

ANALISIS KERAGAMAN GENETIK *Phytophthora capsici* Leonian ASAL LADA (*Piper nigrum* L.) MENGGUNAKAN PENANDA MOLEKULER

Genetic Diversity Analysis of Phytophthora capsici Leonian from Pepper (Piper nigrum L.) by using molecular marker

CHAERANI¹⁾, SRI KOERNIATI¹⁾, dan DYAH MANOHARA²⁾

¹⁾ Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi
dan Sumberdaya Genetik Pertanian

Jalan Tentara Pelajar No. 3A, Bogor 16111

²⁾ Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat

Jalan Tentara Pelajar No. 3, Bogor 16111

e-mail : chaeran1@yahoo.com

(Diterima Tgl. 27-4-2012 – Disetujui Tgl. 29-1-2013)

ABSTRAK

Phytophthora capsici adalah penyebab penyakit busuk pangkal batang yang paling merugikan pada lada di Indonesia dan sulit dikendalikan karena dapat bertahan lama dalam tanah serta memiliki keragaman agresivitas isolat luas. Pengetahuan mengenai keragaman genetik strain-strain *P. capsici* dapat membantu perancangan strategi efektif pengelolaan patogen. Penelitian ini bertujuan mengevaluasi keragaman dan struktur genetik isolat-isolat *P. capsici* asal lada menggunakan penanda RAPD. Penelitian dilaksanakan pada bulan Oktober 2009 sampai April 2010 di Laboratorium Biokimia BB Biogen dan Laboratorium Hama dan Penyakit Balitro. Keragaman genetik 59 isolat *P. capsici* yang berasal dari koleksi kultur tahun 1982-2009 dari 37 lokasi di Sumatera, Bangka, Jawa, dan Kalimantan, dikarakterisasi menggunakan enam primer RAPD. Pengelompokan menggunakan *unweighted pair-group method with arithmetic averaging* (UPGMA) berdasarkan profil RAPD membagi ke-59 isolat ke dalam lima gerombol utama; yang menunjukkan adanya keragaman genetik tinggi antar isolat. Pengelompokan RAPD tidak berkaitan dengan asal lokasi isolat. *Analysis of molecular variance* (AMOVA) juga menunjukkan adanya keragaman genetik yang tinggi di antara isolat-isolat *P. capsici*, dengan ragam genetik total sebesar 96% terletak di dalam masing-masing pulau (*within populations*). Namun demikian, terdapat ragam genetik antar isolat dari pulau berbeda (*among populations*) yang signifikan (4% ; $P=0,001$), yaitu antar populasi di Sumatera dan Bangka dengan jarak genetik sebesar 0,081 ($P=0,002$). Ketidakterkaitan antara pengelompokan RAPD dengan asal lokasi geografik isolat dan ragam genetik yang tinggi dalam satu pulau dapat diakibatkan oleh terjadinya penyebaran isolat antar daerah, terutama melalui bibit tanaman yang terinfestasi *P. capsici*. Pencegahan penyebaran isolat antar pulau perlu dilakukan melalui sertifikasi bibit bebas penyakit BPB dan pengembangan sistem perbenihan lokal.

Kata kunci: lada, penyakit busuk pangkal batang, *Phytophthora capsici*, RAPD, keragaman genetik, struktur populasi

ABSTRACT

Phytophthora capsici is the causal agent of foot rot, the most destructive disease of pepper in Indonesia and difficult to control. Knowledge in the genetic structure of *P. capsici* strains can enrich designing effective disease management strategies. This study was aimed at analyzing the genetic variability and structure of *P. capsici* isolates from pepper using RAPD. The study was done from October 2009 until April 2010 at the Biochemical Laboratory of Indonesian Center for Agricultural

Biotechnology and Genetic Resources Research and Development, and the Plant Pest and Disease Laboratory of the Indonesian Research Institute of Spice and Medicinal Crops. Fifty-nine isolates collected from 1982 to 2009 from Sumatera, Bangka, Java, and Kalimantan were characterized based on six RAPD markers. Unweighted pair-group method with arithmetic averaging (UPGMA) clustering based on RAPD profiles divided the isolates into five major cluster, which indicated high genetic variability among isolates. No apparent relationship between RAPD clustering and geographic origin of isolate was observed. Hierarchical partitioning of genetic variation using analysis of molecular variance (AMOVA) confirmed the overall high variability among isolates, with 96% of total genetic variance was resided among isolates within islands (within populations). Nevertheless, a small (4%) but significant ($P=0.001$) genetic variance among isolates between different islands (among populations) were observed, which was detected between populations in Sumatera and Bangka with genetic distance (Φ_{PT}) as high as 0,081 ($P=0,002$). The lack of association between RAPD clustering and geographic origin as well as high genetic variance within populations may have been the result of movement of isolates between locations, most likely through infested plant cuttings. Use of certified and development of blackpepper clones locally are required to prevent disease spread among islands.

Keywords: black pepper, foot rot disease, *Phytophthora capsici*, genetic diversity, RAPD, population structure

PENDAHULUAN

Busuk pangkal batang (BPB) yang disebabkan oleh *Phytophthora capsici* Leonian merupakan penyakit yang paling mematikan pada lada (*Piper nigrum* L.) di Indonesia. Kerugian akibat kematian tanaman lada pada tahun 2010 diperkirakan senilai Rp. 16 milyar (DIREKTORAT PERLINDUNGAN PERKEBUNAN, 2011). Ketika epidemi BPB terjadi, petani lada, yang pada umumnya bermodal kecil, tidak mampu merawat kebunnya sehingga penyebaran penyakit semakin meningkat.

P. capsici merupakan patogen tular tanah yang memiliki spektrum inang luas (MEITZ *et al.*, 2010). Patogen ini dapat menginfeksi semua stadia tanaman. Akan

tetapi, infeksi *P. capsici* pada akar merupakan infeksi yang paling berbahaya karena dapat menyebabkan kematian tanaman (ALCONERO *et al.*, 1971; MANOHARA *et al.*, 2005). *P. capsici* merupakan spesies heterotalik yang membutuhkan dua tipe kawin (A1 dan A2) untuk menyelesaikan siklus seksualnya menghasilkan oospora yang berguna untuk bertahan hidup dan menghasilkan individu baru (LAMOUR dan HAUSBECK, 2001; MEITZ *et al.*, 2010). Kedua tipe kawin ditemukan di Indonesia, tetapi A2 terdeteksi dalam frekuensi lebih rendah daripada A1 (MANOHARA *et al.*, 2004b). Fase aseksualnya sangat merusak karena zoospora dapat menyebabkan infeksi polisiklik dalam kondisi lingkungan yang sesuai (LAMOUR dan HAUSBECK, 2001).

Pengendalian penyakit BPB telah diusahakan dengan berbagai cara, yaitu menggunakan varietas tahan, praktek budidaya yang dikombinasi dengan aplikasi fungisida, dan mikroba antagonistik. Namun, berbagai upaya pengendalian tersebut masih kurang berhasil (MULLER, 1936; WAHYUNO *et al.*, 2003; MANOHARA *et al.*, 2004a, MANOHARA *et al.*, 2004b). Adanya keragaman agresivitas yang tinggi di antara isolat *P. capsici* diduga menjadi penyebab tidak berhasilnya pemuliaan ketahanan dan aplikasi fungisida terhadap patogen ini (SILVAR *et al.*, 2006; WAHYUNO *et al.*, 2010).

Oleh karena itu, diperlukan upaya sebagai dasar strategi pengendalian yang efektif. Salah satunya adalah dengan penanda molekuler untuk melihat keragaman dan struktur genetik populasi patogen. Analisis keragaman dan struktur genetik populasi patogen melalui penanda molekuler dapat memberikan informasi mengenai perubahan populasi, epidemiologi penyakit, besarnya (*magnitude*), dan sebaran keragaman genetik di dalam dan antar populasi patogen (LEUNG *et al.*, 1993; McDONALD, 1997).

Penanda molekuler sering digunakan untuk analisis keragaman dan struktur genetik populasi karena diasumsikan bersifat netral (tidak terpengaruh oleh lingkungan) dan tersebar secara acak di dalam genom. Polimorfismenya berada pada tingkat DNA, yang berasal dari substitusi pasangan nukleotida, delesi, inversi, dan translokasi (WANG dan POWELL, 1992). Di antara sejumlah penanda molekuler, *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) merupakan sistem penanda yang secara teknis paling mudah, cepat, dan murah. Sistem penanda molekuler ini didasarkan pada primer acak yang mengamplifikasi fragmen DNA di seluruh genom sehingga cocok untuk analisis genetik total (WELSH dan McCLELLAND, 1990; WILLIAMS *et al.*, 1990).

Kajian keragaman genetik *P. capsici* asal komoditas sayuran menggunakan penanda molekuler telah banyak dilakukan (LAMOUR dan HAUSBECK 2001, 2003; ISLAM *et al.*, 2005; SILVAR *et al.*, 2006; SUN *et al.*,

2008; WANG *et al.*, 2009; DUNN *et al.*, 2010; MEITZ *et al.*, 2010; GOBENA *et al.*, 2011; QUESADA-OCAMPO *et al.*, 2011), tetapi hanya ada satu kajian serupa untuk isolat asal lada, yaitu dari Vietnam (TRUONG *et al.*, 2009). Sementara itu, kajian keragaman molekuler *P. capsici* belum pernah dilaporkan di Indonesia.

Penyebaran *P. capsici* di Indonesia diduga mengikuti penyebaran tanaman lada yang kini banyak ditanam di Bangka, Sumatera, Kalimantan, Jawa, dan Sulawesi. Pemisahan kelompok-kelompok isolat *P. capsici* secara genetik antar daerah penanaman lada ataupun pulau diduga telah terjadi sebagai akibat seleksi klon lada yang dilakukan oleh manusia secara terarah maupun seleksi secara alamiah sebagai respon terhadap kondisi ekologi setempat. Seleksi inang merupakan faktor pembentuk struktur populasi patogen yang paling evolusioner. Hal ini disebabkan sifat artifisial agroekosistem yang homogen dengan penanaman komoditas tunggal secara luas dan periodik dapat menghasilkan seleksi terarah pada genotipe patogen tertentu, yang biasanya mengarah pada sifat virulensi lebih tinggi (LEUNG *et al.*, 1993; BARNETT *et al.*, 2008; QUESADA-OCAMPO *et al.*, 2011). Tujuan penelitian ini ialah mengevaluasi keragaman dan struktur genetik *P. capsici* asal lada menggunakan penanda RAPD.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan pada bulan Oktober 2009 sampai April 2010 di Laboratorium Biokimia Balai Besar Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian serta Laboratorium Hama dan Penyakit Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat, Bogor.

Isolasi *Phytophthora capsici*

Penelitian ini menggunakan 59 isolat *P. capsici*. Isolat-isolat tersebut berasal dari koleksi kultur hasil isolasi pada tahun 1982 sampai 2009 dari tanaman sakit atau tanah di 37 lokasi di empat pulau (Sumatera, Bangka, Jawa, dan Kalimantan; Tabel 1). Identifikasi spesies untuk sebagian besar isolat telah dilakukan sebelumnya berdasarkan morfologi koloni dan karakteristik sporangia (Wahyuno *et al.*, 2007). Identitas spesies dikonfirmasi menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan pasangan primer spesifik *P. capsici* PCAP dan ITS1 mengikuti prosedur RISTAINO *et al.* (1998). Pasangan primer spesifik tersebut mengamplifikasi fragmen DNA berukuran 172 bp pada ribosom (data tidak diperlihatkan). Isolat dibiakkan pada media agar V8 *juice* jernih (*clarified* V8 *juice* agar medium) (RIBEIRO, 1978) selama 7 sampai 10 hari pada suhu kamar di bawah pencahayaan lampu TL.

Tabel 1. Asal lokasi isolat *P. capsici* dari lada (*P. nigrum*)
 Table 1. Origin of *P. capsici* isolates from pepper (*P. nigrum*)

Isolat <i>Isolate</i>	Sumber isolasi ¹ <i>Source of isolation¹</i>	Lokasi/kebun <i>Location/farm</i>	Provinsi <i>Province</i>	Pulau <i>Island</i>	Tahun koleksi <i>Year collected</i>	Tipe kawin <i>Mating type</i>
Bd1	1	Kaur	Bengkulu	Sumatera	2001	A1
Bd2	1	Manna	Bengkulu	Sumatera	2001	A1
Bd4	1	Kaur	Bengkulu	Sumatera	2001	A1
Lp1	2	KP Cahaya Negeri	Lampung	Sumatera	2007	A1
Lp30	2	KP Cahaya Negeri	Lampung	Sumatera	2003	A1
Lp34	2	KP Cahaya Negeri	Lampung	Sumatera	2002	A1
Lp36	2	KP Cahaya Negeri	Lampung	Sumatera	2004	A1
Lp41	2	KP Cahaya Negeri	Lampung	Sumatera	2007	A1
Lp43	2	KP Cahaya Negeri	Lampung	Sumatera	2007	A1
Lp45	2	KP Cahaya Negeri	Lampung	Sumatera	2007	A1
Lp48	2	KP Cahaya Negeri	Lampung	Sumatera	2008	A1
Lp52	2	KP Cahaya Negeri	Lampung	Sumatera	2006	A1
Lp3	1	Sukadana	Lampung	Sumatera	2002	A1
Lp7	1	Sukadana	Lampung	Sumatera	2002	A1
Lp8	1	Sukadana	Lampung	Sumatera	2002	A1
N1	2	Sukadana	Lampung	Sumatera	1990	A1
Lp6	1	Menjukut	Lampung	Sumatera	2002	A1
Lp14	1	Negeri Toho	Lampung	Sumatera	2002	A1
Lp27	3	Talangkakri	Lampung	Sumatera	2002	A1
N2	3	Tanjungraja	Lampung	Sumatera	1982	A1
N4	2	KP Natar	Lampung	Sumatera	1992	A2
B3	2	Petaling	Bangka-Belitung	Bangka	2000	A1
B16	1	Petaling	Bangka-Belitung	Bangka	2001	A1
B64	2	Petaling	Bangka-Belitung	Bangka	2009	A1
B4	2	Puput	Bangka-Belitung	Bangka	1989	A1
B12	1	Nangka	Bangka-Belitung	Bangka	2001	A1
B18	2	Kelapa	Bangka-Belitung	Bangka	2001	A1
B33	2	Tukak	Bangka-Belitung	Bangka	1989	A1
B35	4	Tukak	Bangka-Belitung	Bangka	1989	A1
B36	4	Tukak	Bangka-Belitung	Bangka	1989	A1
B40	1	Tukak	Bangka-Belitung	Bangka	1989	A1
B41	3	Tebet Apin	Bangka-Belitung	Bangka	1989	A1
B44	2	Simpangkates	Bangka-Belitung	Bangka	1992	A1
B57	2	Simpangkates	Bangka-Belitung	Bangka	1992	A1
B48	2	Nadung	Bangka-Belitung	Bangka	1992	A1
B56	2	Toboali	Bangka-Belitung	Bangka	1992	A1
B62	1	Kenanga	Bangka-Belitung	Bangka	2002	A1
B63	2	Bemban	Bangka-Belitung	Bangka	2001	A1
T16	1	Bemban	Bangka-Belitung	Bangka	2001	A1
T28	1	Belinyu	Bangka-Belitung	Bangka	2001	A1
J2	3	Karawang	Jawa Barat	Jawa	2001	A1
R2	5	Cimanggu	Jawa Barat	Jawa	1990	A1
S5	3	Dramaga	Jawa Barat	Jawa	2004	A2
S1	2	Sumedang	Jawa Barat	Jawa	1989	A2
S4	3	Sukamulya	Jawa Barat	Jawa	1997	A2
J1	3	Jember	Jawa Timur	Jawa	1991	A2
K10	2	Mandor	Kalimantan Barat	Kalimantan	1990	A1
K13	2	Kaliasin Luar	Kalimantan Barat	Kalimantan	1990	A1
K18	2	Roban	Kalimantan Barat	Kalimantan	1990	A1
K19	2	Sekip Baru 1	Kalimantan Barat	Kalimantan	1990	A1
K20	2	Sekip Baru 1	Kalimantan Barat	Kalimantan	1990	A1
K2	2	Sanggauledo	Kalimantan Barat	Kalimantan	1989	A1
K4	2	Capkala	Kalimantan Barat	Kalimantan	1989	A1
K7	2	Lamat Selamat	Kalimantan Barat	Kalimantan	1990	A1
K8	2	Ketiak	Kalimantan Barat	Kalimantan	1990	A1
K25	4	Pangkalanbun	Kalimantan Tengah	Kalimantan	1991	A1
K38	2	Batuah	Kalimantan Timur	Kalimantan	2004	A2
K39	2	Batuah	Kalimantan Timur	Kalimantan	2004	A1
K40	2	Batuah	Kalimantan Timur	Kalimantan	2004	A1

¹1 = tanah/soil, 2 = daun/leaf, 3 = pangkal batang/stem base, 4 = sulur/vine, 5 = buah/fruit.

Isolasi DNA

Tiap isolat ditumbuhkan dalam 25 ml V8 juice jernih (*clarified V8 juice*) dalam labu Erlenmeyer 200 ml selama 5 sampai 7 hari pada keadaan gelap tanpa digoyang pada suhu kamar. Miselia dipanen setelah dipisahkan dari media menggunakan kertas saring Whatman No. 1 dan dibilas dengan akuades steril. DNA genomik diekstraksi dari miselia menggunakan bufer ekstraksi SDS (0,5% SDS; 200 mM Tris-HCl pH 7,5; 250 mM NaCl; dan 25 mM EDTA) mengikuti prosedur dari COOKE and DUNCAN (1997). Lebih kurang 0,1 g miselia digerus menggunakan pestel dalam mortar yang berisi 750 µl bufer ekstraksi SDS dan 10 mg PVPP. DNA dipisahkan dari protein menggunakan PCIA (25:24:1) kemudian diendapkan menggunakan isopropanol dingin, dibilas dengan etanol 70%, ditambah RNAase (5 mg/ml), dikeringanginkan, dan terakhir di-rehidrasi dengan bufer TE (10 mM Tris-HCl dan 1,0 mM EDTA; pH 8,0). Konsentrasi DNA diukur menggunakan spektrofotometer pada absorbansi 260 nm kemudian diencerkan menjadi 5 ng/µl.

Analisis RAPD

Sepuluh primer 10-mer (Operon Tech., Alameda, CA), lima di antaranya telah digunakan oleh ISLAM *et al.* (2005), ditapis menggunakan DNA tiga isolat *P. capsici* dengan tingkat agresivitas berbeda. Enam primer (OP-A3, OP-A4, OP-A10, OP-A11, OP-C5, dan OP-D04), termasuk lima primer yang digunakan oleh ISLAM *et al.* (2005), dapat mengamplifikasi DNA secara konsisten dan menghasilkan pita DNA yang jelas dalam PCR. Keenam primer tersebut selanjutnya digunakan untuk mengamplifikasi DNA ke 59 isolat *P. capsici* dan empat isolat pembanding, yang digunakan sebagai *outgroup* dalam analisis klaster, yaitu satu isolat *P. capsici* dari cabai merah (*Capsicum annuum*), dan masing-masing satu isolat *P. infestans* dari terung (*Solanum melongena*), *P. nicotianae* dari tembakau (*Nicotiana tabacum*), dan *P. palmivora* dari kakao (*Theobroma cacao*). PCR dilakukan dalam volume 25 µl yang mengandung 30 ng DNA; 1× bufer PCR; 0,1 mM dNTP; 3,5 mM MgCl₂; 0,6 µM primer; dan 0,4 U *Taq* polymerase (Vivantis). Amplifikasi DNA dilakukan dalam mesin PCR (T1 Thermocycler, Biometra, England) dengan tahapan reaksi sebagai berikut: pra-denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik; diikuti dengan 40 siklus tahapan yang terdiri dari denaturasi pada 92°C selama 30 detik, penempelan primer pada 35°C selama 1 menit, dan perpanjangan basa pada 72°C selama 2 menit; kemudian diakhiri dengan satu siklus perpanjangan basa akhir pada 72°C selama 10 menit. Produk PCR dipisahkan secara elektroforesis pada gel agarose 1,5% pada tegangan konstan 70V dalam bufer TBE 0,5× (5,4 g *Tris-base*; 2,75 g *boric acid*; dan 50 mM EDTA) selama 4 jam. Fragmen DNA divisualisasi di bawah cahaya UV (ChemiDoc XRS, Bio-

Rad) setelah perendaman gel dalam larutan ethidium bromide (0,5 µg/ml).

Analisis Data

Keberadaan dan ketiadaan pita DNA secara berurutan dikode biner '1' dan '0'. Matriks data biner disiapkan untuk tiap kombinasi isolat dan penanda RAPD kemudian digunakan untuk penghitungan kekerabatan genetik antar isolat menggunakan metode *simple matching* (SM) yang terdapat dalam modul SimQual dari piranti lunak NTSYSpc 2.02 (Applied Biostatistics Inc.). Matriks kesamaan genetik selanjutnya digunakan untuk analisis gerombol menggunakan algoritme *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA) yang terdapat pada modul *Sequential Algorithm Hierarchical Nested* (SAHN) dari NTSYSpc.

Profil RAPD selanjutnya digunakan untuk mengevaluasi struktur populasi isolat menggunakan analisis ragam molekuler (*Analysis of Molecular Variance*, AMOVA) yang tersedia dalam piranti lunak GenAlex 6.41 (PEAKALL dan SMOUSE, 2009). AMOVA membagi ragam genetik total menjadi ragam antar isolat di dalam populasi (*within populations*) dan antar isolat dari populasi berbeda (*among populations*). Isolat-isolat yang berasal dari satu pulau diasumsikan merupakan satu populasi. Rasio ragam antar populasi terhadap ragam total, atau disebut juga jarak genetik antar-populasi (Φ_{PT}), mengestimasi tingkat perbedaan genetik antar populasi. Signifikansi Φ_{PT} , yang analog dengan indeks fiksasi F_{st} (HARTL dan CLARK, 1997), diuji menggunakan 999 permutasi acak. Nilai-nilai Φ_{PT} juga dibandingkan secara berpasangan antar populasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Polimorfisme Penanda RAPD

Keenam primer RAPD mengamplifikasi 89 penanda di antara 59 isolat *P. capsici*, 87 pita di antaranya bersifat polimorfik (Tabel 2). Jumlah penanda polimorfik yang diamplifikasi tiap primer berkisar antara 6 (OP-D04) sampai 20 (OP-A11) dengan kisaran ukuran dari 0,35 kb hingga 2,50 kb. Jumlah penanda yang teramplifikasi dan tingkat polimorfisme dari tiap-tiap primer berkorelasi erat dengan kisaran ukuran fragmen DNA yang dihasilkan (R^2 berturut-turut 0,88 dan 0,93; $P < 0,05$). Tingginya jumlah dan tingkat polimorfisme penanda yang diperoleh dari analisis RAPD dapat disebabkan oleh dua hal. Pertama, panjang primer RAPD yang hanya 10 basa menciptakan banyak situs penempelan primer sehingga peluang teramplifikasinya fragmen DNA yang diapit primer menjadi besar. Kedua, penanda ini mendeteksi fragmen DNA secara acak di seluruh genom, bukan daerah spesifik dalam genom atau daerah yang tidak berkaitan dengan ekspresi gen atau fenotipe tertentu (CHEE DAN JEE, 2001).

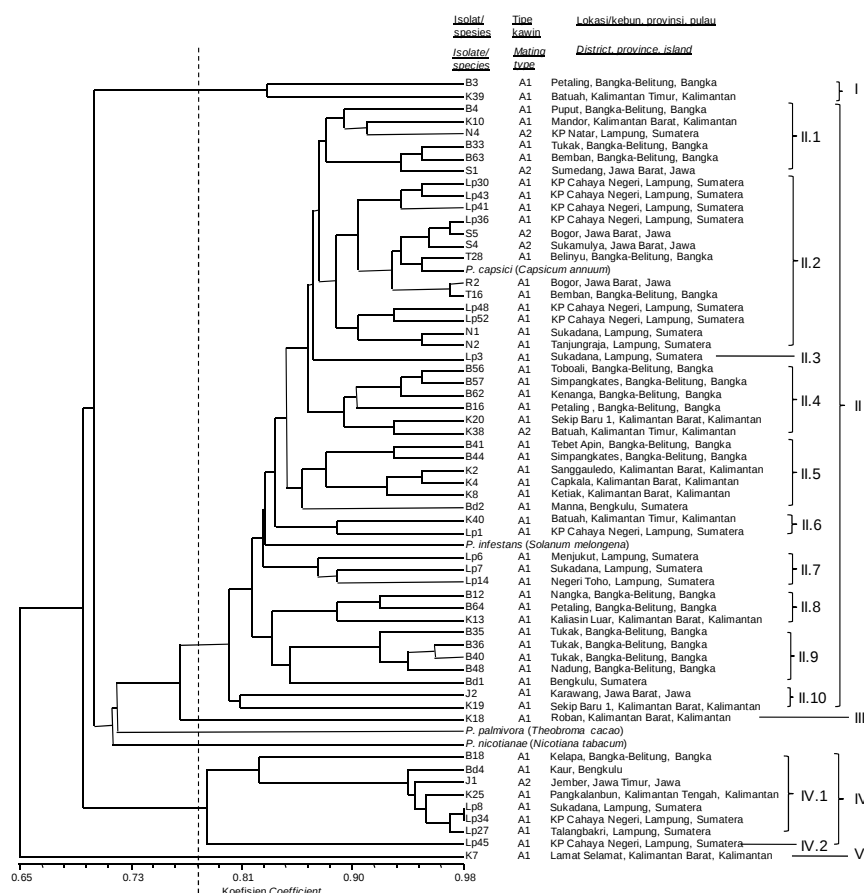
Tabel 2. Jumlah pita DNA hasil amplifikasi DNA 59 isolat *P. capsici* asal lada (*P. nigrum*) dengan enam primer RAPD
 Table 2. Number of bands generated among 59 *Phytophthora capsici* isolates from pepper (*P. nigrum*) by six 10-mer RAPD primers

Primer Primer	Urutan basa (5'-3') Sequence (5'-3')	Jumlah pita Number of bands	Jumlah pita polimorfik Number of polymorphic bands	Kisaran ukuran (kb) Range of size (kb)
OP-A03	AGTCAGCCAC	16	16	0,53–2,40
OP-A04	AATCGGGCTG	16	16	0,35–2,00
OP-A10	GTGATCGCAG	13	13	0,55–2,25
OP-A11	CAATCGCCGT	20	20	0,40–2,50
OP-C15	GACGGATCAG	16	16	0,53–2,30
OP-D04	TCTGGT GAGG	8	6	0,80–1,50
Total		89	87	
Total				

Pengelompokan Isolat *P. capsici* Berdasarkan Profil RAPD

Koefisien kesamaan genetik ke-59 isolat berkisar dari 0,48 sampai 0,98 dengan rata-rata 0,79. Pada koefisien kesamaan genetik 0,78; terlihat lima gerombol utama profil RAPD isolat-isolat *P. capsici*, yang berarti bahwa isolat-isolat yang dipelajari termasuk memiliki keragaman genetik tinggi (Gambar 1). Gerombol I terdiri atas dua isolat (B3

and K39), Gerombol II terdiri atas sebagian besar isolat *P. capsici* (47) termasuk isolat dari cabai merah dan *P. infestans*. Gerombol III dan V masing-masing terdiri dari hanya satu isolat (berturut-turut K18 dan K7), dan gerombol IV terdiri atas delapan isolat. Gerombol II dan IV secara berurutan terbagi lagi menjadi 10 dan dua kelompok minor.



Gambar 1. Dendrogram hasil analisis menggunakan *unweighted pair group method with arithmetic averages* (UPGMA) 59 isolat *Phytophthora capsici* asal lada (*Piper nigrum*) berdasarkan matriks koefisien kesamaan *simple matching* (SM) menggunakan profil *random amplified polymorphic DNA* (RAPD) yang dihasilkan oleh enam primer.

Figure 1. *Unweighted pair group method with arithmetic averages* (UPGMA) cluster analysis of *Phytophthora capsici* isolates from black pepper (*Piper nigrum*) based on *simple matching* similarity coefficient using six *random amplified polymorphic DNA* (RAPD) primers.

Isolat-isolat *P. capsici* asal Bengkulu, Lampung, Bangka, dan Jawa masing-masing tersebar dalam dua gerombol RAPD. Isolat-isolat asal Lampung kurang beragam karena meskipun jumlahnya banyak (18), tersebar hanya dalam dua gerombol. Diduga patogen ini tersebar di Lampung melalui bibit lada yang kebanyakan berasal dari Kebun Percobaan (KP.) Cahaya Negeri. Di antara keenam isolat dari Pulau Jawa, J1 yang merupakan satu-satunya isolat dari Jawa Timur, berjarak genetik jauh dari isolat-isolat Jawa Barat. Kelima isolat Jawa Barat mengelompok bersama-sama dengan sebagian besar isolat Lampung dalam gerombol II, sedangkan isolat J1 mengelompok bersama-sama dengan empat isolat Lampung dalam gerombol IV. Menurut sejarahnya, bibit tanaman lada di Pulau Jawa didatangkan dari Provinsi Lampung. Isolat-isolat *P. capsici* asal Kalimantan adalah yang paling beragam karena terbagi dalam empat gerombol RAPD.

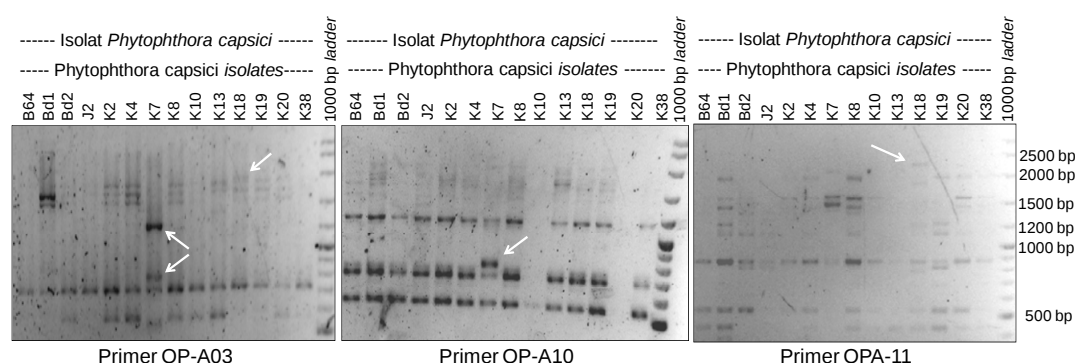
Dari semua isolat *P. capsici*, dua isolat asal Lampung (Lp8 asal Sukadana dan Lp34 asal Cahaya Negeri), yang keduanya bertipe kawin A1, adalah yang paling mirip genotipe RAPD-nya. Sementara itu, dua isolat asal Kalimantan, yaitu K7 dan K18, adalah yang paling jauh jarak genetiknya dari isolat-isolat lainnya dan membentuk gerombol tersendiri, bahkan terpisah dari *P. palmivora* dan *P. nicotianae*. Profil pita RAPD dari kedua isolat ini jelas menunjukkan perbedaannya (Gambar 2). Identifikasi isolat sebelumnya oleh WAHYUNO *et al.* (2007) menunjukkan bahwa karakter morfologi dan morfometrik K7 dan K18 berada dalam kisaran yang dimiliki oleh *P. capsici*. Ada kemungkinan bahwa spesies selain *P. capsici* menginfeksi lada. MANOHARA dan SATO (1992) mengidentifikasi satu isolat dari lada yang bentuk sporangianya lebih menyerupai sporangia *P. nicotianae* daripada *P. capsici*. Primer spesifik *P. capsici* yang dirancang oleh RISTAINO *et al.* (1998) ternyata gagal mendeterminasi identitas isolat K7 dan K18 dengan benar (data tidak diperlihatkan). Identifikasi lebih lanjut menggunakan primer spesifik genus *Phytophthora* dikombinasi dengan teknik peruntutan rDNA dan kunci

molekuler berdasarkan digesti restriksi amplikon PCR (DRENTH *et al.*, 2006) atau menggunakan primer spesifik *P. capsici* lain yang dirancang oleh ZHANG *et al.* (2008) diharapkan dapat mengungkap identitas spesies yang benar dari kedua isolat tersebut.

Dugaan bahwa isolat-isolat *P. capsici* asal lada terpisah secara genetik berdasarkan asal daerah tidak terbukti dalam kajian ini. Hal ini terlihat dari hasil pengelompokan berdasarkan profil RAPD *P. capsici* yang tidak berkaitan dengan asal daerah (Gambar 1). Kecuali Gerombol III dan V, semua gerombol beranggotakan isolat dari sedikitnya dua pulau. Ketidadaan asosiasi antara lokasi pengambilan sampel dengan profil molekuler *P. capsici* juga dilaporkan pada komoditas sayuran oleh CHEE and JEE (2001), ISLAM *et al.* (2005), GEVENS *et al.* (2007), dan SILVAR *et al.* (2006). Hal ini dimungkinkan karena penanda molekuler bersifat netral dan tidak tergantung pada faktor lingkungan atau seleksi inang sehingga mendeteksi keragaman total di dalam genom (CHEE and JEE, 2001; SILVAR *et al.*, 2006). Alasan lainnya ialah kemungkinan adanya introduksi atau pertukaran isolat *P. capsici* antar daerah, yang kemungkinan besar melalui bibit lada yang terinfestasi patogen ini. *P. capsici* tidak mampu menyebar melalui udara sehingga cara penyebaran propagulnya adalah melalui air, bahan tanaman, tanah, atau peralatan pertanian yang terinfestasi (GOODWIN, 1997; CHEE and JEE, 2001; HAUSBECK dan LAMOUR, 2004; GRANKE *et al.*, 2009).

Struktur Genetik Isolat *P. capsici*

Hasil AMOVA menunjukkan bahwa sebagian besar ragam genetik (96%) disebabkan oleh perbedaan antar isolat *P. capsici* dalam satu pulau (*within populations*) ketimbang antar isolat dari pulau berbeda (*among populations*) yang hanya 4% ($P=0,010$; Tabel 3.). Dengan demikian, hipotesis semula tentang adanya pemisahan isolat-isolat *P. capsici* antar pulau sebagai akibat hasil adaptasi secara lokal tidak terbukti. Tingginya ragam



Gambar 2. Sebagian gel agarose yang memperlihatkan profil pita *random amplified polymorphic DNA* (RAPD) dari isolat *Phytophthora capsici* asal lada (*Piper nigrum*) yang dihasilkan oleh primer OP-A03, OP-A11, dan OP-A10. Tanda panah menunjukkan penanda spesifik untuk isolat K7 dan K18.

Figure 2. Portions of agarose gel showing *random amplified polymorphic DNA* (RAPD) profiles generated by primer OP-A03, OP-A10, and OP-A11 for *Phytophthora capsici* isolates from black pepper (*Piper nigrum*). Arrows indicate specific markers for isolate K7 and K18.

genetik dalam populasi diduga diakibatkan oleh penyebaran isolat antar daerah dalam satu pulau, misalnya melalui bibit tanaman. Sebaliknya, ragam genetik (4%) atau nilai Φ_{PT} yang kecil (0,037) antar isolat dari pulau berbeda konsisten dengan perilaku penyebaran *P. capsici* yang secara alami terbatas sehingga frekuensi perkawinan silang antar tipe kawin rendah (GOODWIN, 1997; CHEE and JEE, 2001; HAUSBECK dan LAMOUR, 2004; GRANKE *et al.*, 2009). Φ_{PT} analog dengan indeks fiksasi (F_{st}), dimana nilai $F_{st} < 0,05$ menunjukkan perbedaan genetik yang kecil antar populasi (DUNN *et al.*, 2010). Rasio ragam antar populasi terhadap ragam total yang kecil (4%) tetapi signifikan ini ($P=0,010$) menunjukkan bahwa isolat-isolat *P. capsici* agak terdiferensiasi/terstruktur, yang tidak terdeteksi dari hasil pengelompokan menggunakan UPGMA. Perbandingan nilai-nilai Φ_{PT} secara berpasangan antar populasi *P. capsici* memperlihatkan bahwa populasi *P. capsici* di Sumatera dan Bangka berjarak genetik terjauh ($\Phi_{PT}=0,081$; $P=0,002$) (Tabel 4). Hal inilah yang diduga menyumbang pada sedikit terstrukturnya populasi *P. capsici*. Meskipun kedua pulau berdekatan secara geografik, perbedaan genetik populasi *P. capsici* antar kedua pulau dapat terbentuk oleh adanya perbedaan praktek budidaya termasuk varietas yang ditanam dan terbatasnya introduksi isolat antar kedua pulau.

Rata-rata nilai Φ_{PT} secara berpasangan antar populasi *P. capsici* berkisar antara 0,000 sampai 0,081 dengan rata-rata 0,030, yang berarti bahwa hanya 3% dari total ragam genetik terletak pada ragam genetik antar pulau (*among populations*) (Tabel 4). HARTL dan CLARK (1997) menyatakan bahwa jika hanya sejumlah kecil individu per generasi yang bermigrasi maka biasanya $F_{st} \leq 0,10$ atau keragaman genetik antar populasi tetap rendah. Ragam genetik yang kecil antar populasi diduga disebabkan oleh rendahnya frekuensi persilangan antar tipe kawin dari isolat-isolat yang dikaji dalam penelitian ini. Lebih lanjut, hal ini disebabkan karena rendahnya frekuensi introduksi isolat antar kedua pulau. Rasio tipe kawin dari isolat-isolat yang diteliti jauh dari rasio ideal 1:1 untuk terjadinya perkawinan secara acak (DUNN *et al.*, 2010). Dalam kajian TRUONG *et al.* (2009), kedua tipe kawin *P. capsici* ditemukan di Vietnam dengan frekuensi A2 yang 3 atau 5 kali lebih banyak daripada A1. Pada daerah dimana kedua tipe kawin ditemukan, bahkan kadang kala dalam kebun yang sama, keragaman genetik *P. capsici* terlihat lebih tinggi, yang mungkin diakibatkan oleh hasil

perkawinan silang. Sementara itu, dalam kajian ini, tipe kawin A1 terdeteksi lebih jarang. Akan tetapi, hal ini mungkin lebih dikarenakan tidak berimbangannya jumlah sampel yang diteliti. Di lain pihak, keragaman genetik yang tinggi antar isolat di dalam populasi, selain disebabkan oleh introduksi isolat, juga bisa timbul melalui reproduksi secara aseksual, yaitu perpindahan silang secara mitotik serta rekombinasi paraseksual, konversi gen, elemen tambahan pada kromosom, dan mutasi (SILVAR *et al.*, 2006). Untuk mendapatkan bukti genetik terjadinya reproduksi seksual di alam maupun perpindahan silang secara mitotik, diperlukan sistem penanda molekuler yang diwariskan secara kodominan (dapat membedakan individu homosigot dari heterosigot), seperti *Simple Sequence Repeat* (SSR) dan jumlah sampel yang besar (SILVAR *et al.*, 2006; MEITZ *et al.*, 2010).

Tabel 4. Perbandingan jarak genetik secara berpasangan antar isolat *Phytophthora capsici* asal lada (*Piper nigrum*) berdasarkan analysis of molecular variance (AMOVA).

Table 4. Pairwise genetic differentiation among groupings of 59 *Phytophthora capsici* isolates from black pepper (*Piper nigrum*) based on analysis of molecular variance (AMOVA).

	Sumatera	Populasi ¹ Population ¹		
		Bangka	Jawa	Kalimantan
Sumatera	...	0,002	0,382	0,097
Bangka	0,081	...	0,106	0,090
Jawa	0,000	0,046	...	0,435
Kalimantan	0,027	0,025	0,000	...

¹Angka-angka dibawah diagonal adalah jarak genetik antar populasi (Φ_{PT}) dan angka-angka di atas diagonal adalah nilai probabilitas dari Φ_{PT} .

¹The figures below the diagonal are measures of inter-population genetic distance (Φ_{PT}) and the figures above the diagonal represent the significance of the observed Φ_{PT} value.

Sebanyak 117 isolat *P. capsici* asal lada dari dua daerah beriklim berbeda di Vietnam menunjukkan keragaman genetik yang rendah antar isolat. Seratus delapan (108) isolat diantaranya bergenotipe sama dan seluruh isolat hanya terbagi dalam dua kelompok. (TRUONG *et al.*, 2009). Oleh karena itu, mereka menduga bahwa sebagian besar isolat-isolat *P. capsici* di Vietnam berasal dari sumber tunggal yang bereproduksi klonal atau aseksual dan mampu menyebabkan epidemi BPB. Keadaan ini mirip dengan epidemi hawar daun kentang oleh *P. infestans* di Irlandia (GOODWIN, 1994) dan epidemi BPB *strawberry* oleh *P. cactorum* di Eropa (HANTULA *et al.*,

Tabel 3. Pembagian ragam genetik secara hirarki di antara dan di dalam populasi isolat *Phytophthora capsici* asal lada (*Piper nigrum*) berdasarkan analysis of molecular variance (AMOVA).

Table 3. Hierarchical partitioning of genetic variation among and within populations of 59 *Phytophthora capsici* isolates from black pepper (*Piper nigrum*) based on analysis of molecular variance (AMOVA).

Sumber ragam Source of variation	Db Df	Jumlah kuadrat Sum of squares	Kuadrat tengah Mean squares	Estimasi ragam Estimated variance	Persentase ragam Percentage of variance	P
Antar pulau <i>Among populations</i>	3	41,778	13,926	0,351	4	0,010
Di dalam pulau <i>Within populations</i>	55	496,172	9,021	9,021	96	
Total <i>Total</i>	58	537,949	22,947	9,372	100	

1997) yang disebabkan oleh isolat-isolat yang berasal dari satu klon. Dalam kajian ini, isolat-isolat *P. capsici* mungkin berasal dari lebih dari satu klon karena terdapat lima gerombol profil RAPD.

Kedua tipe kawin *P. capsici* terdapat di Sumatera, Jawa, dan Kalimantan, sehingga migrasi atau pertukaran genotipe dengan tipe kawin yang berlawanan akan meningkatkan peluang keragaman genetik dan potensi timbulnya genotipe baru yang lebih agresif melalui perkawinan silang. Timbulnya genotipe baru yang lebih agresif dari kedua isolat tetua telah didemonstrasikan di laboratorium dari hasil persilangan buatan (ERSEK *et al.*, 1995). Pada kasus *P. infestans*, introduksi tipe kawin A2 ke Eropa, dimana semula diketahui hanya ada tipe kawin A1, berakibat nyata pada meningkatnya keragaman populasi dan menyumbang pada peningkatan kehilangan hasil kentang di Eropa (DRENTH *et al.*, 1994; ANDRIVON, 1996). Oleh karena itu, penyebaran bibit lada antar pulau perlu diperketat melalui sertifikasi bibit bebas penyakit BPB atau pengembangan sistem perbenihan lokal untuk memenuhi kebutuhan di wilayah sendiri. Penggunaan bibit bebas patogen BPB akan sangat dibutuhkan pada daerah pengembangan baru tanaman lada.

Dinamika populasi *P. capsici* perlu dikaji secara temporal dan spasial untuk memantau perubahan struktur populasi, baik akibat introduksi genotipe maupun sebagai respon adaptasi terhadap praktek budidaya. Kajian seperti ini diperlukan untuk merancang strategi pengendalian penyakit BPB lada yang efektif. Sebagai contoh, kajian dinamika spasio-temporal populasi *P. capsici* pada sayuran menggunakan penanda molekuler *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) di Amerika menghasilkan rekomendasi metode pengendalian melalui rotasi tanam dan pencegahan penggunaan sumber irigasi yang terinfestasi *P. capsici* (LAMOUR dan HAUSBECK, 2001, 2003; QUESADA-OCAMPO *et al.*, 2011).

Dalam penelitian ini, isolat-isolat yang dianalisis tidak dikumpulkan secara sistematis tetapi berasal dari tahun koleksi dan lokasi yang berbeda-beda dalam kurun waktu 27 tahun sehingga tidak menggambarkan status isolat pada waktu tertentu. Selain itu, isolat yang dipelajari telah disimpan dan diremajakan berulang dalam media buatan. Padahal, diketahui bahwa penyimpanan jangka panjang dapat mengakibatkan perubahan integritas genom patogen (WEBB *et al.*, 2011). Namun demikian, hasil kajian menggunakan penanda RAPD ini dapat digunakan sebagai indikasi awal struktur genetik *P. capsici* lada di Indonesia.

Pemanfaatan sistem penanda molekuler lain yang bersifat kodominan sangat dianjurkan untuk kajian struktur genetik dan filogenetik. SSR memiliki karakteristik ideal untuk tujuan tersebut karena mempunyai laju mutasi dan tingkat polimorfisme tinggi, multialelik, serta hasil analisisnya dapat diulang (*reproducible*) sehingga memiliki tingkat kepercayaan tinggi dibandingkan dengan RAPD. SSR dilaporkan dapat membedakan asal geografik *P. sojae* di Cina yang semula tidak dapat dibedakan dengan menggunakan penanda RAPD (WANG *et al.*, 2009).

Sejumlah penanda mikrosatelit dari *P. capsici* telah diidentifikasi dan digunakan untuk analisis keragaman genetik patogen ini pada sayuran (WANG *et al.*, 2009; MEITZ *et al.*, 2010).

KESIMPULAN DAN SARAN

Isolat-isolat *P. capsici* asal lada di Sumatera, Bangka, Jawa, dan Kalimantan memiliki keragaman genetik tinggi. Hal ini terdeteksi dari terbentuknya lima gerombol profil RAPD dan tingginya ragam genetik (96%) total antar isolat di dalam masing-masing pulau (*within populations*). Pengelompokan RAPD tidak terkait dengan asal geografik isolat. Namun demikian, terdapat jarak genetik yang jauh ($\Phi_{PT}=0,081$) antara isolat-isolat dari Sumatera dengan Bangka sehingga menyumbang ragam genetik antar isolat dari pulau berbeda (*among populations*) meskipun kecil (4%; $P=0,010$). Sertifikasi benih dan pengembangan sistem perbenihan lokal diperlukan untuk mencegah introduksi isolat antar daerah, terutama antar Sumatera dan Bangka, agar potensi perkawinan silang antar isolat yang bisa membentuk genotipe baru yang lebih agresif dapat dicegah.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan dan Kementerian Pertanian, melalui program SINTA (Sinergi Penelitian dan Pengembangan Pertanian) dengan nomor proyek 939/KPTS/KP.340/L.9/05/2009 atas dana yang telah diberikan. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Sdr. Sutrasman; Wawan, SSi., dan Wartono, SSi. atas bantuan di laboratorium.

DAFTAR PUSTAKA

- ALCONERO, R.M., F. ALBUQUERQUE, N. ALMEYDA, and A.G. SANTIAGO. 1971. Phytophthora foot rot of black pepper in Brazil and Puerto Rico. *Phytopathology* 62: 144-148.
- ANDRIVON, D. 1996. The origin of *Phytophthora infestans* populations present in Europe in the 1840s: a critical review of historical and scientific evidence. *Plant Pathology* 45: 1027-1035.
- BARNETT, L.G., P.H. THRALL, J.J. BURDON, and C.C. LINDE. 2008. Life history determines genetic structure and evolutionary potential of host-parasite interactions. *Trends in Ecology and Evolution* 23: 678-685.
- CHEE, H.Y. and H.J. JEE. 2001. Estimation of genetic variation of Korean isolates of *Phytophthora capsici* by using molecular markers. *Mycobiology* 29: 43-47.

- COOKE, D.E.L. and J.M. DUNCAN. 1997. Mycological Research 101: 667-677.
- DIREKTORAT PERLINDUNGAN PERKEBUNAN. 2011. Rekapitulasi data Organisme Pengganggu Tanaman (OPT) Tahun 2010. Direktorat Jenderal Perkebunan, Departemen Pertanian. Jakarta.
- DRENTH, A., G. WAGELS, B. SMITH, B. SENDALL, C.O DWYER, G. IRVINE, and J.A.G. IRWIN. 2006. Development of a DNA-based method for detection and identification of *Phytophthora* species. Australasian Plant Pathology 35: 147-159.
- DRENTH, A., I. C.Q. TAS, and F. GOVERS. 1994. DNA fingerprinting uncovers a new sexually reproducing population of *Phytophthora infestans* in the Netherlands. European Journal of Plant Pathology 100: 97-107.
- DUNN, A.R., M.G. MILGROOM, J.C. MEITZ, A. MCLEOD, W.E. FRY, M.T. MCGRATH, H.R. DILLARD, and G.C. SMART. 2010. Population structure and resistance to mefenoxam to *Phytophthora capsici* in New York State. Plant Disease 94: 1461-1468.
- ERSEK, T., J.T. ENGLISH, and J.E. SCHOELZ. 1995. Creation of species hybrids of *Phytophthora* with modified host ranges by zoospores fusion. Phytopathology 85: 1343-1347.
- GEVENS, A., R.S. DONAHOO, K.H. LAMOUR, and M.K. HAUSBECK. 2006. Baiting *Phytophthora capsici* from Michigan surface irrigation water and characterization of isolates. Phytopathology 97: 421-428.
- GOBENA, D., ROIG, J., GALMANI, C., HULVEY, J., and LAMOUR, K.H. 2011. Genetic diversity of *Phytophthora capsici* from pepper and pumpkin in Argentina. Plant Disease 95: 1080-1088.
- GOODWIN, S.B. 1997. The population genetics of *Phytophthora*. Phytopathology 87: 462-473.
- GRANKE, L.L., S.T. WINDSTAM, H.C. HOCH, C.D. SMART, and M.K. HAUSBECK. 2009. Dispersal and movement mechanisms of *Phytophthora capsici* sporangia. Phytopathology 99: 1258-1264.
- HANTULA, J., A. LILJA, and P. PARICCA. 1997. Genetic variation and host specificity of *Phytophthora cactorum* isolated in Europe. Mycological Research 101: 565-572.
- HARTL, D.L. and A.G. CLARK. 1997. Principles of population genetics. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA. 542 p.
- HAUSBECK, M.K. and K.H. LAMOUR. 2004. *Phytophthora capsici* on vegetable crops: research progress and management challenges. Plant Disease. 88(2): 1292-1303.
- ISLAM, S.Z., M. BABADOOST, K.N. LAMBERT, and A. NDEME. 2005. Characterization of *Phytophthora capsici* isolates from processing pumpkins in Illinois. 2005. Plant Disease 89: 191-197.
- LAMOUR, K.H. and M.K. HAUSBECK. 2001. Investigating the spatiotemporal genetic structure of *Phytophthora capsici* in Michigan. Phytopathology 91: 973-980.
- LAMOUR, K.H. and M.K. HAUSBECK. 2003. Effect of crop rotation on the survival of *Phytophthora capsici* in Michigan. Plant Disease 87: 841-845.
- LEUNG, H., R.J. NELSON, and J.E. LEACH. 1993. Population structure of plant pathogenic fungi and bacteria. Advances in Plant Pathology 10: 157-205.
- MANOHARA, D. and I. SATO. 1992. Physiological observation on *Phytophthora* isolates from black pepper. Industrial Crops Research Journal. 42: 14-19.
- MANOHARA, D., D. WAHYUNO, dan R. NOVERIZA. 2005. Penyakit busuk pangkal batang lada dan strategi pengendaliannya. Perkembangan Teknologi Tanaman Rempah dan Obat 17: 41-51.
- MANOHARA, D., K. MULYA, A. PURWANTARA, and D. WAHYUNO. 2004a. *Phytophthora capsici* on black pepper in Indonesia. Dalam: Drenth, A. and D.I. Guest (eds.). Diversity and Management of *Phytophthora* in Southeast Asia. Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research. p. 132-142.
- MANOHARA, D., K. MULYA, and D. WAHYUNO. 2004b. *Phytophthora* disease on black pepper and the control measures. Focus on Pepper 1: 37-49.
- MCDONALD, B. 1997. The population genetics of fungi: tools and techniques. Phytopathology 87: 448-452.
- MEITZ, J.C., C.C. LINDE, A. THOMPSON, S. LANGENHOVEN, and A. MCLEOD. 2010. *Phytophthora capsici* on vegetable hosts in South Africa: distribution, host range, and genetic diversity. Australasian Plant Pathology 39: 431-439.
- MULLER, H.R.A. 1936. Het *Phytophthora*-voetrot van pepper (*Piper nigrum* L.) in Nederlandsch-Indie. Mededeelingen van het Instituut voor Plantenziekten 88. 79 p.
- PEAKALL, R. and P.E. SMOUSE. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes 6: 288-295.
- QUESADA-OCAMPO, L.M., L.L. GRANKE, and M.K. HAUSBECK. 2011. Temporal genetic structure of *Phytophthora capsici* populations from a creek used for irrigation in Michigan. Plant Disease 95: 1358-1369.
- RIBEIRO, O.K. 1978. A source book of the genus *Phytophthora*. J. Cramer. 417 p.
- RISTAINO, J.B., M. MADRICH, C.L. TROUT, and G. PARRA. 1998. PCR amplification of ribosomal DNA for species identification in the plant pathogen Genus *Phytophthora*. Applied of Environmental Microbiology 64: 948-954.
- SILVAR, C., F. MERINO, and J. DIAZ. 2006. Diversity of *Phytophthora capsici* in Northwest Spain: analysis of virulence, metalaxyl response, and molecular characterization. Plant Disease 90: 1135-1142.

- SUN, W.X., JIA, Y.J., O'NEILL, N.R., FENG, B.Z.H., and ZHANG, X.G. 2008. Genetic diversity in *Phytophthora capsici* from eastern China. *Canadian Journal of Plant Pathology* 30: 414-424
- TRUONG, N.V., E.C.Y. LIEW, and L.W. BURGESS. 2010. Characterisation of *Phytophthora capsici* isolates from black pepper in Vietnam. *Fungal Biology* 114: 160-170.
- WAHYUNO, D., D. MANOHARA, and D.N. SUSILOWATI. 2007. Variasi morfologi dan virulensi *Phytophthora capsici* asal lada. *Buletin Plasma Nutfah* 13(2): 70-81.
- WAHYUNO, D., D. MANOHARA, and K. MULYA. 2003. Peranan bahan organik pada pertumbuhan dan daya antagonisme *Trichoderma harzianum* dan pengaruhnya terhadap *Phytophthora capsici*. *Jurnal Fitopatologi Indonesia* 7: 76-82.
- WAHYUNO, D., D. MANOHARA, D.N. SUSILOWATIO, and R.T. SETIJONO. 2010. Development of improved black pepper variety resistant to foot rot disease caused by *Phytophthora capsici*. *Jurnal Litbang Pertanian* 29: 86-95.
- WANG, R. and W. POWELL. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. *Trends in Biotechnology* 10: 186-191.
- WANG, Z., D.B. LANGSTON, A.S. CSINOS, R.D. GITAITIS, R.R. WALCOTT, and P. JI. 2009. Development of an improved isolation approach and simple sequence repeat markers to characterize *Phytophthora capsici* populations in irrigation ponds in Southern Georgia. *Applied of Environmental Microbiology* 75: 5467-5473.
- WEBB, K.M., A.L. HILL, J. LAUFMAN, L.E. HANSON, and L. PANELLA. 2011. Long-term preservation of a collection of *Rhizoctonia solani* using cryogenic storage. *Annals of Applied Biology* 158: 297-304.
- WELSH, J. and M. MCCLELLAND. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18: 7213-7218.
- WILLIAMS, J.G.K., A.R. KUBELIK, K.J. LIVAK, J.A. RAFALSKI, and S.V. TINGEY. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.
- ZHANG, N., M.L. MCCARTHY, and C.D. SMART. 2008. A macroarray system for the detection of fungal and oomycete pathogens of solanaceous crops. *Plant Disease* 92: 953-960.