

PEMANFAATAN BIOTEKNOLOGI UNTUK AKSELERASI PROGRAM PEMULIAAN TANAMAN LADA (*Piper nigrum* L.)

I Made Tasma

Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian
Jl. Tentara Pelajar no. 3A, Cimanggu, Bogor
email: imade.tasma@gmail.com

ABSTRAK

Lada merupakan tanaman ekspor bernilai ekonomi tinggi di Indonesia. Kendala utama pembudidayaan lada di Indonesia antara lain rendahnya produktivitas pertanaman dan serangan penyakit busuk pangkal batang (BPB) yang disebabkan oleh jamur *Phytophthora capsici*. Belum ditemukan varietas tahan dengan ketahanan yang memadai untuk mengendalikan penyakit ini. Pemuliaan tanaman untuk peningkatan produktivitas dan ketahanan penyakit BPB telah dilakukan. Namun prosesnya panjang karena siklus pemuliaan tanaman lada yang panjang. Diperlukan waktu sekitar tiga tahun untuk mendapatkan tanaman mulai berbunga jika ditumbuhkan dari biji hasil persilangan. Diperlukan adanya terobosan dengan pemanfaatan teknologi modern termasuk diantaranya bioteknologi untuk mempercepat program pemuliaan tanaman lada. Tujuan dari tulisan ini ialah untuk mengulas secara garis besar peran bioteknologi dalam percepatan program pemuliaan tanaman lada. Makalah mengulas secara singkat genetika tanaman lada, pemanfaatan teknologi kultur jaringan untuk perbanyakan dan transformasi genetik tanaman lada, perkembangan teknologi genomika termasuk penggunaan teknologi sekuensing modern untuk penemuan gen-gen penting pada lada, serta pemanfaatan marka DNA untuk seleksi individu progeni hasil persilangan dua tetua terpilih.

Kata kunci : Lada, marka DNA, kultur *in vitro*, genomika, pemuliaan tanaman

PENDAHULUAN

Tanaman lada (*Piper nigrum* L.) merupakan tanaman yang paling penting dalam kelompok tanaman rempah, baik ditinjau dari segi perannya dalam menyumbangkan devisa negara dan dari kegunaannya yang sangat khas dan tidak dapat diganti dengan rempah lainnya. Dalam perdagangan internasional, lada Indonesia sudah dikenal sejak jaman dulu yaitu lada hitam dan lada putih. Peranan Indonesia sebagai penghasil dan pengekspor lada hitam utama sangat diperhitungkan di dunia dan akhir-akhir ini mendapat saingan ketat Vietnam. Untuk lada putih, kontribusi Indonesia terhadap konsumsi dunia masih unggul dibanding negara penghasil lada lainnya. Kendala utama produksi lada Indonesia adalah rendahnya produktivitas dan serangan hama dan penyakit, dengan perkiraan kerugian hasil yang signifikan.

Penyakit BPB pada tanaman lada sampai saat ini belum dapat dikendalikan dengan baik. Varietas tahan BPB sampai saat ini juga belum sepenuhnya tersedia. Usaha pemuliaan untuk mendapatkan tanaman tahan BPB sudah dilakukan namun kemajuannya sangat lambat. Hal ini mengingat tanaman ini merupakan tanaman tahunan yang proses pemuliaannya lambat karena tanaman ini baru mulai memproduksi biji pada umur sekitar tiga tahun setelah tanam biji. Metoda seleksi yang ada saat ini memerlukan waktu yang lama, karena meliputi uji di tingkat laboratorium (*in vitro*), dilanjutkan ke rumah kaca yang kemudian diikuti uji lapang di daerah endemik penyakit BPB hingga tanaman berbuah pada umur tanaman 4 tahun. Dengan demikian, diperlukan adanya terobosan teknologi untuk mempercepat siklus pemuliaannya.

Kerabat liar lada, *Piper colubrinum* dilaporkan sangat tahan terhadap semua strain *Phytophthora capsici* di India (Babu *et al.*, 2013), yang dapat digunakan sebagai sumber gen ketahanan penyakit ini. Akan tetapi karena tanaman ini secara seksual tidak kompatibel dengan

lada (*Piper nigrum*), transfer gen dari *P. colubrinum* sangat sulit dilakukan. Namun demikian, dengan usaha keras, peneliti Balittro telah berhasil menyilangkan kedua genotipe lada tersebut sampai menghasilkan benih hibrida. Hanya saja jumlah benih yang dihasilkan masih sangat terbatas dan tingkat sterilitas benih hibrida yang dihasilkan tinggi (Darajat, komunikasi pribadi). Keterbatasan ini menghambat usaha transfer gen ketahanan penyakit dari genom *P. colubrinum* ke genom *P. nigrum*. Pendekatan bioteknologi melalui teknik rekayasa genetika menjadi alternatif pemecahannya setelah gen ketahanan tersebut diisolasi dari genom *P. colubrinum*. Aplikasi genomika untuk mengisolasi gen ketahanan tersebut dari genom *P. colubrinum* dan menransformasikannya ke dalam genom lada untuk pembentukan tanaman transgenik lada tahan BPB menjadi alternatif menarik untuk meningkatkan ketahanan lada terhadap penyakit BPB (Babu et al. 2013). Marka fungsional gen ketahanan BPB juga dapat disintesis menggunakan sekuen gen tahan BPB yang dapat digunakan untuk seleksi tanaman pembawa gen tahan BPB. Seleksi individu tanaman pembawa sifat tahan BPB, dengan demikian dapat dilakukan pada level kecambah tanpa perlu menumbuhkan tanaman dan menginokulasinya dengan patogen. Dengan cara ini program pemuliaan tanaman untuk ketahanan penyakit BPB dapat dipercepat.

Kendala lainnya adalah lamanya siklus pemuliaan tanaman lada sebagai akibat lamanya periode *juvenile*. Diperlukan sekitar tiga tahun sampai tanaman berbunga dari penanaman biji hasil persilangan. Perlu adanya terobosan teknologi untuk memperpendek siklus pemuliaannya dan juga pemanfaatan gen-gen ketahanan penyakit yang diisolasi dari organisme tidak berkerabat. Aplikasi bioteknologi seperti transformasi genetik dengan teknik rekayasa genetika, diperkuat dengan teknologi pemuliaan berbasis genomika, menjadi salah satu alternatif penting untuk dapat memecahkan masalah tersebut. Tujuan dari tulisan ini adalah untuk mengulas potensi pemanfaatan bioteknologi untuk percepatan pemuliaan tanaman lada.

Botani dan Genetika Tanaman Lada

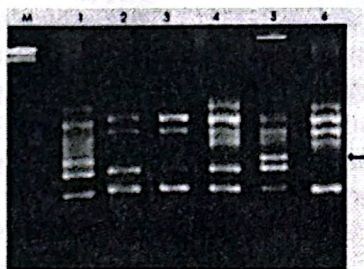
Lada (*Piper nigrum* L.) termasuk dalam famili Piperaceae, tanaman tahunan yang merambat pada tiang panjat. Dilaporkan merupakan tanaman asli beberapa negara seperti India, Indonesia, Malaysia, dan negara-negara Amerika Selatan namun tanaman ini berkembang di daerah tropis. Lada dikenal dengan raja rempah (*King of Spices*) (Srinivasan, 2007; Mathew et al., 2001). Tanaman lada dapat diperbanyak dengan benih, setek, *layering* dan *grafting*.

Hasil studi sitologi (Mathew 1972; Jose dan Sharma, 1984) menunjukkan bahwa jumlah kromosom dasar (*basic chromosome number*) genus *Piper* adalah $x = 13$, dimana lada (*Piper nigrum*) dilaporkan sebagai tanaman tetraploid ($2n = 52$). Peluang menyebuk silang (terjadinya persilangan) antar spesies berbeda dari genus *Piper* mungkin terjadi kalau lebih dari satu spesies ditanam pada tiang panjat yang sama. Karena absennya mekanisme transfer tepungsari dari bunga jantan ke bunga betina, *gene flow* berikutnya terbatas pada progeni hasil silangan dari tanaman spesies berbeda pada tiang panjat yang sama. Tanaman lada yang ada saat ini adalah progeni dari hasil-hasil persilangan serupa yang diperbanyak secara vegetatif (Ravindran, 2000). Program pemuliaan dan konservasi oleh petani didasarkan pada *fruit set* yang bagus, tingkat kepedasan, dan karakter lainnya yang berkontribusi pada keragaman kultivar lada yang ada saat ini.

Deteksi Dini Individu Hasil Persilangan Menggunakan Marka DNA

Lamanya masa vegetatif (*juvenile period*) tanaman lada membuat siklus pemuliaannya panjang. Tanaman lada yang ditumbuhkan dari biji hasil persilangan tetua terpilih baru berbunga pada umur sekitar tiga tahun, sehingga diperlukan waktu sedikitnya tiga tahun untuk mengetahui bahwa progeni yang ditanam benar-benar hasil persilangan dua tetua. Marka DNA dengan menggunakan pola pita DNA dari tetua jantan merupakan cara cepat untuk menguji bahwa individu tanaman yang dihasilkan dari hasil persilangan dua tetua benar-benar progeni kedua tetua. Anjani (2005) melaporkan dengan mengikuti pola pita *randomly amplified polymorphic*

DNA (RAPD) yang unik untuk tetua jantan dapat mengidentifikasi turunan (*progeny*) hasil persilangan dua tetua (Gambar 1). Mereka menguji pola pita beberapa primer RAPD pada tetua dan progeni hasil persilangan dua tetua. Hasilnya adalah dengan mengikuti pola pita RAPD tertentu yang unik untuk tetua jantan dapat mengidentifikasi progeni hasil persilangan. Dengan aplikasi marka DNA sederhana ini maka progeni hasil silangan dapat diuji pola pita DNANYa pada usia dini bahkan pada level kecambah sehingga tidak perlu menunggu tiga tahun sampai tanaman berbunga yang akan mempercepat pemilihan progeni hasil silangan yang akan diuji lebih lanjut pada program pemuliaan.



Gambar 1. Profil marka RAPD yang menunjukkan pola pita unik dari tetua jantan diperoleh dari amplifikasi primer OPE 01 pada tetua persilangan dan beberapa progeni hasil persilangan. Lajur M, DNA-*EcoR1/HindIII* double digest; lajur 1, IISR4182 (tetua jantan); lajur, 2–5, progeni hasil persilangan (HP813 x IISR4182); lajur 6, HP813 (tetua betina). Tanda panah menunjukkan pita DNA unik untuk tetua jantan. Sumber: Anjani *et al.* 2005.

Aplikasi Kultur *In Vitro* pada Tanaman Lada

Kultur *in vitro* tanaman lada dan metode regenerasinya merupakan modal penting dalam rangka pembentukan tanaman transgenik untuk mentransfer gen-gen unggul dari organisme yang tidak berkerabat ke dalam genom tanaman lada budidaya.

Kultur *in vitro* pada tanaman lada dapat dilakukan untuk memperbanyak tanaman untuk mendapatkan bahan tanaman dalam jumlah banyak, seragam, dan bahan tanaman bebas dari penyakit khususnya penyakit virus. Teknik kultur *in vitro* juga digunakan dalam rangka pemasukan gen unggul yang diisolasi dari tanaman tidak berkerabat maupun organisme lain ke dalam genom tanaman lada yang dapat dilakukan dengan teknik transformasi genetik tanaman. Di Indonesia memperbanyak tanaman lada secara *in vitro* telah berhasil dan dilaporkan oleh Sukmajaya *et al.* (1991) dengan menggunakan berbagai jenis eksplan, jenis media, dan komposisi pengatur tumbuh.

Salah satu protokol terbaru memperbanyak tanaman lada secara *in vitro* telah dihasilkan oleh Maju dan Soniya (2012) yang melaporkan bahwa dalam pengembangan protokol untuk memperbanyak lada dengan cepat menggunakan ujung tunas sebagai eksplan diperoleh bahwa proliferasi tunas terbaik diperoleh jika plantlet ditumbuhkan pada media Schenk dan Hilderbrand (SH) dikombinasikan dengan 2,5 mg/L BA dan 0,5 mg/L IAA dan perakaran dilakukan pada $\frac{1}{2}$ SH diperkaya dengan 0,5 mg/L IBA dan dalam waktu 4 minggu 90% tunas telah sukses berakar.

Perkembangan Penelitian Transgenik Lada

Beberapa penelitian telah dilakukan dalam usaha mendapatkan tanaman lada tahan penyakit BPB (*foot rot disease*) yang disebabkan oleh *P. capsici*. Penelitian transformasi genetik tanaman lada umumnya dilakukan menggunakan metode transformasi *Agrobacterium* dan telah dimulai cukup lama diawali dengan laporan Sasikumar and Veluthambi (1994) menggunakan metode *Agrobacterium tumefaciens*.

Babu *et al.* (2005) berhasil mentransformasi gen Osmotin, suatu gen yang terkait dengan protein *Pathogenesis-related* (PR) menggunakan metode transformasi *Agrobacterium* untuk menghasilkan 70 tanaman transgenik putatif. Lima diantara 70 transgenik tersebut menunjukkan pelambatan pembentukan symptom penyakit ketika tanaman diinfeksi dengan patogen *P. capsici*. Studi lainnya dilaporkan oleh Asha and Rajendran (2010) yang melaporkan transformasi *in planta* pada lada varietas Panniyur-2 via *pollen tube pathway* menggunakan DNA total exogen (*exogenous DNA*) dari spesies *Piper colubrinum*, spesies kerabat liar lada yang tahan terhadap patogen *Phytophthora capsici*. Planlet transforman diskriminasi *in vitro* menggunakan filtrate *P. capsici* dan 39,21% planlet tahan terhadap patogen *P. capsici*.

Pemanfaatan gen *coat protein* dari *Cucumber mosaic virus* (CMV) (Bhat *et al.*, 2005) untuk menginduksi ketahanan penyakit virus pada lada sedang dipelajari menggunakan jalur transgenik (*transgenic pathway*). Konstruk gen dilakukan pada vektor transformasi (pBI 121) dan konstruksi gen lalu ditransformasikan ke genom lada menggunakan metode *Agrobacterium* untuk dua jenis gen yaitu *Cucumber mosaic virus coat protein* (CMV-CP) yang dikonstruksi pada *sense and antisense orientation*, dan porsi gen berupa *open reading frame* (ORF) III dari *Piper yellow mottle virus* (PYMoV) yang juga dikonstruksi dengan dua orientasi, *sense and antisense orientation*. Tanaman transgenik putatif telah dihasilkan dari transformasi genom lada varietas IISR Subhakara dan varietas Panniyur 1). Tanaman transgenik putatif ini saat ini sedang dievaluasi secara molekuler dan secara fenotipe (Babu *et al.*, 2013).

Maju dan Soniya (2012) menghasilkan sistem transformasi genetik untuk tanaman lada var. Panniyur-1 dengan metode *Agrobacterium* menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 yang membawa *binary plasmid pCambia 1301*, yang mengandung marka gen 1,3-glucuronidase dan marka gen penyeleksi hygromycin phospho-transferase gene (hpt) dibawah kendali promotor CaMV 35S. Sistem transformasi ini dapat digunakan untuk transformasi genetik genom lada menggunakan gen-gen target termasuk gen ketahanan penyakit penting lada seperti penyakit BPB.

Analisis Genomika untuk Penemuan Gen Ketahanan Penyakit Penting Lada

Genom adalah satu set lengkap kromosom haploid dengan semua gen yang terkandung di dalamnya dan konstitusi genetik lainnya dari satu sel suatu organisme. Genom dapat juga didefinisikan sebagai satu set lengkap cetak biru kehidupan yang tidak lain adalah satu set DNA kromosom haploid yang berlokasi pada inti sel suatu organisme. Genomika, dipihak lain adalah studi tentang genom termasuk di dalamnya sekuen nukleotida, struktur gen, *regulatory sequences*, dan *noncoding DNA* dalam kromosom suatu organisme.

Penekanan studi genomika penemuan gen penting terkait ketahanan penyakit penting pada lada diawali dengan penemuan kandidat gen yang bertanggung jawab terhadap patogenesis (ketahanan tanaman lada) terhadap penyakit penting lada. Nazeem *et al.* (2008) melaporkan peranan 1, 3 glucanase dan enzim terkait (*related enzymes*) terlibat pada mekanisme ketahanan penyakit BPB pada varietas lada 'Kalluvally' dan mendapatkan genotipe tahan BPB (*P. colubrinum*) menunjukkan aktivitas enzim gen 1, 3 glucanase yang lebih tinggi dibandingkan aktivitas enzim yang sama pada varietas lada budidaya (*P. nigrum*). Usaha untuk mengisolasi dan mengklon fragmen cDNA mengkodekan gen 1,3- glucanase pada lada (*P. nigrum* L.) telah dimulai George *et al.* (2006), dan gen methyl glutaryl CoA reductase pada *Piper colubrinum* telah dilakukan oleh Girija *et al.* (2005).

Seperti diuraikan sebelumnya, kerabat liar lada, *P. colubrinum* diketahui sangat tahan terhadap semua strain *Phytophthora capsici* yang dapat digunakan sebagai sumber gen ketahanan penyakit ini. Isolasi gen ketahanan PBP dari *P. colubrinum* dapat dilakukan dengan aplikasi teknologi genomika modern. Gen yang diisolasi dapat ditransfer ke genom *P. nigrum* melalui teknik rekayasa genetika (Babu *et al.*, 2013). Dari sekuen gen ini juga dapat didesain marka DNA fungsional sebagai alat seleksi untuk menyeleksi genotipe lada tahan BPB. Penggunaan marka

molekuler fungsional ini mempercepat program pemuliaan lada tahan BPB melalui pemuliaan berbantuan marka (*marker-assisted breeding*).

Analisis Genomika untuk Identifikasi Gen Total (*Transcriptome*) pada Lada

Dengan berkembangnya teknologi sekuensing modern, pengurutan basa menyeluruh pada level genom sudah sangat umum dilakukan pada berbagai spesies tanaman termasuk juga tanaman lada. Teknologi *next generation sequencing* (NGS) memfasilitasi pengurutan basa DNA maupun RNA pada level genome global. Dengan semakin menurunnya biaya sekuensing per basa menjadikan teknologi ini semakin terjangkau oleh berbagai institusi penelitian nasional. Balitbangtan sendiri sudah dilengkapi dengan fasilitas ini sejak akhir tahun 2010 yang saat ini dikelola oleh BB Biogen. Alat ini sudah digunakan untuk menyekuen genom total tanaman penting dan ternak penting Indonesia seperti kelapa sawit, kakao, kedelai, jagung, cabai, pisang, kentang, jarak pagar, dan termasuk juga genom sapi, dalam rangka untuk mengidentifikasi variasi genom berbagai komoditas tersebut dalam rangka penemuan gen-gen karakter unggul dari setiap komoditas (Tasma, 2014).

Gordo *et al.* (2012) melaporkan analisis *transcriptome* dari akar tanaman lada. Pengetahuan ekspresi gen lada pada akar menjadi penting khususnya dikaitkan dengan serangan penyakit utama lada yaitu BPB oleh *P. capsici* dan busuk akar oleh *Fusarium solani*. Kedua penyakit ini sangat erat kaitannya dengan daerah perakaran sehingga hasil studi ini diharapkan dapat mengidentifikasi gen-gen yang berasosiasi dengan ketahanan tanaman lada terhadap kedua penyakit tersebut. Penelitian ini telah berhasil mengidentifikasi 10.338 gen tunggal (*unigenes*) dimana 4475 gen diantaranya telah diketahui jenis proteinnya. Sebanyak 615 protein diidentifikasi pada studi ini diduga mendefinisikan pola perakaran pada tanaman lada.

Studi lainnya dilakukan oleh Hu *et al.* (2015) melakukan analisis *transcriptome* pada buah tanaman lada. Studi ini ingin mengeksplorasi gen-gen global pada buah dikaitkan dengan keunikan buah lada yang kaya akan alkaloid, anti oksidan, dan kandungan piperine yang menjadi ciri khas buah lada. Studi ini akan menjadi landasan untuk mempelajari *piperine biosynthesis*. Studi ini berhasil mengidentifikasi 44061 gen tunggal dengan rata-rata panjang gen 1,345 nukleotida. Sebanyak 40.537 unigen yang diidentifikasi telah diketahui jenis protein yang dikodennya. Studi ini juga menghasilkan 8.196 simple sequence repeats (SSRs) yang dapat digunakan sebagai sumber marka untuk pada studi analisis genetik tanaman lada.

Penelitian analisis *transcriptome* ini menyediakan pangkalan data (data base) gen-gen yang diekspresikan pada jaringan tanaman lada yang berbeda. Database gen ini sangat penting dalam rangka penemuan gen-gen unggul (terutama gen-gen terkait dengan ketahanan penyakit BPB lada) untuk kemudian diisolasi dan dimanipulasi untuk kemudian ditransformasikan ke dalam genom tanaman lada melalui teknik rekayasa genetika. Kalau gen ketahanan BPB diisolasi, marka fungsional gen tersebut dapat disintesis yang dapat digunakan untuk menyeleksi individu tanaman yang mempunyai gen ketahanan tersebut. Dengan demikian program pemuliaan tanaman lada tahan BPB akan jauh lebih cepat karena tidak perlu menumbuhkan tanaman sampai berbunga untuk mengidentifikasi tanaman tahan BPB. Pola program pemuliaan seperti ini dapat diaplikasikan pada berbagai karakter target kalau gen-gen pengendali karakter sudah diisolasi sehingga program pemuliaan lada nasional dapat dilakukan dengan lebih cepat.

KESIMPULAN

Lada merupakan komoditas ekspor penting Indonesia yang dalam budidayanya menghadapi kendala serangan penyakit BPB. Saat ini belum tersedia varietas lada dengan ketahanan yang memadai untuk mengendalikan penyakit ini. Pemuliaan ketahanan penyakit BPB lambat karena panjangnya siklus pemuliaan lada. Bioteknologi berperan sangat penting untuk mengatasi lambatnya program pemuliaan tanaman lada. Berhasilnya teknologi kultur *in vitro*

dalam meregenerasi tanaman lada telah dimanfaatkan untuk menghasilkan tanaman transgenik putatif mengandung gen-gen target ke dalam genom lada. Kemajuan teknologi transformasi genetik lada cukup menjanjikan untuk mengatasi inkompatibilitas seksual dan untuk mentransformasikan gen-gen target yang diisolasi dari organisme tidak berkerabat ke dalam genom lada. Teknologi genomika modern mengakselerasi penemuan dan isolasi gen-gen unggul untuk digunakan pada program pemuliaan molekuler (rekayasa genetika dan *marker-assisted breeding*). Pemuliaan molekuler dengan basis DNA ini mempercepat program pemuliaan lada nasional karena individu pembawa karkater dapat diseleksi pada tahap awal pertumbuhan tanaman. Dengan demikian aplikasi bioteknologi akan mempercepat program pemuliaan lada nasional.

DAFTAR PUSTAKA

- Anjani K. 2005. Identification of hybrids in black pepper (*Piper nigrum* L.) using male parent-specific RAPD markers. *Current Science* 88 (2): 216-218.
- Asha S and PC Rajendran. 2010. Putative transgenic plants through *in planta* transformation against *Phytophthora* foot rot in black pepper (*Piper nigrum* L.). *Asian J. Biosci.*, 4 (2):135-141.
- Babu KN, EJ Suraby, J Cissin, D Minoo, T Pradeepkumar, VA Parthasarathy and KV Peter. 2013. Development of transgenics plants in Indian spices. *J. Trop. Agric.* 51 (1-2) : 1-14.
- Babu KN, GK Johnson, M Anandaraj, MN Venugopal and RR Nair *et al.* 2005. *Improvement of selected spices through Biotechnology tools* – Black pepper, Cardamom, Ginger, Vanilla. Project report, Department of Biotechnology, Government of India. 111p.
- Bhat AI, PS Hareesh and R Madhubala. 2005. Sequencing of coat protein gene of an isolate of Cucumber Mosaic Virus infecting black pepper. *Indian J. Plant Biochem. and Biotech.* 14: 37- 40
- George MR, PA Nazeem and D Girija. 2006. Isolation and characterization of a-1, 3-glucanase gene from *Piper* spp. *J Plant. Crops.*, 34(3):562-567.
- Girija D, PS Beena and PA Nazeem. 2005. Molecular cloning of a cDNA fragment encoding the defense related protein α -1,3-glucanase in black pepper (*Piper nigrum* L.). *Proceedings of the Kerala Science Congress*, January 2005, KFRI, Peechi, Kerala. 81-82p.
- Gordo SMC, DG Pinheiro, ECO Moreira, SM Rodrigues and S Darnet. 2012. High-throughput sequencing of black pepper root transcriptome. *BMC Plant Biology*12:168-176.
- Hu L, C Hao, R Fan, B Wu, L Tan and H Wu. 2015. De novo assembly and characterization of fruit transcriptome in black pepper (*Piper nigrum*). *PlosOne* DOI:10.1371/journal.pone.0129822 June 29, 2015.
- Jose J and AK Sharma. 1984. Chromosome studies in the genus *Piper* L. *J. Indian Bot Soc* 63:313-319.
- Maju TT and EV Soniya. 2012. *In vitro* regeration system for multiplication and transformation in *Piper nigrum* L. *Int. J. Med. Arom. Plants* 2 (1): 178-184.
- Mathew PJ, PM Mathew and V Kumar. 2001. Graph clustering of *Piper nigrum* L. (Black pepper). *J. Indian Bot. Soc.* 118: 257-264.
- Mathew PM. 1972. Karyomorphological studies on *Piper nigrum*. *Proc. Natl. Symp. Plantation Crop.* p.15-18.
- Nazeem PA, CR Achuthan, TB Babu, GV Parab, D Girija, R Keshavachandran and R Samiyappan. 2008. Expression of pathogenesis related proteins in black pepper (*Piper nigrum* L.) in relation to *Phytophthora* foot rot disease. *J. Trop. Agr.*, 46 (1-2): 45–51.
- Ravindran PN 2000. *Black pepper (Piper nigrum)*. Harwood academic publishers.
- Sasikumar B and K Veluthambi. 1994. Kanamycin sensitivity of cultured tissues of *Piper nigrum* L. *J. Spices Aromatic Crops* 3(2): 158-160.
- Sukmajaya D, I Mariska dan EG Lestari. 1991. Regenerasi tanaman lada melalui kultur jaringan. *Prosiding Seminar Bioteknologi Perkebunan dan Lokakarya Bopollmer Untuk Industri*. PAU Bioteknologi IPB, Bogor. 10 - 11 Desember 1991.
- Tasma IM. 2014. Single nucleotide polymorphism (SNP) sebagai marka DNA masa depan. *WartaBiogen* 10 (3): 7-10.

DISKUSI

Anonim

Tanya : Colubrinium jenis lada apa? dan dari mana? Agar nanti bisa memproduksi? mendatangkan. karena sangat penting di daerah

Jawab : Beda dg lada ada pada kromosomnya. Strainnya tahan thp BPB. Colubrinum itu kerabat liar lada bukan lada budidaya. Gennya dimasukkan pada lada.