lokus yang memiliki banyak ukuran sekuens nukleotida untuk masing-masing *pool* dan 14 lokus yang memiliki satu ukuran sekuens nukleotida untuk masing-masing *pool* DNA.

Tabel 3. Hasil identifikasi marka mikrosatelit yang berasosiasi dengan karakter tahan *Pythiaceae* pada durian secara BpSA (*The Identification result of satellite markers associated with Pythiaceae resistant characters on durian by BpSA*)

No	Lokus (Loci)	Pembandingan (Comparison)	Pool tahan (Resistant pool)	Pool rentan (Susceptible pool)	Keterangan (Remarks)
1.	mDz1G3	169	105/153/167/176	169	Polimorfik; NB
2.	mDz3D11	124/169	104/124/145/165/ 184/204/224	104/124/169	Polimorfik; NB
3.	mDz03H9	169/187	113/164/187	169/187	Polimorfik; NB
4.	mDz78B2	173	133/173/261	169	Polimorfik; NB
5.	mDz6A11	167	167	167	Monomorfik
6.	mDz2E2	167	167	167	Monomorfik
7.	mDz1D1	169	169	169	Monomorfik
8.	mDz4F9	285/293	285/293	169/285/293	Polimorfik; NB
9.	mDz6H10	175	175	169/175	Polimorfik; NB
10.	mDz03A31	169	167	170	Polimorfik; NT
11.	mDz03D2	169/210	169	169/198/210	Polimorfik; NB
12.	mDz4A7	169/180	167/180	169/180	Polimorfik; NB
13.	mDz1F2	194/221	150/194/221	194/221	Polimorfik; NB
14.	mDz1G1	185	185	185	Monomorfik
15.	mDz4A10	129	129/140	129/140/167	Polimorfik; NB
16.	mDz03A1	169/224	179/224	169	Polimorfik; NB
17.	mDz2G7	169	203	169	Polimorfik; NT
18.	mDz03C6	169	167/205	169	Polimorfik; NB

Lanjutan Tabel 3.

No	Lokus (<i>Locī</i>)	Pembanding (<i>Comparison</i>)	<i>Pool tahan</i> (<i>Resistant pool</i>)	<i>Pool rentan</i> (<i>Susceptible pool</i>)	Keterangan (<i>Remarks</i>)
19.	mDz3G72	169	108/167	170	Polimorfik; NB
20.	mDz3G73	169	169/347	169	Polimorfik; NB
21.	mDz3G731	169	169	169	Monomorfik
22.	mDz1H32	168/218	114/171/177/218	114/169/177	Polimorfik; NB
23.	mDz4H8	169	130/149/169/244	169	Polimorfik; NB
24.	mDz1C12	169/207/217	207/217	169/207/217	Polimorfik; NB
25.	mDz1E12	160	153/160/167	153/160/169	Polimorfik; NB
26.	mDz03H2	169/192	167/184/191	169/192	Polimorfik; NB
27.	mDz2F8	102	102/108	169	Polimorfik; NB
28.	mDz03F10	200	200	169	Polimorfik; NT
29.	mDz2B5	189	182/189	169/189	Polimorfik; NB
30.	mDz3F5	169	169/220	169/220	Polimorfik; NB
31.	mDz4B2	218	218	169	Polimorfik; NT
32.	mDz43G7	167	167	167	Monomorfik
33.	mDz6F092	168/217	167/217	169/217	Polimorfik; NB
34.	mDz6F093	169	167/214/242	169/242	Polimorfik; NB
35.	mDz6F094	169	101	169	Polimorfik; NT
36.	mDz2E3	169	138	169	Polimorfik; NT
37.	mDz3E9	169	169	169	Monomorfik
38.	mDz1C41	169	115/139/167	169	Polimorfik; NB
39.	mDz2A71	133/169	126/133	133/169	Polimorfik; NB
40.	mDz2A72	170/218	130/218/228	170/218	Polimorfik; NB
41.	mDz2G1	101/169	128/169/180	128/169	Polimorfik; NB
42.	mDz3H12	120	120	120/169	Polimorfik; NB
43.	mDz6D08	169/241	167/230/241	169/230/241	Polimorfik; NB
44.	mDz4D4	169/210	210	169/210	Polimorfik; NB
45.	mDz6F06	170	170	170	Monomorfik
46.	mDz2F2	169	169	169	Monomorfik
47.	mDz3A9	169	167	169	Polimorfik; NT
48.	mDz1C3	170	130/169	169	Polimorfik; NB
49.	mDz1G101	-	123/126/132	170	Polimorfik; NB
50.	mDz6A01	169	167	169/219	Polimorfik; NB
51.	mDz4H10	108	108	105/169	Polimorfik; NB
52.	mDz3A3	169	169/181	169	Polimorfik; NB
53.	mDz1F5b	206/206	206/206	206/206	Polimorfik; NB
54.	mDz53H51	169	111/169/190/209	169	Polimorfik; NB
55.	mDz6A09	169	169	169	Monomorfik
56.	mDz3G71	169	169	170	Polimorfik; NT
57.	mDz2G111	169/233	169/233	169/233	Polimorfik; NB
58.	mDz03D1	102	101	169	Polimorfik; NT
59.	mDz3B1	167	167	169	Polimorfik; NT
60.	mDz03D7	169	169	169	Monomorfik
61.	mDz2A5	102	102	169	Polimorfik; NT

Lanjutan Tabel 3.

No	Lokus (Loci)	Pembanding (Comparison)	Pool tahan (Resistant pool)	Pool rentan (Susceptible pool)	Keterangan (Remarks)
62.	mDz4A6	169	169	169	Monomorfik
63.	mDz13E1	128/144	116/128/144/169	128/144/169	Polimorfik; NB
64.	mDz3B72	169	107/169	169	Polimorfik; NB
65.	mDz2C31	174	174	174	Monomorfik
66.	mDz2C32	169/226	180/226	169/225	Polimorfik; NB
67.	mDz11	169	214	169	Polimorfik; NT
68.	DzMTb021	169	169/180	169	Polimorfik; NB
69.	DzMTa006	169	169/247	169	Polimorfik; NB
70.	DzGCCG01	220	158/220	109/169	Polimorfik; NB
71.	Dz535	136/169	136/149/169	136/169	Polimorfik; NB
72.	DzMTa005	169	167	169	Polimorfik; NT
73.	Dz621	117	117/245	117/169	Polimorfik; NB
74.	DzMTa007	168	167	169	Polimorfik; NT
75.	DzGCAG01	169/207	167/170/182/207/ 231	169/207/231	Polimorfik; NB
76.	Dz504	109	109/281	109/169/281	Polimorfik; NB
77.	Dz844	146/170/172	145/172/184	146/170/172/184	Polimorfik; NB

NB: panjang nukleotida banyak dalam satu *pool* (Length of many nucleotides in one pool)

NT: panjang nukleotida tunggal dalam satu *pool* (Length of single nucleotides in one pool)

Angka bercetak tebal menunjukkan lokus yang diidentifikasi berasosiasi dengan karakter tahan *Pythiaceae* pada durian (Number in bold indicate the loci identified as associated with resistant characters of *Pythiaceae* on durian)

Pembanding adalah durian Kani yang tahan terhadap *Pythiaceae* (The comparison is the Kani durian which is resistant to *Pythiaceae*)

Lokus monomorfik menunjukkan di antara *pool* DNA yang diuji tidak ada perbedaan alel, sebaliknya lokus polimorfik menunjukkan adanya perbedaan alel marka SSR yang digunakan pada setiap *pool*. Lokus monomorfik diabaikan kehadirannya karena tidak dapat digunakan sebagai pembeda. Lokus polimorfik yang memiliki banyak alel dalam satu *pool* menunjukkan bahwa marka yang digunakan terpaut dengan karakter yang berbeda-beda untuk masing-masing varietas dalam satu *pool*, demikian juga lokus polimorfik antar-*pool* tetapi masing-masing memiliki alel tunggal. Keduanya juga diabaikan dalam analisis karena itu menunjukkan karakter lain diluar ketahanan penyakit yang menjadi target dalam analisis ini.

Dalam analisis ini dicari lokus monomorfik yang memiliki ukuran sekuens berbeda antara *pool* tahan dan rentan, tetapi *pool* tahan memiliki ukuran nukleotida yang sama dengan pembanding. Lokus ini menunjukkan satu *pool* DNA memiliki lokus terkait karakter tahan sebagaimana hasil pengujian secara *bioassay* terhadap varietas-varietas yang dijadikan satu *pool* tahan, demikian juga varietas pembanding yang telah terbukti ketahanannya (Santoso, Purnomo & Djatnika 2014). Berdasarkan kriteria ini, hasil analisis BpSA ditemukan tiga lokus mDz03F10 dengan motif (GAA)₃.A(GA)₄ lokus mDz4B2 dengan motif

(GAGT)₂ttGAGT, dan lokus mDz3B1 dengan motif (TTTTATG)₂(GCCC)₂ teridentifikasi sebagai lokus yang berasosiasi dengan karakter tahan *Pythiaceae*. Ketiga lokus menunjukkan polimorfisme antara *pool* tahan vs. rentan, tetapi monomorfik dengan aksesori tahan. Ketiganya secara konsisten hadir bersama populasi dan aksesori tahan, sebaliknya keduanya tidak hadir bersama populasi rentan.

Teridentifikasinya tiga lokus ini merupakan awal dalam menyediakan marka spesifik untuk karakter tahan penyakit, yang dapat digunakan sebagai marka genetik untuk menyeleksi progeni durian tahan penyakit secara dini pada generasi persilangan berikutnya. Hasil ini menunjukkan bahwa peluang untuk memperoleh marka yang terpaut juga tinggi, terbukti dari 77 marka SSR yang dianalisis terdapat tiga lokus yang berasosiasi dengan sifat ketahanan. Selanjutnya masih perlu dilakukan pengujian untuk validasi menggunakan populasi tanaman terserang penyakit di lapang pada generasi progeni hasil persilangan dan pemetaan posisi lokus dalam kromosom. Setelah melalui validasi dan pemetaan ini, apabila di antara ketiga lokus ini terbukti terpaut pada karakter tahan secara meyakinkan maka dapat digunakan sebagai marka spesifik untuk seleksi durian tahan penyakit *Pythiaceae*, khususnya *P. palmivora*, *P. Vexans*, dan *P. cucurbitacearum*.

Ditemukannya tiga lokus terpaut karakter tahan penyakit ini juga menjadi gambaran bahwa hipotesis sifat ketahanan terhadap penyakit dikendalikan oleh banyak gen (multigenik) dapat dibuktikan (Collard *et al.* 2005). Diperolehnya marka-marka yang terpaut dengan karakter ketahanan juga membuktikan adanya interaksi genetik antara patogen dan inang, di mana pada tanaman inang diketahui terdapat gen yang mengendalikan sifat tahan (Huang *et al.* 2008). Lebih dari itu kaidah ini dapat digunakan sebagai solusi dalam menjawab kendala berat dan mahalnya pemetaan QTL sehingga kedepan cara ini dapat digunakan untuk identifikasi karakter-karakter target yang lain.

KESIMPULAN DAN SARAN

Telah diperoleh tiga lokus SSR yang diduga berasosiasi dengan karakter tahan penyakit mati-pohon durian yang disebabkan cendawan *Pythiaceae*, yaitu mDz03F10 dengan motif (GAA)₃..A(GA)₄, lokus mDz4B2 dengan motif (GAGT)₂ttGAGT, dan lokus mDz3B1 dengan motif (TTTTATG)₂(GCCC)₂ melalui pendekatan BpSA.

Selanjutnya perlu dilakukan validasi menggunakan populasi tanaman di lapang dan pemetaan ketiga lokus sebagai marka spesifik ketahanan penyakit durian terhadap *Pythiaceae*.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih atas segala bantuan Dr. Kristianti. Penelitian ini dibiayai oleh Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Kementerian Pertanian melalui skema kegiatan kerjasama KKP3N tahun 2014.

DAFTAR PUSTAKA

1. Abad, RG & Cruz, KJT 2012, 'Incidence of *Phytophthora* fruit rot on four durian cultivars in Davao City, Philippines', in *IV International Symposium on Improving the Performance of Supply Chains in the Transitional Economies 1006*, pp. 35–39.
2. Abdurakhmonov, IY & Abdurakhmonov, A 2008, 'Application of association mapping to understanding the genetic diversity of plant germplasm resources', *International Journal of Plant Genomics*, vol. 2008, pp. 1–18.
3. Al-Maskri, AY, Sajjad, M & Khan, SH 2012, 'Association mapping: a step forward to discovering new alleles for crop improvement.', *International Journal of Agriculture & Biology*, vol. 14, no. 1.
4. Bernousi, I, Mardi, M, Bihamata, MR, Omid, S & Samadi, BY 2009, 'پایسته با ژن های مقاومت به بلایت فوزاریومی سنبله در گندم', *Identification of SSR markers linked to fusarium head blight resistance genes in wheat*, vol. 13, no. 47, p. 2009.
5. Brooks, FE 2008, 'Detached-leaf bioassay for evaluating taro resistance to *Phytophthora colocasiae*', *Plant Disease*, vol. 92, no. 1, pp. 126–131.
6. Collard, BCY, Jahufer, MZZ, Brouwer, JB & Pang, ECK 2005, 'An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts', *Euphytica*, vol. 142, no. 1–2, pp. 169–196.
7. Drenth, A & Guest, DI 2004, *Diversity and management of Phytophthora in Southeast Asia*, Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR).
8. Duval, M-F, Risterucci, A-M, Calabre, C, Le Bellec, F, Bunel, J & Sitbon, C 2009, 'Genetic diversity of Caribbean mangoes (*Mangifera indica* L.) using microsatellite markers', *Acta Horticulturae*, no. 820, pp. 183–188.
9. Efendi, D, Sukma, D & Pusparani, R 2017, 'Induction and proliferation of durian (*Durio zibethinus*) embryonic culture in media supplemented with auxin and cytokinin', *ISHS Acta Horticulturae*, vol. 1186, p. 3.
10. Emilda, D 2007, 'Prosedur pendeteksian cepat secara in vitro ketahanan varietas durian terhadap *Phytophthora palmivora*', *Buletin Teknik Pertanian*, vol. 12, no. 2, pp. 59–62.
11. Goldstein, DB & Weale, ME 2001, 'Population genomics: linkage disequilibrium holds the key', *Current Biology*, vol. 11, no. 14, pp. R576–R579.
12. Gómez, G, Álvarez, MF & Mosquera, T 2011, 'Association mapping, a method to detect quantitative trait loci: statistical bases Mapeo por asociación, un método para la detección de loci de rasgos cuantitativos: bases estadísticas', *Agronomía Colombiana*, vol. 29, no. 3, pp. 367–376.
13. Hafizah, RA, Adawiyah, R, Harahap, RM, Hannum, S & Santoso, PJ 2018, 'Aplikasi marka SSR pada keragaman genetik durian di Kabupaten Deli Serdang, Sumatera Utara', *AL-KAUNIYAH, Jurnal Biologi*, vol. 11, no. 1, pp. 50–57.
14. Hansen, M, Kraft, T, Ganestam, S, SAeLL, Torbjo & Nilsson, N-O 2001, 'Linkage disequilibrium mapping of the bolting gene in sea beet using AFLP markers', *Genetics Research*, vol. 77, no. 1, pp. 61–66.
15. Hasan, NM & Siew, L 2000, 'Integrated management of durian cancer', in Othman, S, Sapii, MS, Mahmood, AT, & Idris, Z (eds.), *Prosiding Seminar Durian 2000: Kearah Menstabilkan Pengeluaran Kualiti dan Pasaran*, Ipoh, Perak, Malaysia.
16. Huang, CL, Hwang, SY, Chiang, YC & Lin, TP 2008, 'Molecular evolution of the Pi-ta gene resistant to rice blast in wild rice (*Oryza rufipogon*)', *Genetics*, vol. 179, no. 3, pp. 1527–1538.
17. Indriyani, NLP, Santoso, PJ & Hermanto, C 2012, 'Pembentukan populasi pemuliaan durian (*Durio* sp.) melalui persilangan intra dan inter-species', in *Prosiding Seminar Nasional PERIPI 2012*, Bogor, pp. 478–484.
18. Johnson, C & Cullis, C 2012, 'Molecular linkage maps: strategies, resources and achievements', in Pillay, M, Ude, G & Kole, C (eds.), *Genetics, Genomics and Breeding of Bananas*, Science Publishers, Taylor and Francis Group, LLC, pp. 91–108.

19. Kouakou, CK, Timko, MP, Akanvou, R, Botanga, C, Skizim, N, Roy-Macauley, H & Konan, KC 2009, 'AFLP/SSR mapping of resistance genes to *Alectra vogelii* in cowpea (*Vigna unguiculata* L. WALP)', *Sciences & Nature Sci. Nat*, vol. 666, pp. 62–70.
20. Kraakman, ATW, Martinez, F, Mussiraliev, B, Van Eeuwijk, FA & Niks, RE 2006, 'Linkage disequilibrium mapping of morphological, resistance, and other agronomically relevant traits in modern spring barley cultivars', *Molecular Breeding*, vol. 17, no. 1, pp. 41–58.
21. Kraakman, ATW, Niks, RE, den Berg, PMMM, Stam, P & Van Eeuwijk, FA 2004, 'Linkage disequilibrium mapping of yield and yield stability in modern spring barley cultivars', *Genetics*, vol. 168, no. 1, pp. 435–446.
22. Laido, G, Marone, D, Russo, MA, Colecchia, SA, Mastrangelo, AM, De Vita, P & Papa, R 2014, 'Linkage disequilibrium and genome-wide association mapping in tetraploid wheat (*Triticum turgidum* L.)', *Plos ONE*, vol. 9, no. 4, p. e95211.
23. Lim, TK 1990, *Durian: diseases and disorders*, Tropical Press.
24. Michelmore, R, Paran, I & Kesseli, R 1991, 'Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations', in *Proc Natl Acad Sci USA*, pp. 88, 9828–9832.
25. Mulpuri, S, Liu, Z, Feng, J, Gulya, TJ & Jan, CC 2009, 'Inheritance and molecular mapping of a downy mildew resistance gene, PI 13 in cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.)', *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 119, no. 5, pp. 795–803.
26. Nuchuchua, O, Chaipompokin, W, Maktrirat, R, Phummiratch, D, Pongsamart, S & Sukrong, S 2008, 'Characterization of *Durio zibethinus* by molecular marker and soluble polysaccharide in fruit rinds', *Acta Horticulturae*, vol. 786, pp. 107–114.
27. O'Gara, E, Vawdrey, L, Martin, T, Sangchote, S, van Thanh, H, Binh, LN & Guest, DI 2004, 'Screening for resistance to *Phytophthora diversity and management of Phytophthora in Southeast Asia*, *ACIAR Monograph*, vol. 114, pp. 194–199.
28. Paterson, AH 1996, 'Making genetic maps', in Paterson, AH (ed.), *Genome mapping in plants*, Landes Company, San Diego, California, pp. 23–39.
29. Ritschel, PS, Cesar, T, Lins, DL, Tristan, RL, Salles, G, Buso, C, Buso, JA, Ferreira, ME, Lins, TCDL & Buso, GSC 2004, 'Development of microsatellite markers from an enriched genomic library for genetic analysis of melon (*Cucumis melo* L.)', *BMC Plant Biology*, vol. 4, p. 9.
30. Sales, EK 2015, 'Durian marker Kit for durian (*Durio zibethinus* Murr.) identity', *International Scholarly and Scientific Research & Innovation*, vol. 9, no. 5, pp. 497–507.
31. Sani, MA, Abbas, H, Buniamin, AH, Nordin, MF & Abdul Rashed, H 2015, 'Potensi durian hibrid MARDI: MDUR 88', *Buletin Teknologi MARDI*, vol. 8, pp. 71–79.
32. Santoso, PJ, Aryantha, INP, Pancoro, A & Suhandono, S 2015, 'Identification of *Pythium* and *Phytophthora* associated with durian (*Durio* sp.) in Indonesia: Their molecular and morphological characteristics and distribution', *Asian Journal of Plant Pathology*, vol. 9, no. 2.
33. Santoso, PJ & Hermanto, C 2017, 'Keragaan budidaya dan sebaran musim panen durian di Indonesia', in *Seminar Nasional 2016: Membangun Pertanian Modern dan Inovatif Berkelanjutan dalam Rangka Mendukung MEA*, Jambi, pp. 139–145.
34. Santoso, PJ, Indriyani, NLP, Istianto, M, Pancoro, A & Aryantha, INP 2017, 'Phylogeny of Indonesian durian (*Durio* sp.) germplasm based on polymorphism of ITS-nrDNA sequences', in: Somsri, S, Chapman, K & Sukhvibul, N (eds.), *Proceeding of the International Symposium on Durian and Other Humid Tropical Fruits*, Chanthaburi, Thailand. June 2–4, 2015. pp. 35–42.
35. Santoso, PJ, Pancoro, A, Suhandono, S & Aryantha, INP 2017, 'Development of simple-sequence repeats markers from durian (*Durio zibethinus* murr. cultv. Matahari) genomic library', *Agrivita*, vol. 39, no. 3.
36. Santoso, PJ, Purnomo, S & Djatnika, I 2014, 'Bab 21: sumber daya genetik durian: status pengelolaan dan pemanfaatan', *Sumber Daya Genetik Pertanian Indonesia: Tanaman Pangan, Perkebunan dan Hortikultura* (Jakarta), pp. 403–430.
37. Sivapalan, A, Hj Hamdan, F & Junaidy, M 1997, 'Patch canker of *Durio zibethinus* caused by *Phytophthora palmivora* in Brunei Darussalam', *Plant disease*, vol. 81, no. 1, p. 113.
38. Somsri, S 2014, 'Current status of durian breeding program in Thailand', *Acta Hort. (ISHS)*, vol. 1024, pp. 51–60.
39. Somsri, S, Vichitrananda, S, Kengkat, P, Koonjanthuk, P, Chuchim, S, Sesuma, S, Jintanawongse, S & Salakphet, S 2008, 'Three decades of durian breeding program in Thailand and its three newly recommended F1 hybrids', *Acta Horticulturae*.
40. Suksiri, S, Laipasas, P, Soyong, K & Poeaim, S 2018, 'Isolation and identification of *Phytophthora* sp. and *Pythium* sp. from durian orchard in Chumphon Province Thailand', *International Journal of Agricultural Technology*, vol. 14, no. 3, pp. 389–402.
41. Tan, SG, Tan, SW, Ng, WL, Alitheen, NB, Yeap, SK & Siew, GY 2018, 'Genetic variation and DNA finger printing of durian types in Malaysia using simple sequence repeat (SSR) markers', *PeerJ*, vol. 6, p. e4266.
42. Thanh, HV, Binh, LN & Chau, N 2002, 'Status of *Phytophthora disease on durian in the southern durian growing regions of Vietnam*', diunduh 10 Mei 2011, <http://www.sofri.ac.vn/english/research_program/2002/PhyDelta.pdf>.
43. Thompson, A 1934, 'A disease of durian trees', *The Malaysian Agricultural Journal*, vol. 22, pp. 369–371.
44. Thompson, A 1938, 'A root disease caused by *Pythium complectens* Braun', *The Malaysian Agricultural Journal*, vol. 26, pp. 460–464.
45. Vawdrey, LL, Langdon, P & Martin, T 2005, 'Incidence and pathogenicity of *Phytophthora palmivora* and *Pythium vexans* associated with durian decline in far Northern Queensland', *Australasian Plant Pathology*, vol. 34, no. 1, pp. 127–128.
46. Vawdrey, L L, Langdon, P & Martin, T 2005, 'Incidence and pathogenicity of *Phytophthora palmivora* and *Pythium vexans* associated with durian decline in far Northern Queensland', *Australasian Plant Pathology*, vol. 34, no. 1, pp. 127–128.
47. Vawdrey, LL, Martin, TM & De Faveri, J 2005, 'A detached leaf bioassay to screen durian cultivars for susceptibility to *Phytophthora palmivora*', *Australasian Plant Pathology*, vol. 34, no. 2, pp. 251–253.
48. Visioni, A, Tondelli, A, Francia, E, Psarayi, A, Malosetti, M, Russell, J, Thomas, W, Waugh, R, Pecchioni, N & Romagosa, I 2013, 'Genome-wide association mapping of frost tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.)', *BMC Genomics*, vol. 14, no. 1, p. 424.
49. Wu, C, Sun, S, Nimmakayala, P, Santos, FA, Meksem, K, Springman, R, Ding, K, Lightfoot, DA & Zhang, HB 2003, 'A BAC- and BIBAC-based physical map of the soybean genome', *Genome Research*, no. 14, pp. 319–326.

50. Yan, J, Warburton, M & Crouch, J 2011, 'Association mapping for enhancing Maize (*Zea mays* L.) genetic improvement', *Crop Sci.*, no. 59, pp. 433–449.
51. Zappala, G, Zappala, A & Diczbalis, Y 2002, 'Durian germplasm evaluation for tropical Australia, phase 1', *A Report for Rural Industries Research and Development Corporation, RIRDC Publication*.
52. Zhao, K, Tung, C-W, Eizenga, GC, Wright, MH, Ali, ML, Price, AH, Norton, GJ, Islam, MR, Reynolds, A, Mezey, J 2011, 'Genome-wide association mapping reveals a rich genetic architecture of complex traits in *Oryza sativa*', *Nature Communications*, vol. 2, no. 1, pp. 1–10.