

VARIASI GENETIK DALAM POPULASI KULTIVAR KOPI ARABIKA BERBUAH KUNING DI LAHAN PETANI BERDASARKAN PENANDA SSRs

GENETIC VARIATION WITHIN POPULATION OF YELLOW-BERRIED ARABICA COFFEE CULTIVARS AT FARMERS FIELD BASED ON SSRs MARKERS

* Dani, Nur Kholilatul Izzah, dan Enny Randriani

Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar
Jalan Raya Pakuwon Km 2 Parungkuda, Sukabumi 43357 Indonesia
*danithok@gmail.com

(Tanggal diterima: 30 April 2016, direvisi: 20 Mei 2016, disetujui terbit: 1 Juli 2016)

ABSTRAK

Identifikasi keragaman genetik dalam kultivar kopi Arabika berbuah kuning berdasarkan karakter morfologi tanaman dihadapkan pada kendala sulitnya menemukan kondisi lingkungan yang seragam di lahan petani. Oleh sebab itu, diperlukan pendekatan lain yang tidak dipengaruhi perbedaan kondisi lingkungan, yaitu berdasarkan polimorfisme DNA. Tujuan penelitian adalah menganalisis variasi genetik dalam populasi kultivar kopi Arabika berbuah kuning berdasarkan penanda SSRs. Penelitian dilakukan di Laboratorium Terpadu Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar (Balittri), Sukabumi, mulai bulan April sampai Mei 2015. Sampel daun untuk ekstraksi DNA diambil dari kultivar kopi Arabika berbuah kuning (AGK-1) dan dua kultivar berbuah merah sebagai pembanding, yaitu ABP-1 (tipe katai) dan *Typica* (tipe tinggi). Kultivar AGK-1 dan ABP-1 masing-masing terdiri dari 17 dan 5 nomor individu, sedangkan kultivar *Typica* terdiri dari 3 individu. Amplifikasi PCR menggunakan 12 primer SSR yang telah dirancang untuk mengidentifikasi keragaman genetik kopi Arabika. Empat primer SSR di antaranya, yaitu M24, SSRCa052, M32, dan M42, menghasilkan pola pita DNA polimorfik. Data biner diolah menggunakan program NTSYS-PC versi 2.1. Pengelompokan genotipe berdasarkan matriks kesamaan genetik menggunakan *unweighted pair group method with arithmetic average* (UPGMA). Hasil analisis menunjukkan adanya variasi genetik antar nomor/individu kultivar AGK-1 sehingga membentuk tiga kluster pada nilai kesamaan genetik 67%. Salah satu kluster menunjukkan kedekatan jarak genetik antara beberapa individu dalam populasi kultivar AGK-1 dengan kultivar *Typica*. Dua kluster lainnya menggambarkan kemiripan genetik yang tinggi antara kultivar AGK-1 dengan kultivar ABP-1. Dugaan adanya aliran gen antar kultivar dan atau residu heterozigositas dalam populasi kultivar AGK-1 di lahan petani perlu dibuktikan lebih lanjut.

Kata kunci: Kopi Arabika, intra kultivar, buah kuning, keragaman genetik, SSRs

ABSTRACT

Identification of the genetic diversity within populations of yellow-berried Arabica coffee cultivar based on morphological characters faced an obstacle in finding identical environmental conditions at farmers field. Therefore, an approach which is not influenced by differences in environmental conditions is required, for instance based on DNA polymorphism. The research aimed to analyze genetic variation within populations of yellow-berried Arabica coffee cultivar based on SSRs markers. The research was conducted in the Integrated Laboratory, Indonesian Industrial and Beverage Crops Research Institute, Sukabumi, from April until June 2015. The leaf samples for DNA extraction were obtained from yellow-berried Arabica coffee cultivar (AGK-1) and two red-berried cultivars as controls, namely ABP-1 (dwarf type) and *Typica* (tall type). AGK-1 and ABP-1 cultivars consisted of 17 and 5 individual numbers, respectively, whereas *Typica* cultivar comprised three individuals. PCR amplification was carried out using 12 SSR primers. Four primers (M24, SSRCa052, M32, and M42) produced polymorphic band. The binary data obtained in this research was subsequently processed using NTSYS-PC program version 2.1. The genotypes were grouped based on a genetic similarity matrix using the unweighted pair group method arithmetic mean (UPGMA). The result showed the existence of genetic variation among individual of AGK-1 cultivars, which forming three clusters at the genetic similarity value of 67%. One cluster exhibited close genetic relationships between some individuals within the population of AGK-1 cultivar and *Typica* cultivar. Meanwhile, the other two clusters showed high genetic similarity between AGK-1 cultivar and ABP-1 cultivar. The result demonstrated the possibility of gene flow between genotypes or residual heterozygosity within the population of AGK-1 cultivar at farmers field, which required a further study.

Keywords: Arabica coffee, intra cultivar, yellow berry, genetic variability, SSRs

PENDAHULUAN

Kopi Arabika (*Coffea arabica* L.) merupakan spesies yang banyak dibudidayakan di Indonesia selain kopi Robusta (*C. canephora* var. *robusta*). Beragam kultivar kopi Arabika baik yang berbasis genetik *Typica*, *Bourbon*, *Caturra*, maupun *Hibrido de Timor (HdT)* telah dikembangkan secara luas di lahan petani. Salah satu kultivar kopi Arabika yang dikembangkan petani memiliki karakteristik yang unik, yaitu buahnya tidak berwarna merah ketika masak, melainkan berwarna kuning. Kultivar kopi Arabika berbuah kuning mudah ditemukan di wilayah pegunungan Papandayan, Kecamatan Cikajang, Kabupaten Garut. Petani setempat menyukai kultivar kopi tersebut karena daya hasilnya dinilai tinggi (> 1 ton/ha) dan ukuran bijinya tergolong besar. Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa kultivar kopi Arabika buah kuning menghasilkan biji berukuran besar, sesuai standar SNI 01-2907-2008 (Randriani, Dani, & Wardiana, 2014).

Informasi mengenai keragaman genetik dan asal-usul genetik kultivar kopi Arabika berbuah kuning tersebut hingga saat ini masih sangat terbatas. Pengembangannya di lahan petani sudah berlangsung cukup lama sehingga dapat ditemukan lebih dari satu generasi tanaman yang saling tumpang tindih (*overlapping*) dalam hamparan lahan yang sama. Sebagian besar petani mengembangkan kultivar tersebut bersama-sama dengan kultivar lain yang berbuah merah, terutama ABP 1 dan *Typica*. Meskipun kopi Arabika tergolong tanaman yang mampu menyerbuki sendiri (*self-pollinated*) (Brokaw, 2013) sekaligus kompatibel membuahi sendiri (*self-compatible*) (Yu *et al.*, 2011), tetapi tidak menutup peluang terjadinya pembuahan silang (*cross fertilization*) (Andreazi *et al.*, 2015). Persilangan alami dapat terjadi antar kultivar kopi Arabika bahkan dengan spesies kopi lain yang seringkali tumbuh berdekatan (*sympatric*) (Gomez *et al.*, 2016). Kondisi tersebut memberikan peluang terjadinya aliran gen (*gene flow*), baik antar kultivar maupun antar spesies (Noirot, Charrier, Stoffelen, & Anthony, 2015). Adanya introgresi gen dari luar dapat memunculkan keragaman genetik baru dalam kultivar yang sama sehingga berperan dalam memperluas basis genetik kopi Arabika (Gimase, Thagana, Kirubi, Gichuru, & Gichimu, 2011). Hal ini penting mengingat variabilitas genetik spesies kopi Arabika telah tereduksi selama proses domestikasi (Maluf, Silvestrini, Ruggiero, Guerreiro Filho, & Colombo, 2005).

Keragaman genetik dalam kultivar kopi Arabika di lahan petani seringkali sulit diidentifikasi secara visual dengan hanya mengandalkan perbedaan karakter-karakter morfologi. Hal tersebut disebabkan kurang terstandarisasinya pengelolaan agronomis tanaman kopi oleh para petani, seperti pemangkasan, penggunaan naungan, pengaturan jarak tanam, dan pemupukan. Sebagai contoh, adanya perbedaan intensitas naungan akan menyebabkan perubahan struktur dan fungsi daun tanaman kopi sehingga memunculkan variasi antar individu dalam kultivar yang sama (Baliza *et al.*, 2012). Oleh sebab itu, diperlukan pendekatan lain yang tidak dipengaruhi perbedaan kondisi lingkungan. Dibandingkan dengan penanda morfologi, penanda molekuler merupakan teknologi yang lebih efisien, lebih akurat, dan dapat diandalkan untuk membedakan antar spesies maupun antar kultivar yang berkerabat dekat (Mishra & Slater, 2012), hingga dapat mengidentifikasi keragaman genetik dalam kultivar (Tran, 2005). Penanda *simple sequence repeats* (SSRs), yang juga disebut *microsatellites*, *short tandem repeats* (STRs) atau *sequence-tagged microsatellite sites* (STMS), merupakan penanda molekuler berbasis *polymerase chain reaction* (PCR) (Jiang, 2010). Metode SSRs telah digunakan secara luas dalam karakterisasi genetik kopi (Gimase *et al.*, 2011) hingga seleksi sifat ketahanan terhadap nematoda (Pereira *et al.*, 2016) dan penyakit buah kopi (*coffee berry disease = CBD*) (Kiguongo, Omondi, Gichuru, & Kasili, 2014). Penelitian bertujuan menganalisis variasi genetik dalam populasi kultivar kopi Arabika berbuah kuning berdasarkan penanda SSRs.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Terpadu Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar (Balittri), Sukabumi, mulai bulan April sampai Juni 2015.

Bahan Tanaman

Sampel daun untuk bahan isolasi DNA diambil dari 17 nomor individu kultivar AGK-1, 5 kultivar ABP-1, dan 3 kultivar *Typica* yang ditanam petani di Desa Cikandang, Kecamatan Cikajang, Kabupaten Garut, Jawa Barat (Tabel 1).

Tabel 1. Kultivar kopi Arabika berbuah kuning (AGK-1) dan berbuah merah yang digunakan untuk analisis variasi genetik
Table 1. Yellow-berried (AGK-1) and red-berried Arabica coffee cultivars used for genetic variation analysis

Kultivar – no. individu	Kelompok umur	Lokasi asal (blok)	Karakter morfologi spesifik
AGK-1-P1/1	>10–15 tahun	Legok Gede, Cikandang, Cikajang, Garut	Perawakan semi katai, berbuah kuning
AGK-1-P1/2	>10–15 tahun	Legok Gede, Cikandang, Cikajang, Garut	Perawakan semi katai, berbuah kuning
AGK-1-P1/3	>10–15 tahun	Legok Gede, Cikandang, Cikajang, Garut	Perawakan semi katai, berbuah kuning
AGK-1-P1/4	>10–15 tahun	Legok Gede, Cikandang, Cikajang, Garut	Perawakan semi katai, berbuah kuning
AGK-1-P1/5	>10–15 tahun	Legok Gede, Cikandang, Cikajang, Garut	Perawakan semi katai, berbuah kuning
AGK-1-P2/1	>5–10 tahun	Legok Gede, Cikandang, Cikajang, Garut	Perawakan semi katai, berbuah kuning
AGK-1-P2/2	>5–10 tahun	Legok Gede, Cikandang, Cikajang, Garut	Perawakan semi katai, berbuah kuning
AGK-1-P2/3	>5–10 tahun	Legok Gede, Cikandang, Cikajang, Garut	Perawakan semi katai, berbuah kuning
AGK-1-P2/4 (C)	>5–10 tahun	Ciawer, Cikandang, Cikajang, Garut	Perawakan semi katai, berbuah kuning
AGK-1-P2/5 (C)	>5–10 tahun	Ciawer, Cikandang, Cikajang, Garut	Perawakan semi katai, berbuah kuning
AGK-1-P2/6 (C)	>5–10 tahun	Ciawer, Cikandang, Cikajang, Garut	Perawakan semi katai, berbuah kuning
AGK-1-P3/1	<5 tahun	Legok Gede, Cikandang, Cikajang, Garut	Perawakan semi katai, berbuah kuning
AGK-1-P3/2	<5 tahun	Legok Gede, Cikandang, Cikajang, Garut	Perawakan semi katai, berbuah kuning
AGK-1-P3/3	<5 tahun	Legok Gede, Cikandang, Cikajang, Garut	Perawakan semi katai, berbuah kuning
AGK-1-P3/4 (S)	<5 tahun	Sumpena, Cikandang, Cikajang, Garut	Perawakan semi katai, berbuah kuning
AGK-1-P3/5 (S)	<5 tahun	Sumpena, Cikandang, Cikajang, Garut	Perawakan semi katai, berbuah kuning
AGK-1-P3/6 (S)	<5 tahun	Sumpena, Cikandang, Cikajang, Garut	Perawakan semi katai, berbuah kuning
AGK-1-A1	>15 tahun	Baru Ullis, Cikandang, Cikajang, Garut	Perawakan semi katai, berbuah merah
AGK-1-A2	>15 tahun	Baru Ullis, Cikandang, Cikajang, Garut	Perawakan semi katai, berbuah merah
AGK-1-A3	>15 tahun	Baru Ullis, Cikandang, Cikajang, Garut	Perawakan semi katai, berbuah merah
AGK-1-A4	>15 tahun	Baru Ullis, Cikandang, Cikajang, Garut	Perawakan semi katai, berbuah merah
AGK-1-P2/1 (S)	>5–10 tahun	Sumpena, Cikandang, Cikajang, Garut	Perawakan semi katai, berbuah merah
Preanger (<i>Typica</i>)	>15 tahun	Sumpena, Cikandang, Cikajang, Garut	Perawakan tinggi, berbuah merah
Preanger (S) (<i>Typica</i>)	>15 tahun	Sumpena, Cikandang, Cikajang, Garut	Perawakan tinggi, berbuah merah
Buhun (S) (<i>Typica</i>)	>15 tahun	Sumpena, Cikandang, Cikajang, Garut	Perawakan tinggi, berbuah merah

Isolasi DNA

Daun muda yang digunakan untuk bahan isolasi DNA adalah yang terdapat pada ruas cabang nomor dua dari pucuk (sudah berkembang sempurna tetapi masih berwarna hijau muda) dan tidak menunjukkan gejala serangan hama dan penyakit (Motta *et al.*, 2014). Isolasi DNA menggunakan metode *cetyltrimethylammonium bromide* (CTAB) yang telah dikembangkan oleh Allen *et al.* (2006). Genomik DNA hasil isolasi selanjutnya diukur kualitas dan kuantitasnya menggunakan alat NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA). Hasil pengukuran tersebut selanjutnya digunakan untuk menentukan konsentrasi final sebesar 10 ng/μl untuk keperluan analisis PCR.

Analisis SSR

Sebanyak 12 primer SSR yang didesain dari sekuen kopi Arabika (Combes *et al.*, 2000; Missio *et al.*, 2009; Teresa *et al.*, 2010) digunakan untuk mengamplifikasi DNA 25 nomor individu kultivar kopi Arabika (Tabel 2). Komposisi bahan kimia yang digunakan untuk proses amplifikasi DNA adalah 10 ng

DNA, 0,2 μM primer *forward* dan *reverse* serta 1x KAPA PCR *mix* dengan volume akhir 15 μl. Proses amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan mesin PCR SensoQuest. Program PCR digunakan untuk mengamplifikasi DNA dengan tahapan sebagai berikut: (1) pre-denaturasi (95°C; 3 menit); (2) denaturasi (95°C; 15 detik), penempelan primer (*annealing*) (53°C; 15 detik) dan perpanjangan (*extension*) (72°C; 15 detik), semua proses dalam tahap dua ini diulang sebanyak 35 siklus; dan (3) perpanjangan akhir (*final extension*) (72°C; 10 menit). DNA kopi hasil amplifikasi PCR kemudian diuji menggunakan elektroforesis dengan gel agarose 1% yang sudah mengandung pewarna *gel red* pada larutan 0,5 x bufer TBE. Tahap selanjutnya adalah separasi semua DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan 6% gel poliakrilamid non-denaturasi pada larutan 1x bufer TBE. Gel hasil elektroforesis tersebut kemudian diwarnai menggunakan larutan *ethidium bromide* selama 20 menit dan divisualisasi pada UV transluminator menggunakan *gel documentation system*.

Tabel 2. Karakteristik 12 primer SSR yang digunakan untuk menganalisis keragaman genetik antar individu dan antar kultivar kopi Arabika

Table 2. Characteristics of 12 SSR primers utilized for genetic variability analysis among individuals and cultivars of Arabica coffee

Nama lokus SSR	Motif pengulangan	Sekuen primer (<i>forward</i>)	Sekuen primer (<i>reverse</i>)	Ukuran alel (bp)
M2a	(GT) ₈ /(GT) ₆ /(GT) ₇	AGTGGTAAAAGCCGTTGGTG	GCGGTTGTTGGTGAGTTGAA	205–218
M24	(CA) ₁₅ (CG) ₄ CA	GGCTCGAGATATCTGTTTAG	TTTAATGGGCATAGGGTCC	132–166
M25	(GT) ₅ CT(GT) ₂ /(GT) ₁₂	CCCTCCCTGCCAGAAGAAGC	AACCACCGTCCTTTTCCTCG	160–170
M20	(GA) ₅ (GT) ₈ TT(GT) ₄ TT(GT) ₇ (GA) ₁₁ (TC) ₂ (CT) ₃ GT	CTTGTTTGAGTCTGTGCTG	TTTCCCTCCCAATGTCTGTA	240–270
CMA055	(TG) ₁₈	TTGAGCAAAAACCTATTCC	TAAACCAAAAAGACCACAA	
SSRCa052	(TTG) ₇	GATGGAAACCCAGAAAGTTG	TAGAAGGGCTTTGACTGGAC	129
SSRCa018	(GT) ₁₈ (GA) ₁₀	GTCTCGTTTCACGCTCTCTC	ATTTTGGCACGGTATGTTC	115
M27	(GT) ₁₁	AGGAGGGAGGTGTGGGTGAAG	AGGGGAGTGATAAGAAGG	118–134
M29	(CTCACA) ₄ /(CA) ₉	GACCATTACATTTACACAC	GCATTTTGTTCACACTGTA	103–122
M32	(CA) ₃ /(CA) ₃ /(CA) ₁₈	AACTCTCCATTTCCGCATTC	CTGGGTTTTCTGTGTTCTCG	89–135
M42	(GT) ₃ /(GT) ₇	ATCCGTCATAATCCAGCGTC	AGGCCAGGAAGCATGAAAGG	72–03
M47	(CT) ₉ (CA) ₈ /(CT) ₄ /(CA) ₅	TGATGGACAGGAGTTGATGG	TGCCAATCTACCTACCCCTT	100–132

Sumber/Sources: Combes *et al.* (2000); Missio, Caixeta, Zambolim, & Sakiyama (2009); Teresa, Crouzillat, Petiard, & Brouhan (2010)

Analisis data

Marka SSR yang menunjukkan hasil polimorfik diberi skor dengan menggunakan format data biner, yaitu skor 1 apabila terdapat pita dan 0 apabila tidak ada pita. Matriks data biner tersebut digunakan untuk melakukan analisis keragaman genetik dalam populasi kopi Arabika dengan program NTSYS-PC versi 2.1 (Rohlf, 2000). Pengelompokan semua genotipe kopi dilakukan berdasarkan matriks kesamaan genetik dengan menggunakan *unweighted pair group method with arithmetic average* (UPGMA). Untuk mengetahui jarak genetik antar genotipe kopi Arabika dilakukan perhitungan dengan rumus: 1-matriks kesamaan genetik.

Untuk mengetahui jumlah alel, jumlah alel spesifik, frekuensi alel mayor, keragaman gen (*gene diversity*), nilai heterozigositas, dan nilai *polymorphic information content* (PIC) dari tiap-tiap lokus SSR yang digunakan maka dilakukan penghitungan dengan menggunakan program PowerMarker versi 3.25 (Liu & Muse, 2005). Nilai frekuensi alel mayor dihitung berdasarkan jumlah alel terbanyak, sedangkan jumlah alel spesifik dihitung berdasarkan pada jumlah alel yang kurang dari 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penanda molekuler saat ini telah banyak diterapkan untuk mengidentifikasi keragaman genetik kopi. Keakuratan dan derajat separasi pada hasil

identifikasi keragaman genetik menggunakan berbagai teknologi DNA sangat tergantung pada jumlah primer yang digunakan dan pita polimorfis yang dimunculkannya (Kathurima *et al.*, 2012). Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 12 primer SSR yang digunakan, hanya empat primer yang menghasilkan pita polimorfik, yaitu M24, SSRCa052, M32, dan M42 (Tabel 3). Meskipun demikian, keempat primer polimorfik tersebut sudah mampu mengidentifikasi adanya keragaman genetik dalam populasi kopi Arabika berbuah kuning (AGK-1). Berdasarkan hasil analisis keragaman alel menggunakan program PowerMarker diperoleh jumlah total alel sebanyak 14 alel, dengan jumlah rata-rata 3,5 alel untuk tiap lokus SSR (Tabel 3). Jumlah total alel dan nilai rata-rata jumlah alel per lokus yang dihasilkan lebih sedikit dibandingkan dengan penelitian sebelumnya yang menggunakan 12 kultivar kopi Arabika dan 10 primer SSR polimorfik, yaitu 83 alel dengan jumlah rata-rata 8 alel tiap lokusnya (Izzah, Randriani, & Dani, 2015). Perbedaan tersebut diduga disebabkan jumlah kultivar yang digunakan dalam penelitian ini jauh lebih sedikit, yaitu hanya tiga kultivar.

Hal lain yang menarik dari penelitian ini adalah ditemukannya 2 alel spesifik berukuran antara 400–500 bp yang ditunjukkan oleh primer SSRCa052 (Tabel 3; Gambar 1). Kedua alel spesifik tersebut hanya muncul pada dua nomor individu kultivar kopi Arabika berbuah kuning, yaitu AGK-1-P3/3 dan AGK-1-P2/2 (Gambar 1). Hasil ini menunjukkan bahwa lokus SSRCa052

berpotensi digunakan untuk mengidentifikasi individu AGK-1-P3/3 dan AGK-1-P2/2 di dalam populasi kopi Arabika berbuah kuning. Meskipun demikian, belum diketahui adanya keterkaitan antara segmen DNA tersebut dengan karakter fenotipik tertentu pada kultivar AGK-1.

Nilai rata-rata PIC yang diperoleh sebesar 0,51 (Tabel 3) sehingga termasuk kategori tinggi (Zhang, Mao, Zhang, & Wu, 2014). Ini berbeda dengan hasil penelitian Missio *et al.* (2010) yang menunjukkan nilai PIC rata-rata rendah (0,22) pada enam aksesi dan enam varietas komersial kopi Arabika berdasarkan 33 pasang primer, termasuk SSRCa052. Dalam penelitian ini, primer SSRCa052 mempunyai nilai keragaman gen (0,73) dan PIC (0,68) lebih tinggi dibandingkan dengan primer yang lain (Tabel 3). Hal ini mengindikasikan bahwa primer SSRCa025 merupakan penanda yang cukup prospektif untuk digunakan dalam analisis sidik jari plasma nutfah kopi Arabika. Hasil penelitian ini sejalan dengan pendapat Rubiyo, Izzah, Sulistiyorini, & Tresniawati (2015) yang menyatakan bahwa primer dengan nilai keragaman gen dan PIC yang tinggi dapat dipilih sebagai penanda potensial untuk analisis sidik jari koleksi plasma nutfah dalam upaya mendukung program pemuliaan.

Berdasarkan hasil analisis kluster diketahui bahwa individu-individu dalam kultivar AGK-1 terbagi ke dalam tiga kelompok besar pada nilai kesamaan genetik 67% (Gambar 2). Pada kluster I, lima individu kultivar AGK-1 mengelompok terpisah bersama dengan tiga kultivar lain dari tipe *Typica*, yaitu Preanger, Preanger (S), dan Buhun (S) pada koefisien kemiripan genetik 85%. Padahal, penampilan morfologi kultivar AGK-1 sangat berbeda dengan ketiga kultivar tersebut (Gambar 2a). Kluster II dan III menempatkan sebagian besar individu kultivar AGK-1 dengan kultivar ABP-1 yang berbuah merah. Hal ini menandakan bahwa kedua kultivar tersebut memiliki jarak genetik atau hubungan

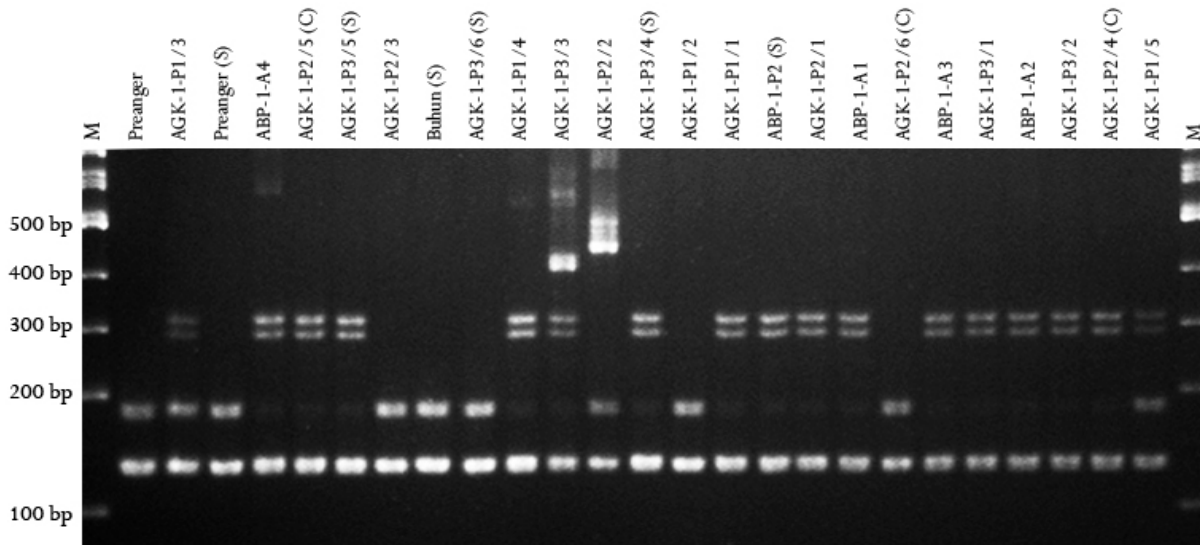
kekerabatan yang dekat. Tetapi, primer yang digunakan dalam penelitian ini tidak dapat memisahkan genotipe berdasarkan warna buah, yaitu merah dan kuning. Kedekatan genetik kultivar kopi Arabika berbuah kuning dengan salah satu kultivar berbuah merah (ABP-1 dan ABP-2) juga telah ditunjukkan dalam hasil penelitian sebelumnya (Randriani *et al.*, 2014; Izzah *et al.*, 2015).

Variasi genetik antar individu kultivar AGK-1 berbuah kuning dan kultivar berbuah merah juga ditunjukkan oleh nilai jarak genetik yang ditampilkan pada Tabel 4. Nilai jarak genetik yang dihasilkan sangat bervariasi mulai dari yang terendah (0,00) sampai dengan tertinggi (0,86). Informasi mengenai nilai jarak genetik tersebut sangat bermanfaat bagi para pemulia dalam menentukan kombinasi tetua persilangan. Izzah *et al.* (2015) menyatakan bahwa kombinasi tetua persilangan ideal dipilih berdasarkan nilai jarak genetik yang tinggi.

Secara teoritis, keragaman genetik dalam kultivar kopi Arabika pada umumnya rendah sehingga semua aksesi dalam kultivar yang sama akan mengelompok dalam satu kluster. Meskipun demikian, sebagian aksesi mungkin saja mengelompok dalam kluster terpisah. Simpangan tersebut dapat terjadi akibat masih adanya residu heterozigositas dari tetua asalnya (Steiger *et al.*, 2002) maupun adanya aliran gen antar kultivar melalui penyerbukan silang secara alami (Geleta, Herrera, Monzón, & Bryngelsson, 2012). Residu heterozigositas dapat didefinisikan sebagai proporsi lokus pada hasil persilangan antar genotipe yang masih belum stabil secara genetik hingga generasi *inbreeding* tertentu (Bailey, 1978). Persilangan alami sangat mungkin terjadi, baik antar kultivar hingga antar spesies kopi yang tumbuh berdampingan di lahan yang sudah dimodifikasi oleh manusia Gomez *et al.*, 2010). Petani kopi pada umumnya menanam lebih dari satu kultivar dalam lahan yang sama (Gambar 3a).

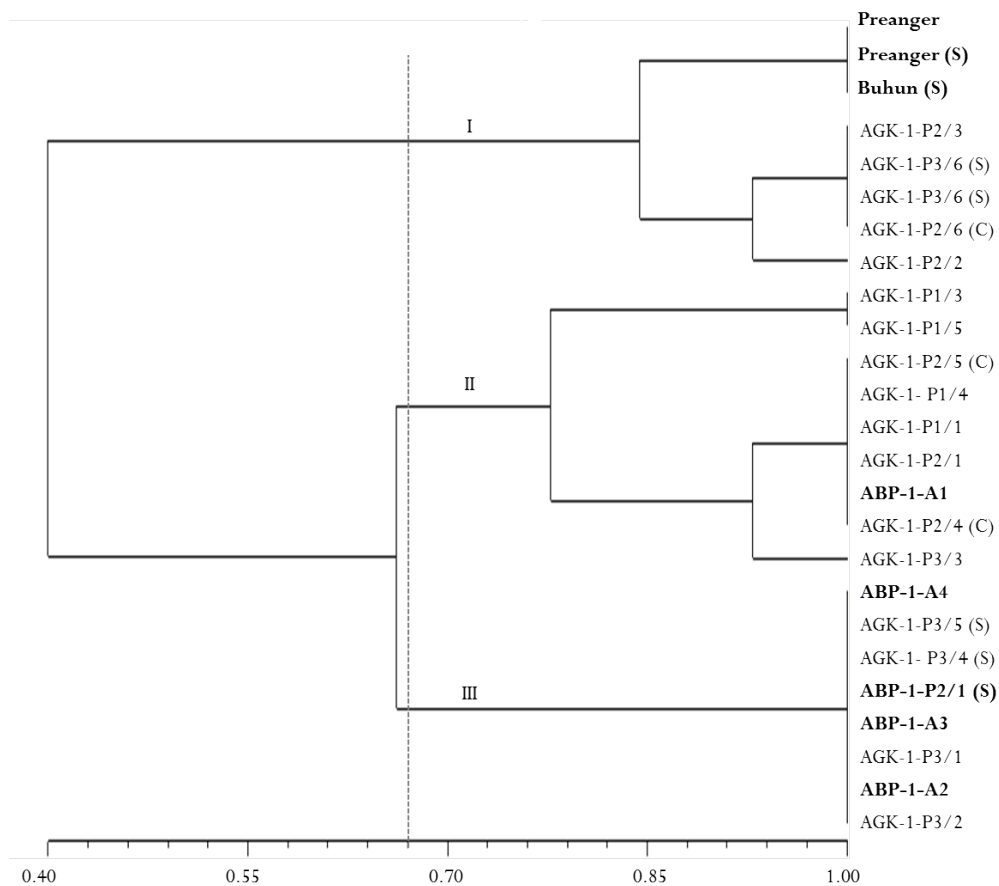
Tabel 3. Keragaman alel dari empat primer SSR polimorfik yang digunakan untuk analisis keragaman genetik kopi Arabika
Table 3. Allele variation among four polymorphic SSR primers used for genetic diversity analysis of Arabica coffee

Nama primer SSR	Jumlah alel	Jumlah alel spesifik	Frekuensi alel mayor	Keragaman gen	Heterozigositas	PIC
M24	3	-	0,60	0,57	0,40	0,52
M42	2	-	0,88	0,21	0,00	0,19
M32	4	-	0,34	0,72	1,00	0,66
SSRCa052	5	2	0,32	0,73	0,72	0,68
Rata-rata	3,5	-	0,53	0,56	0,53	0,51



Gambar 1. Contoh polimorfisme pola pita DNA antar individu dalam populasi kultivar AGK-1 dan pembandingnya yang teridentifikasi pada lokus SSRCa052. Tanda panah menunjukkan pola pita spesifik yang muncul pada dua individu dalam populasi kultivar AGK-1

Figure 1. Polymorphic DNA band patterns among individuals within AGK-1 cultivar and its control varieties identified by locus SSRCa052. The arrows indicated specific band patterns that appear on two individuals in the population of AGK-1 cultivar



Gambar 2. Dendrogram keragaman genetik dalam populasi kultivar kopi Arabika berbuah kuning (AGK-1) dan kekerabatannya dengan yang berbuah merah (ditandai dengan huruf tebal) berdasarkan penanda SSRs

Figure 2. Dendrogram shows genetic diversity in the population of yellow-berried Arabica coffee cultivar (AGK-1) and its relationships with red-berried cultivars (indicated by bold letters) based on SSRs markers

Tabel 4. Nilai jarak genetik antar individu kultivar kopi Arabika berbuah kuning dan kultivar pembandingnya
Table 4. Genetic distance values among individuals of yellow-berried Arabica coffee cultivar and its control varieties

Genotype	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25		
1. <i>Preanger</i>	0,00																										
2. AGK-1 - P1/3	0,36	0,00																									
3. <i>Preanger</i> (S)	0,00	0,36	0,00																								
4. ABP-1 - A4	0,86	0,50	0,86	0,00																							
5. ABP-1 - P2/5 (C)	0,57	0,21	0,57	0,29	0,00																						
6. AGK-1 - P3/5 (S)	0,86	0,50	0,86	0,00	0,29	0,00																					
7. AGK-1 - P2/3	<u>0,14</u>	0,21	<u>0,14</u>	0,71	0,43	0,71	0,00																				
8. <i>Buhun</i> (S)	0,00	0,36	0,00	0,86	0,57	0,86	<u>0,14</u>	0,00																			
9. AGK-1 - P3/6 (S)	<u>0,14</u>	0,21	<u>0,14</u>	0,71	0,43	0,71	0,00	<u>0,14</u>	0,00																		
10. AGK-1 - P1/4	0,57	0,21	0,57	0,29	0,00	0,29	0,00	0,43	0,57	0,43	0,00																
11. AGK-1 - P3/3	0,64	0,29	0,64	0,36	0,07	0,36	0,50	0,64	0,50	0,07	0,00																
12. AGK-1 - P2/2	<u>0,21</u>	0,29	<u>0,21</u>	0,79	0,50	0,79	0,07	0,21	0,07	0,50	0,57	0,00															
13. AGK-1 - P3/4 (S)	0,86	0,50	0,86	0,00	0,29	0,00	0,71	0,86	0,71	0,29	0,36	0,79	0,00														
14. AGK-1 - P1/2	<u>0,14</u>	0,21	<u>0,14</u>	0,71	0,43	0,71	0,00	<u>0,14</u>	0,00	0,43	0,50	0,07	0,71	0,00													
15. AGK-1 - P1/1	0,57	0,21	0,57	0,29	0,00	0,29	0,00	0,43	0,57	0,43	0,00	0,07	0,50	0,29	0,43	0,00	0,29	0,00									
16. ABP-1 - P2 (S)	0,86	0,50	0,86	0,00	0,29	0,00	0,71	0,86	0,71	0,29	0,36	0,79	0,00	0,71	0,29	0,00	0,29	0,00									
17. AGK-1 - P2/1	0,57	0,21	0,57	0,29	0,00	0,29	0,43	0,57	0,43	0,00	0,07	0,50	0,29	0,43	0,00	0,29	0,00	0,00									
18. ABP-1 - A1	0,57	0,21	0,57	0,29	0,00	0,29	0,43	0,57	0,43	0,00	0,07	0,50	0,29	0,43	0,00	0,29	0,00	0,00									
19. AGK-1 - P2/6 (C)	<u>0,14</u>	0,21	<u>0,14</u>	0,71	0,43	0,71	0,00	<u>0,14</u>	0,00	0,43	0,50	0,07	0,71	0,00	0,43	0,71	0,43	0,43	0,00								
20. ABP-1 - A3	0,86	0,50	0,86	0,00	0,29	0,00	0,71	0,86	0,71	0,29	0,36	0,79	0,00	0,71	0,29	0,00	0,29	0,29	0,71	0,00							
21. AGK-1 - P3/1	0,86	0,50	0,86	0,00	0,29	0,00	0,71	0,86	0,71	0,29	0,36	0,79	0,00	0,71	0,29	0,00	0,29	0,29	0,71	0,00	0,00						
22. ABP-1 - A2	0,86	0,50	0,86	0,00	0,29	0,00	0,71	0,86	0,71	0,29	0,36	0,79	0,00	0,71	0,29	0,00	0,29	0,29	0,71	0,00	0,00	0,00					
23. AGK-1 - P3/2	0,86	0,50	0,86	0,00	0,29	0,00	0,71	0,86	0,71	0,29	0,36	0,79	0,00	0,71	0,29	0,00	0,29	0,29	0,71	0,00	0,00	0,00	0,00				
24. AGK-1 - P2/4 (C)	0,57	0,21	0,57	0,29	0,00	0,29	0,43	0,57	0,43	0,00	0,07	0,50	0,29	0,43	0,00	0,29	0,00	0,00	0,43	0,29	0,29	0,29	0,29	0,29	0,29	0,00	
25. AGK-1 - P1/5	0,36	0,00	0,36	0,50	0,21	0,50	0,21	0,36	0,21	0,21	0,29	0,29	0,50	0,21	0,21	0,50	0,21	0,21	0,21	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,21	0,00	

Keterangan: Angka-angka yang digarisbawahi menunjukkan jarak genetik yang sangat dekat antara kultivar AGK-1 dengan kelompok *Typica*
Notes : Underlined numbers showed the proximity relationship between AGK-1 kultivar and *Typica* group

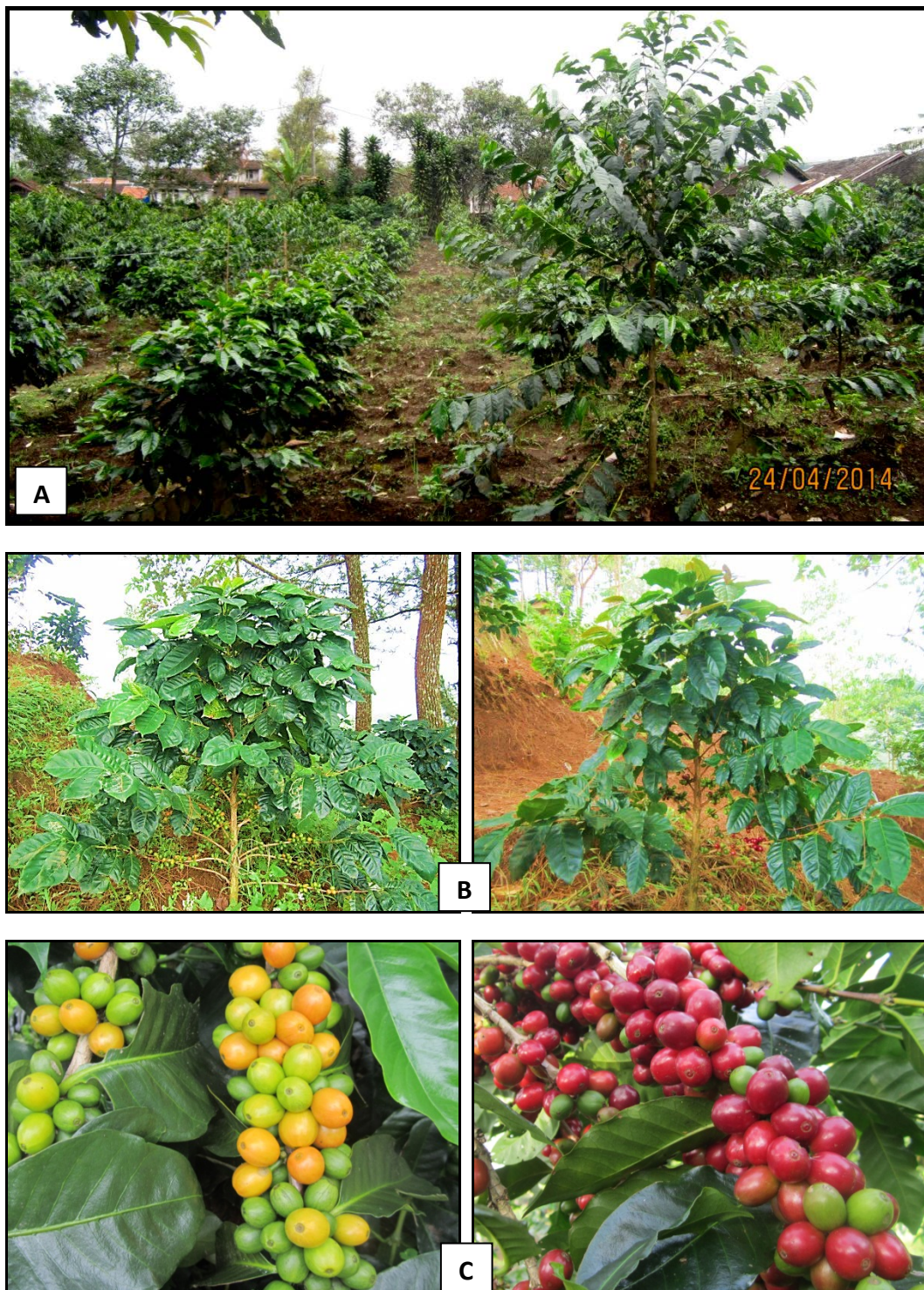


Foto: Dani

Gambar 3. Kultivar kopi Arabika yang dikembangkan petani secara bersamaan pada lahan yang sama: (A) kultivar AGK-1 (kiri) dan Buhun (kanan) umur 2 tahun, (B) kultivar AGK-1 (kiri) dan ABP-1 (kanan) umur 2 tahun, dan (C) buah kultivar AGK-1 (kiri) dan ABP-1 (kanan) umur 4 tahun

Figure 3. Arabica coffee cultivars cultivated by farmers simultaneously in the same field: (A) AGK-1 (left) and Buhun (right) cultivars (2 years old plant), (B) AGK-1 (left) and ABP-1 (right) cultivars (2 years old plant), and (C) coffee berry of AGK-1 (left) and ABP-1 (right) cultivars (4 years old plant)

Kultivar kopi Arabika berbuah kuning yang banyak dikembangkan petani di wilayah Kecamatan Cikajang, Kabupaten Garut tersebut diyakini berasal dari Brasil. Di negara tersebut, banyak dikembangkan kultivar *Catuai* yang merupakan hasil persilangan antara *yellow Caturra* C476-11 dan *Mundo Novo* CP 374-19. Kultivar hibrida tersebut menggabungkan gen vigor pertumbuhan vegetatif lebih baik dari *Mundo Novo* dan perawakan katai dari *Caturra*. Seperti halnya kultivar *Caturra*, kultivar *Catuai* juga terdiri dari dua tipe berdasarkan warna buahnya, yaitu berbuah merah (*Catuai Vermelho*) dan berbuah kuning (*Catuai Amarelo*) (Steiger *et al.*, 2002; Zambolim, 2016). Keduanya memiliki penampilan yang sangat mirip dan hanya mudah dibedakan secara morfologis berdasarkan warna buahnya (merah dan kuning) (Sera *et al.*, 2003). Kemiripan morfologi serupa juga ditunjukkan oleh kultivar AGK-1 dan ABP-1 (Gambar 3), meskipun keduanya memiliki karakteristik mutu citarasa yang berbeda (Randriani *et al.*, 2014; Silva, de Queiroz, Ferreira, Corrêa, & Rufino, 2015).

Warna buah kuning pada kultivar *Catuai* diwarisi dari salah satu tetuanya, yaitu kultivar *yellow Caturra*, yang kemungkinan dikendalikan oleh gen resesif dalam kondisi homozigot *xc xc* (Carvalho, Monaco, & Fazuoli, 1979; Krug, Mendes, & Carvalho, 1949) sebagai hasil mutasi dari tipe berbuah merah (Moura *et al.*, 2015). Perubahan warna buah dari merah menjadi kuning diduga berkaitan dengan perubahan metabolisme pembentukan antosianin, seperti pada *raspberry* (Carvalho *et al.*, 2016), anggur (Rustioni, Rocchi, & Failla, 2015) dan *woodland strawberry* (Zhang *et al.*, 2015). Biosintesis antosianin, yang dikendalikan oleh beberapa gen dan faktor transkripsi, aktivitasnya berkurang pada genotipe berbuah kuning (Lijavetzky *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2015). Warna kuning pada kulit buah juga dapat ditentukan oleh kandungan dan komposisi karotenoid, seperti pada tanaman *peach* (Tuan *et al.*, 2015).

KESIMPULAN

Hasil analisis berdasarkan empat penanda SSR polimorfik (M24, SSRCa052, M32, dan M42) menunjukkan adanya keragaman genetik antar nomor/individu dalam kultivar kopi Arabika berbuah kuning (AGK-1). Terbentuk tiga klaster pada koefisien kesamaan genetik 67%. Salah satu klaster menunjukkan kultivar AGK-1 memiliki jarak genetik lebih dekat dengan kelompok *Typica*, sedangkan dua klaster lainnya menunjukkan kedekatan genetik antara kultivar AGK-1 dan ABP-1. Adanya keragaman individu yang tinggi dalam kultivar AGK-1 memberikan peluang untuk

melakukan seleksi pohon induk terbaik yang dapat dijadikan sebagai sumber benih.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Dinas Perkebunan Kabupaten Garut yang telah mendukung pelaksanaan kegiatan penelitian serta kepada Bapak Hendra, petani kopi Arabika di Kecamatan Cikajang, Garut yang telah membantu menyediakan bahan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Andreazi, E., Sera, G. H., de Faria, R. T., Sera, T., Shigueoka, L. H., Carvalho, F. G., & Carducci, F. C. (2015). Resistance to *Meloidogyne paranaensis* in *Coffea arabica* L. progenies. *Australian Journal of Crop Science*, 9(12), 1190–1196.
- Bailey, D. W. (1978). Sources of subline divergence and their relative importance for sublines of six major inbred strains of mice. doi: <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-507850-4.50020-2>.
- Baliza, D. P., Cunha, R. L., Guimarães, R. J., Barbosa, J. P. R. A. D., Ávila, F. W., & Passos, A. M. A. (2012). Physiological characteristics and development of coffee plants under different shading levels. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 7(1), 37–43. doi: <http://doi.org/10.5039/agraria.v7i1a1305>.
- Brokaw, J. (2013). *Pollinator habitat availability and diversity in various tropical agroforestry management systems of Coffea arabica in Santa Clara, Chiriqui* (Independent Study Project (ISP) Collection. Paper 1597).
- Carvalho, A., Monaco, L. C., & Fazuoli, L. C. (1979). Coffee breeding: XL-progenies and hybrids of the *catuai* cultivar. *Bragantia [Online]*, 38(1), 203–216. doi: <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87051979000100022>.
- Carvalho, E., Franceschi, P., Feller, A., Herrera, L., Palmieri, L., Arapitsas, P., ... Martens, S. (2016). Discovery of A-type procyanidin dimers in yellow raspberries by untargeted metabolomics and correlation based data analysis. *Metabolomics*, 12(9), 144. doi: <http://doi.org/10.1007/s11306-016-1090-x>.
- Combes, M. C., Andrzejewski, S., Anthony, F., Bertrand, B., Rovelli, P., Graziosi, G., & Lashermes, P. (2000). Characterization of microsatellite loci in *Coffea arabica* and related coffee species. *Molecular Ecology*, 9, 1178–1180. doi: <http://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00406.x>.

- Geleta, M., Herrera, I., Monzón, A., & Bryngelsson, T. (2012). Genetic diversity of arabica coffee (*Coffea arabica* L.) in Nicaragua as estimated by simple sequence repeat markers. *The Scientific World Journal*, 2012, 939820. doi: <http://doi.org/10.1100/2012/939820>.
- Gimase, J. M., Thagana, W. M., Kirubi, D. T., Gichuru, E. K., & Gichimu, B. M. (2011). Genetic characterization of arabusta coffee hybrids and their parental genotypes using molecular markers. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 15(2), 31–42.
- Gomez, C., Batti, A., Le Pierrès, D., Claudine, C., Serge, H., Alexandre, de K., ... Valérie, P. (2010). Favourable habitats for *Coffea* inter-specific hybridization in central New Caledonia: Combined genetic and spatial analyses. *Journal of Applied Ecology*, 47(1), 85–95. doi: <http://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2009.01762.x>.
- Gomez, C., Despinoy, M., Hamon, S., Hamon, P., Salmon, D., Doffou, S., ... Poncet, V. (2016). Shift in precipitation regime promotes interspecific hybridization of introduced *Coffea* species. *Ecology and Evolution*, 6(10), 3240–3255. doi: <http://doi.org/10.1002/ece3.2055>.
- Izzah, N. K., Randriani, E., & Dani. (2015). Analisis kekerabatan genetik kultivar kopi arabika berbuah kuning dan berbuah merah berdasarkan marka SSR. *J. TIDP*, 2(3), 113–122. doi: <http://dx.doi.org/10.21082/jtidp.v2n3.2015.p113-122>.
- Jiang, G. (2010). Molecular markers and marker-assisted breeding in plants. In S. B. Andersen (Ed.), *Plant breeding from laboratories to fields* (pp. 45–83). InTech. doi: <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/52583>.
- Kathurima, C. W., Kenji, G. M., Muhoho, S. M., Boulanger, R., Gichimu, B. M., Gichuru, E. K., & Kathurima C. W. (2012). Genetic diversity among commercial coffee varieties, advanced selections and museum collections in Kenya using molecular markers. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, 4(2), 39–46. doi: <http://doi.org/10.5897/IJBC11.231>.
- Kiguongo, A. P. K., Omondi, C. O., Gichuru, E. K., & Kasili, C. O. (2014). Analysis of simple sequence repeat markers linked to coffee berry disease resistance genes in a segregating population of arabica coffee (*Coffea arabica* L.). *Int. J. Biotechnol. Food Sci.*, 2(December), 156–166.
- Krug, C. A., Mendes, J. E. T., & Carvalho, A. (1949). Taxonomia de *Coffea arabica* L.: II - *Coffea arabica* L. Var. Caturra e sua forma Xanthocarpa. *Bragantia*, 9(9–12), 157–163. doi: <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- Lijavetzky, D., Ruiz-García, L., Cabezas, J. A., Andrés, M. T. De, Bravo, G., Ibáñez, A., ... Martínez-Zapater, J. M. (2006). Molecular genetics of berry colour variation in table grape. *Molecular Genetics and Genomics*, 276(5), 427–435. doi: <http://doi.org/10.1007/s00438-006-0149-1>.
- Liu, K., & Muse, S.V. (2005). PowerMarker: Integrated analysis environment for genetic marker data. *Bioinformatics*, 21, 2128–2129.
- Maluf, M. P., Silvestrini, M., Ruggiero, L. M. de C., Guerreiro Filho, O., & Colombo, C. A. (2005). Genetic diversity of cultivated *Coffea arabica* inbred lines assessed by RAPD, AFLP and SSR marker systems. *Scientia Agricola*, 62(4), 366–373. doi: <http://doi.org/10.1590/S0103-90162005000400010>.
- Mishra, M. K., & Slater, A. (2012). Recent advances in the genetic transformation of coffee. *Biotechnology Research International*. doi: <http://doi.org/10.1155/2012/580857>.
- Missio, R., Caixeta, E., Zambolin, E., Zambolin, L., Cruz, C., & Sakiyama, N. (2010). Polymorphic information content of SSR markers for *Coffea* spp. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 10, 89–94.
- Missio, R. F., Caixeta, E. T., Zambolim, E. M., & Sakiyama, N. S. (2009). Development and validation of SSR markers for *Coffea arabica* L. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 9, 361–371.
- Motta, L. B., Soares, T. C. B., Ferrão, M. A. G., Caixeta, E. T., Lorenzoni, R. M., & Neto, J. D. de S. (2014). Molecular characterization of arabica and conilon coffee plants genotypes by SSR and ISSR markers. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(5), 728–735. doi: <http://doi.org/10.1590/S1516-8913201402071>.
- Moura, W. de M., Soares, Y. J. B., Júnior, A. T. do A., de Lima, P. C., Martinez, H. E. P., & Gravina, G. de A. (2015). Genetic diversity in Arabica coffee grown in potassium-constrained environment. *Ciênc. Agrotec., Lavras*, 39(1), 23–31.
- Noirot, M., Charrier, A., Stoffelen, P., & Anthony, F. (2015). Reproductive isolation, gene flow and speciation in the former *Coffea* subgenus: A review. *Trees*, 30(3), 597–608. doi: <http://doi.org/10.1007/s00468-015-1335-8>.
- Pereira, T. B., Setotaw, T. A., Santos, D. N., Carvalho, G. R., Rezende, R. M., & Lavras, U. F. De. (2016). Identification of microsatellite markers in coffee associated with resistance to *Meloidogyne exigua*. *Genetics and Molecular Research*, 15(3), 2–3. doi: <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15038054>.

- Randriani, E., Dani, & Wardiana, E. (2014). Evaluasi Ukuran Biji Beras, Kadar Kafein, dan Mutu Cita Rasa Lima Kultivar Kopi Arabika. *Jurnal Tanaman Industri dan Penyegar*, 1(1), 49–56. doi: <http://dx.doi.org/10.21082/jtidp.v1n1.2014.p49-56>.
- Rohlf, F.J. (2000). NTSYS-PC, numerical taxonomy system for the PC, ExeterSoftware, Ver. 2.1. Setauket: Applied Biostatistics Inc.
- Rubiyo, Izzah, N.K., Sulistiyorini, I., & Tresniawati, C. (2015). Evaluation of genetic diversity in cacao collected from kolaka, Southeast Sulawesi, using SSR markers. *Indones. J. Agric. Sci.*, 16(2), 71–78.
- Rustioni, L., Rocchi, L., & Failla, O. (2015). Effect of anthocyanin absence on white berry grape (*Vitis vinifera* L.). *Vitis - Journal of Grapevine Research*, 54, 239–242.
- Sera, T., Ruas, P. M., Ruas, C. D. F., Diniz, L. E. C., Carvalho, V. D. P., Rampim, L., ... Silveira, S. R. Da. (2003). Genetic polymorphism among 14 elite *Coffea arabica* L. cultivars using RAPD markers associated with restriction digestion. *Genetics and Molecular Biology*, 26(1), 59–64. doi: <http://doi.org/10.1590/S1415-4757200300010010>.
- Silva, S. de A., de Queiroz, D. M., Ferreira, W. P. M., Corrêa, P. C., & Rufino, J. L. dos S. (2015). Mapping the potential beverage quality of coffee produced in the Zona da Mata, Minas Gerais, Brazil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 3098–3108. doi: <http://doi.org/10.1002/jsfa.7485>.
- Steiger, D. L., Nagai, C., Moore, P. H., Morden, C. W., Osgood, R. V., & Ming, R. (2002). AFLP analysis of genetic diversity within and among *Coffea arabica* cultivars. *Theor Appl Genet*, 105, 209–215. doi: <http://doi.org/10.1007/s00122-002-0939-8>.
- Teressa, A., Cruzillat, D., Petiard, V., & Brouhan, P. (2010). Genetic diversity of Arabica coffee (*Coffea arabica* L.) collections. *Ethiopian Journal of Applied Sciences and Technology*, 1(1), 63–79.
- Tran, T. M. H. (2005). *Genetic variation in cultivated coffee (Coffea arabica L.) accessions in northern New South Wales, Australia*. Lismore, NSW: Southern Cross University.
- Tuan, P. A., Bai, S., Yaegaki, H., Tamura, T., Hihara, S., Moriguchi, T., & Oda, K. (2015). The crucial role of PpMYB10.1 in anthocyanin accumulation in peach and relationships between its allelic type and skin color phenotype. *BMC Plant Biology*, 15(1), 280. doi: <http://doi.org/10.1186/s12870-015-0664-5>.
- Wei, H., Chen, X., Zong, X., Shu, H., Gao, D., & Liu, Q. (2015). Comparative transcriptome analysis of genes involved in anthocyanin biosynthesis in the red and yellow fruits of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *PLoS ONE*, 10(3), 1–20. doi: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0121164>.
- Yu, Q., Guyot, R., Kochko, A. De, Byers, A., Navajas-pe, R., Langston, B. J., ... Ming, R. (2011). Micro-collinearity and genome evolution in the vicinity of an ethylene receptor gene of cultivated diploid and allotetraploid coffee species (*Coffea*). *The Plant Journal*, 67, 305–317. doi: <http://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04590.x>.
- Zambolim, L. (2016). Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 41(1), 1–8. doi: <http://doi.org/10.1007/s40858-016-0065-9>.
- Zhang, M., Mao, W., Zhang, G., & Wu, F. (2014). Development and characterization of polymorphic ESTSSR and genomic SSR markers for tibetan annual wild barley. *PLoS ONE*, 9(4), 1–10. doi: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0094881>.
- Zhang, Y., Li, W., Dou, Y., Zhang, J., Jiang, G., Miao, L., ... Zhang, Z. (2015). Transcript quantification by RNA-Seq reveals differentially expressed genes in the red and yellow fruits of *Fragaria vesca*. *PLoS ONE*, 10(12), 1–15. doi: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0144356>.

