

## Ketahanan Galur-Galur Padi *Pup1* terhadap Penyakit Blas

Tasliah, Joko Prasetyono, Tintin Suhartini, dan Ida Hanarida Soemantri

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian  
Jln. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111  
Email: tasliah1@yahoo.co.id

---

Naskah diterima 14 Maret 2014 dan disetujui diterbitkan 19 September 2014

---

**ABSTRACT. Resistance of *Pup1* Rice (*Oryza sativa* Lin.) Lines to Blast Disease.** Blast is one of major disease on the upland rice in Indonesia. Upland rice lines derived from Kasalath and NIL-C443 crosses, containing *Pup1* gen locus had been developed and evaluated for P fertilizer efficiency. Those lines would be evaluated for blast resistance, due to the fact that *Pup1* locus contains genes involved in plant defend mechanism to disease, including blast disease. The  $BC_2F_5$  plants derived from six crosses (DK, DN, SK, SN, BK, BN) were used in this research. Responses to blast disease in the green house were evaluated at ICABIOGRAD Bogor from March to April 2011, using combination of three blast races (race 173, 033, and 133). The response to blast disease in the field was evaluated at Taman Bogo Research Station, Lampung, and at farmer's field in Cikeusal Village, Banten, from January to April 2011. Molecular analysis to trace *Pup1* gene locus was conducted at the Molecular Biology Laboratory, using specific primer K20-2, from January to August 2013. Based on the molecular analysis all *Pup1* lines showed homozygoes alleles, except the heterozygoes alleles on SK7, SK8, SK15, SK16, BN8 line, which were then not included in the next planting. The responses to blast at greenhouse among lines varied, but the *Pup1* lines were mostly at level of moderate resistant (AT). Based on the result from the field experiment, most of *Pup1* lines were resistance, however the susceptible check plant (Kencana Bali) did not show blast fungus infection. Differences of the result might be due to the blast testing at the green house which was more favorable for blast fungal growth. The effect of *Pup1* gene locus showed clearly on resistance of plants obtained from Situ Bagendit cross, where Situ Bagendit was susceptible and does not contain the *Pup1* locus. Additional of *Pup1* locus in Situ Bagendit genome had increased the degree of resistant to blast.

Keywords: Rice,  $BC_2F_5$ , *Pup1*, blast disease.

**ABSTRAK.** Penyakit blas merupakan penyakit utama padi gogo di Indonesia. Galur-galur padi gogo hasil persilangan dengan Kasalath dan NIL-C443 yang mengandung lokus *Pup1* telah dihasilkan dan telah diteliti pengaruhnya terhadap pemupukan P. Galur tersebut perlu diteliti ketahanannya terhadap serangan blas, karena di dalam lokus *Pup1* diketahui mengandung gen-gen yang terlibat dalam mekanisme pertahanan tanaman terhadap penyakit termasuk blas. Tanaman  $BC_2F_5$  dari enam persilangan (DK, DN, SK, SN, BK, BN) digunakan dalam penelitian ini. Evaluasi penyakit blas di rumah kaca dilakukan di BB Biogen pada Maret-April 2011 menggunakan campuran tiga ras blas (ras 173, 033, and 133). Evaluasi penyakit blas di lapangan dilakukan di KP Taman Bogo, Lampung, dan di lahan petani di Desa Cikeusal, Banten, pada Januari-April 2011. Analisis molekuler untuk mengetahui keberadaan lokus *Pup1* dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler BB Biogen, menggunakan primer spesifik K20-2 pada Januari-Agustus 2013. Hasil analisis molekuler menunjukkan semua galur *Pup1* memiliki alel homozigot, kecuali alel heterozigot pada SK7, SK8, SK15, SK16,

BN8. Galur-galur tersebut tidak dapat digunakan dalam penelitian selanjutnya. Pengujian blas di rumah kaca memberikan hasil yang beragam, namun sebagian besar galur yang mengandung *Pup1* bereaksi agak tahan. Hasil penelitian di lapangan, menunjukkan sebagian besar galur *Pup1* bereaksi tahan terhadap blas, namun tanaman pembanding rentan (Kencana Bali) tidak menunjukkan gejala infeksi jamur blas. Percobaan di rumah kaca dinilai dalam kondisi optimal untuk pertumbuhan jamur blas. Pengaruh lokus *Pup1* terlihat jelas terhadap ketahanan blas pada persilangan dengan tetua Situ Bagendit yang tidak mengandung lokus *Pup1*. Penambahan lokus *Pup1* pada genom Situ Bagendit meningkatkan ketahanan terhadap penyakit blas.

Kata kunci: Padi,  $BC_2F_5$ , *Pup1*, penyakit blas.

**B**las yang disebabkan oleh cendawan *Pyricularia oryzae* merupakan salah satu penyakit penting tanaman padi, baik padi gogo maupun padi sawah. Penyakit blas sudah banyak dilaporkan, baik di Indonesia ataupun di negara lain di areal pertanaman padi. Kerugian yang disebabkan oleh penyakit blas cukup tinggi apabila tanaman padi terinfeksi blas leher (*neck blast*). Data Direktorat Jenderal Perlindungan Tanaman Pangan (2010) menunjukkan penularan blas di Indonesia pada tahun 2009 mencapai 19.629 ha (0,15%) dari total 12,88 juta ha area pertanaman padi.

Intensitas penularan blas di lapangan dipengaruhi oleh faktor cuaca dan kondisi tanaman. Tanaman yang lemah, misalnya dengan aplikasi pupuk N yang berlebihan, mudah terinfeksi blas (Dordas 2008). Tanaman yang memiliki figur kuat akan tahan terhadap blas. Salah satu unsur hara yang mempengaruhi ketahanan tanaman terhadap penyakit (termasuk blas) adalah silikat (Romero et al. 2011). Lignin juga dapat mempengaruhi ketahanan tanaman terhadap penyakit dengan mempengaruhi perekatan penyusun komponen lain dalam batang tumbuhan. Protein atau enzim yang terlibat dalam biosintesis lignin adalah *dirigent protein*, yang berperan penting dalam salah satu jalur biosintesis lignin (Bhuiyan et al. 2009, Davin and Lewis 2000).

Lokus *Pup1* (*P uptake 1*) adalah salah satu lokus di dalam kromosom padi varietas lokal kelompok *aus*, yakni varietas Kasalath yang terletak pada kromosom 12. Posisi

lokus tersebut telah dipetakan dan mengandung gen-gen yang terlibat dalam penangkapan unsur fosfor (P) (Wissuwa *et al.* 1998). Menurut Gamuyao *et al.* (2012), di dalam lokus tersebut terdapat gen yang berperan penting dalam pembentukan akar secara eksponensial, yaitu gen *Phosphorus-starvation tolerance 1/PSTOL1*, sehingga penangkapan P menjadi lebih cepat dibandingkan dengan tanaman yang tidak memiliki gen tersebut. Berdasarkan analisis sekuen diketahui pula bahwa pada lokus *Pup1* juga terdapat gen-gen *dirigent-like*, *fatty acid  $\alpha$ -dioxxygenase*, dan *aspartic proteinase*. Gen-gen ini berperan penting dalam peningkatan mekanisme ketahanan tanaman terhadap cekaman abiotik (kekeringan, aluminium) dan biotik (penyakit blas, hawar daun bakteri, dan hama penggerek batang). Gen *dirigent-like* menghasilkan protein yang terlibat dalam biosintesis lignin yang berpengaruh terhadap kekerasan dinding sel tanaman (Heuer *et al.* 2009).

Introgresi lokus *Pup1* ke padi Indonesia (Dodokan, Situ Bagendit dan Batur) menggunakan metode *Marker Assisted Backcrossing* (MAB) telah dilakukan, dan pengujian populasi tanaman silang balik  $BC_2F_3$  terhadap dosis pupuk P di lapangan juga telah dilakukan (Prasetyono *et al.* 2012). Hasilnya menunjukkan bahwa tanaman yang mengandung lokus *Pup1* memiliki figur yang lebih besar dibanding tetuanya. Galur-galur silang balik yang mengandung lokus *Pup1* tersebut juga perlu diuji ketahanannya terhadap penyakit blas, mengingat dalam lokus *Pup1* juga terdapat gen-gen yang mengatur ketahanan penyakit. Lokus *Pup1* yang terintegrasi ke dalam varietas padi Indonesia diharapkan dapat meningkatkan ketahanan terhadap blas. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keberadaan lokus *Pup1* dan ketahanan galur-galur  $BC_2F_3$  *Pup1* terhadap penyakit blas.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di rumah kaca, lapangan, dan laboratorium. Percobaan rumah kaca (Maret-April 2011) dilakukan di BB Biogen, Bogor. Percobaan lapangan (Januari-Mei 2011) dilakukan di Kebun Percobaan Taman Bogo, Lampung, dan lahan petani di Desa Cikeusal, Banten. Percobaan laboratorium (Januari-Agustus 2013) dilakukan di BB Biogen, Bogor.

Bahan percobaan adalah galur-galur silang balik ( $BC_2F_3$ ) dari enam kombinasi persilangan genotipe padi yang merupakan hasil seleksi dari generasi sebelumnya. Galur-galur tersebut terdiri atas 12 galur hasil persilangan Dodokan x Kasalath (DK), 19 galur dari persilangan Dodokan x NIL-C443 (DN), 24 galur dari persilangan Situ Bagendit x Kasalath (SK), 22 galur dari persilangan Situ Bagendit x NIL-C443 (SN), 2 galur dari persilangan Batur

x Kasalath (BK), dan 23 galur dari persilangan Batur x NIL-C443 (BN). Varietas padi yang digunakan sebagai pembanding tetua persilangan adalah Nipponbare dan sebagai pembanding rentan blas adalah Kencana Bali.

### Pengujian di Rumah Kaca

Pada pengujian blas di rumah kaca, benih masing-masing varietas/galur ditumbuhkan pada bak percobaan yang berisi media tanah dengan perbandingan 6,5 kg tanah: 0,5 kg pupuk kandang. Satu bak berisi 10 galur ditambah satu tanaman pembanding rentan. Masing-masing galur ditanam dalam baris berisi 10 benih dan diulang dalam tiga bak. Percobaan menggunakan rancangan acak kelompok.

Isolat patogen blas yang digunakan sebagai inokulum adalah campuran dari tiga ras (173, 033 dan 133) yang diketahui memiliki virulensi tinggi. Isolat diperbanyak dengan menumbuhkan pada cawan petri berisi media *Prune Agar* dan dibiarkan tumbuh pada suhu 28°C selama 7 hari. Untuk merangsang terbentuknya spora, jamur yang telah tumbuh pada media diinkubasi secara terbuka di bawah lampu neon selama 4 hari. Spora yang terbentuk kemudian dipanen dan diinokulasikan ke tanaman.

Proses inokulasi dilakukan mengikuti prosedur Valent dan Chumley (1994). Tanaman uji yang berumur 16 hari diinokulasi dengan cara menyemprotkan 50 ml ( $\pm$  308.000 spora/ml) suspensi inokulum menggunakan pompa vakum (*vacuum pump*). Tanaman yang telah diinokulasi disimpan selama 24 jam di dalam ruang lembab (*moist room*), dan kelembaban dipertahankan >90%. Keesokan harinya tanaman dipindahkan ke dalam ruang inkubasi dengan suhu 25°C selama satu minggu.

Pengamatan dilakukan pada semua tanaman (10 tanaman), satu minggu setelah inokulasi. Untuk mengetahui tingkat penularan blas pada tanaman yang diuji, pengamatan gejala penyakit dilakukan menurut sistem penilaian IRR1 (1996) berdasar luas penularan pada daun tanaman dengan skala 0-9. Skor 0-3 berarti tanaman bersifat tahan (T), skor 4-5 agak tahan (AT), skor 6-7 rentan (R), dan skor 8-9 sangat rentan (SR). Intensitas penularan penyakit blas dihitung dengan rumus:

$$I = \sum \frac{nv}{NV} \times 100\%$$

- I = Intensitas penyakit blas (%)
- n = Jumlah sampel dengan nilai skor tertentu
- v = Nilai skor masing-masing sampel
- N = Jumlah sampel yang diamati
- V = Skala tertinggi penularan blas

Tingkat ketahanan tanaman dinilai berdasarkan intensitas penularan blas dengan kriteria: <25% = tahan (T), 25-50% = agak tahan (AT), 50-90% = rentan (R), dan >90% = sangat rentan (SR).

### Pengujian di Lapangan

Pada pengujian di lapangan, masing-masing galur ditanam pada petak 1 m x 2 m dengan jarak tanam 25 cm x 25 cm, lima baris setiap galur, dan dua benih per lubang tanam. Tanaman yang tumbuh kemudian disisakan satu tanaman per rumpun. Tanaman dipupuk dengan 200 kg urea, 100 kg SP36, dan 100 kg KCl/ha. Pengamatan terhadap blas dilakukan setelah tanaman pembanding rentan menunjukkan intensitas penularan dengan skor 7-9. Tanaman yang diamati adalah lima rumpun per galur/ varietas. Kriteria penularan blas dinilai seperti pada percobaan di rumah kaca.

### Analisis Molekuler Integrasi lokus *Pup1*

DNA untuk analisis molekuler diambil dari daun tanaman setelah pengujian penyakit blas di rumah kaca. Daun dari setiap galur uji yang tidak terinfeksi blas diambil dan dimasukkan ke dalam tabung mikro,

disimpan di dalam freezer untuk digunakan dalam pengujian di laboratorium. Isolasi DNA mengikuti prosedur Dellaporta *et al.* (1983). Analisis molekuler menggunakan primer spesifik *Pup1*, yakni Kas20-2 dengan enzim restriksi *BspI*. Sekuen primer yang digunakan adalah F (TCAAAAATTTCTTCAGGTATGTA CTCC) dan R (TTGGGTGATCAGCTTTCAGA) (Chin *et al.* 2011). Proses PCR berlangsung 7 menit 94°C, 35 siklus dengan 1 menit 94°C, 1 menit 58°C, dan 2 menit 72°C. Perpanjangan akhir selama 10 menit 72°C. Seluruh sampel DNA dicek dengan elektroforesis pada gel 1% untuk melihat sebaran pita. Sampel yang menghasilkan pita kemudian dipotong dengan enzim *BspI*, dan dielektroforesis pada gel agarose 1,5%.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Pengujian di Rumah Kaca dan Lapangan

Intensitas penularan blas di lapangan (Lampung dan Banten) tidak optimal, yang ditandai oleh varietas Kencana Bali sebagai pembanding rentan masih dapat bertahan (Tabel 1-3). Varietas Kencana Bali di kedua lokasi tersebut hanya terinfeksi blas dengan reaksi

Tabel 1. Reaksi ketahanan galur padi terhadap penyakit blas dan hasil analisis molekuler tanaman BC<sub>2</sub>F<sub>5</sub> Dodokan x Kasalath (DK) dan Dodokan x NIL-C443 (DN).

Galur/tetua	Ketahanan terhadap blas				Galur/tetua	Ketahanan terhadap blas			
	Rumah kaca	Lapangan		Analisis molekuler		Rumah kaca	Lapangan		Analisis molekuler
		Banten	Lampung				Banten	Lampung	
DK1	AT	T	T	K	DN1	AT	T	T	N
DK2	AT	T	T	K	DN2	AT	T	T	N
DK3	AT	T	T	K	DN3	AT	T	T	N
DK4	AT	AT	T	K	DN4	AT	AT	T	N
DK5	AT	T	AT	K	DN5	AT	T	T	N
DK6	AT	AT	AT	K	DN6	AT	AT	T	N
DK7	AT	T	T	K	DN7	R	AT	T	N
DK8	T	T	AT	K	DN8	AT	T	T	N
DK9	AT	T	AT	K	DN9	AT	T	T	N
DK10	AT	T	AT	K	DN10	AT	T	T	N
DK11	AT	T	AT	K	DN12	AT	AT	T	N
DK12	AT	T	AT	K	DN13	AT	T	T	N
Dodokan	AT	T	T		DN14	AT	T	T	N
Kasalath	R	AT	T		DN15	AT	T	T	N
Kencana Bali	SR	T	AT		DN16	AT	T	T	N
					DN17	AT	T	T	N
					DN18	AT	T	T	N
					DN19	T	T	T	N
					DN20	T	T	T	N
					Dodokan	AT	T	T	
					NIL- C443	T	T	T	
					Nipponbare	T	T	T	
					Kencana Bali	SR	T	AT	

T = tahan; AT = agak tahan; R = rentan; SR = sangat rentan. K = Kasalath dan N = NIL-C443.

Tabel 2. Reaksi ketahanan galur terhadap penyakit blas dan hasil analisis molekuler tanaman BC<sub>2</sub>F<sub>5</sub> Situ Bagendit x Kasalath (BK) dan Situ Bagendit x NIL-C443 (BN).

Galur/tetua	Ketahanan terhadap blas				Galur/tetua	Ketahanan terhadap blas			
	Rumah kaca	Lapangan		Analisis molekuler		Rumah kaca	Lapangan		Analisis molekuler
		Banten	Lampung				Banten	Lampung	
SK1	AT	T	T	K	SN1	T	T	T	N
SK2	T	T	T	K	SN2	T	T	T	N
SK3	T	T	T	K	SN3	T	T	T	N
SK4	AT	T	T	K	SN4	T	T	T	N
SK5	T	T	T	K	SN5	T	T	T	N
SK6	T	T	T	K	SN6	T	T	T	N
SK7	AT	T	T	H	SN7	T	T	T	N
SK8	T	T	T	H	SN8	T	T	T	N
SK9	T	T	T	K	SN9	T	T	T	N
SK10	AT	T	T	K	SN10	T	T	T	N
SK11	AT	T	T	K	SN11	T	T	T	N
SK12	T	T	T	K	SN12	T	T	T	N
SK13	T	T	T	K	SN13	T	T	T	N
SK14	T	T	T	K	SN14	T	T	T	N
SK15	T	T	T	H	SN15	T	T	T	N
SK16	T	T	T	H	SN16	T	T	T	N
SK17	T	T	T	K	SN17	T	T	T	N
SK18	AT	T	T	K	SN18	T	T	T	N
SK19	T	T	T	K	SN19	T	T	T	N
SK20	T	T	T	K	SN20	T	T	T	N
SK21	T	T	T	K	SN21	T	T	T	N
SK22	T	T	T	K	SN22	T	T	T	N
SK23	T	T	T	K	Situ Bagendit	AT	T	T	
SK24	T	T	T	K	NIL- C443	T	T	T	
Situ Bagendit	T	T	T		Nipponbare	T	T	T	
Kasalath	R	T	AT		Kencana Bali	SR	R	AT	
Kencana Bali	SR	AT	AT						

T = tahan; AT = agak tahan; R = rentan; SR = sangat rentan; K = Kasalath; H = Kasalath dan Situ Bagendit, N = NIL-C443.

maksimal rentan (Banten) dan agak tahan (Lampung). Hal ini disebabkan karena penularan blas di lapangan bergantung kepada ketersediaan inokulum alami pada saat pengujian, sedangkan ketersediaan inokulum bergantung pada faktor cuaca. Pada saat percobaan, kelembaban udara rendah, karena curah hujan tidak tinggi.

Dodokan yang dilepas pada tahun 1987 termasuk cukup tahan terhadap penyakit blas, sedangkan Situ Bagendit yang dilepas pada tahun 2003 termasuk agak tahan (Suprihatno *et al.* 2010). Varietas Batur yang dilepas pada tahun 1988 termasuk tahan blas (Balittan, 1993). Pada percobaan di rumah kaca, varietas Dodokan dan Batur termasuk agak tahan, sedangkan Situ Bagendit termasuk agak tahan sampai tahan, dan tidak ada yang rentan. Walaupun varietas tersebut sudah lebih dari 10 tahun dilepas tetapi masih tahan terhadap tiga isolat blas yang virulen.

Pengaruh lokus *Pup1* terhadap peningkatan ketahanan penyakit blas belum pernah dipublikasi. Asumsi yang dipakai adalah di dalam lokus *Pup1* selain

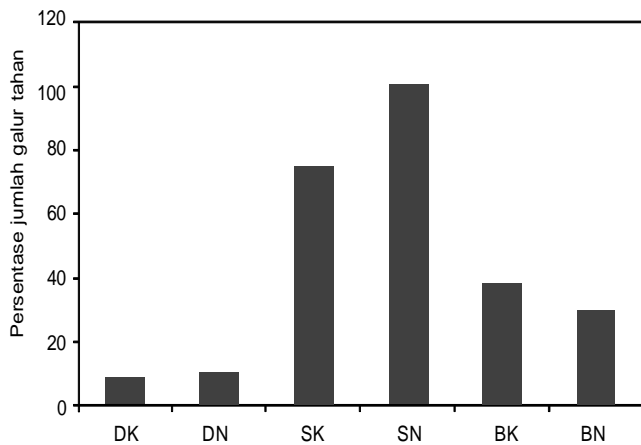
terdapat gen yang mengatur pertumbuhan jaringan (*PSTOL1*) juga terdapat gen-gen yang berkaitan dengan mekanisme ketahanan terhadap penyakit. Sejauh mana gen-gen tersebut mempengaruhi mekanisme ketahanan belum dilakukan penelitian yang mendalam (Heuer *et al.* 2009). Penelitian efek lokus *Pup1* ini masih difokuskan pada hal-hal yang berkaitan dengan penangkapan P (Chin *et al.* 2010, 2011, Gamuyao *et al.* 2012). Secara khusus, efek dari introgresi lokus tersebut pada tetua Dodokan, Situ Bagendit, dan Batur terlihat jelas pada peningkatan bobot kering tajuk pada saat diuji dalam larutan hara Yoshida atau di lapangan (Prasetyono *et al.* 2012). Hal ini menunjukkan lokus *Pup1* memberikan pengaruh positif bagi pertumbuhan vegetatif tanaman padi.

Tambahan lokus *Pup1* berpengaruh terhadap peningkatan ketahanan terhadap penyakit blas pada Situ Bagendit karena varietas tersebut sama sekali tidak mengandung lokus *Pup1*. Hal ini terlihat pada persentase galur BC<sub>2</sub>F<sub>5</sub> yang tahan (T) dibandingkan dengan total dari seluruh galur untuk masing-masing persilangan (Gambar 1). Dibandingkan dengan persilangan

Tabel 3. Reaksi ketahanan galur terhadap penyakit blas dan hasil analisis molekuler tanaman BC<sub>2</sub>F<sub>5</sub> Batur x Kasalath (BK) dan Batur x NIL-C443 (BN).

Galur/tetua	Ketahanan terhadap blas				Galur/tetua	Ketahanan terhadap blas			
	Rumah kaca	Lapangan		Analisis molekuler		Rumah kaca	Lapangan		Analisis molekuler
		Banten	Lampung				Banten	Lampung	
BK1	T	T	T	K	BN1	AT	T	T	N
BK2	T	T	T	K	BN2	AT	T	T	N
BK3	T	T	T	K	BN3	AT	T	T	N
BK4	T	T	T	K	<b>BN4</b>	T	T	T	N
BK5	AT	T	T	K	BN5	AT	T	T	N
BK6	AT	T	T	K	BN6	AT	AT	T	N
BK7	T	T	T	K	BN7	AT	T	T	N
BK8	T	T	T	K	BN8	AT	T	T	<b>H</b>
BK9	T	T	T	K	BN9	AT	AT	T	N
BK10	AT	T	T	K	BN10	AT	T	T	N
BK11	AT	T	T	K	<b>BN11</b>	T	T	T	N
BK12	AT	AT	T	K	BN12	AT	T	T	N
BK13	AT	T	T	K	BN13	AT	T	T	N
BK14	AT	T	T	K	BN14	AT	T	T	N
BK15	AT	T	T	K	BN15	AT	T	T	N
BK16	AT	T	T	K	BN16	AT	T	T	N
BK17	T	T	T	K	BN17	AT	T	T	N
BK18	AT	T	T	K	<b>BN18</b>	T	T	T	N
BK19	AT	T	T	K	BN19	AT	T	T	N
BK20	AT	T	T	K	<b>BN20</b>	T	T	T	N
BK21	AT	T	T	K	<b>BN21</b>	T	T	T	N
Batur	AT	T	T		<b>BN22</b>	T	T	T	N
Kasalath	R	T	T		<b>BN23</b>	T	T	T	N
Kencana Bali	SR	AT	AT		Batur	AT	T	T	
					NIL-C443	T	T	T	
					Nipponbare	AT	T	T	
					Kencana Bali	SR	T	AT	

T = tahan; AT = agak tahan; R = rentan; SR = sangat rentan; K = Kasalath dan N = NIL-C443; H = Kasalath dan Situ Bagendit.



Gambar 1. Histogram persentase jumlah galur padi *Pup1* yang tahan terhadap serangan blas di rumah kaca.

DK = BC<sub>2</sub>F<sub>5</sub> Dodokan x Kasalath,  
 DN = BC<sub>2</sub>F<sub>5</sub> Dodokan x NIL-C443,  
 SK = BC<sub>2</sub>F<sub>5</sub> Situ Bagendit x Kasalath,  
 SN = BC<sub>2</sub>F<sub>5</sub> Situ Bagendit x NIL-C443,  
 BK = BC<sub>2</sub>F<sub>5</sub> Batur x Kasalath,  
 BN = BC<sub>2</sub>F<sub>5</sub> Batur x NIL-C443

Dodokan dan Batur, galur-galur BC<sub>2</sub>F<sub>5</sub> turunan Situ Bagendit menduduki peringkat tertinggi dibandingkan dengan turunan Dodokan dan Batur. Sumbangan lokus *Pup1* secara penuh pada Situ Bagendit menunjukkan peningkatan ketahanan terhadap blas. Batur memiliki lokus *Pup1* secara parsial (tidak utuh) sehingga efek dari introgresi lokus tersebut tidak terlalu besar, bahkan Dodokan yang punya lokus *Pup1* secara penuh tidak terlalu berpengaruh terhadap peningkatan ketahanannya terhadap blas. Penelitian ini masih perlu dilanjutkan untuk membuktikan pengaruh lokus *Pup1* terhadap kadar lignin, perubahan ketebalan dinding sel dan sebagainya. Namun, hasil penelitian ini mendukung dugaan bahwa lokus *Pup1* selain mengandung gen-gen yang berhubungan dengan pertumbuhan vegetatif juga mengandung gen-gen yang secara tidak langsung dapat meningkatkan ketahanan terhadap penyakit blas.

Hal yang kontradiktif pada penelitian ini adalah tetua Kasalath dan NIL-C443 sebagai tetua donor memiliki karakter yang kontras. Kasalath ternyata tidak tahan blas



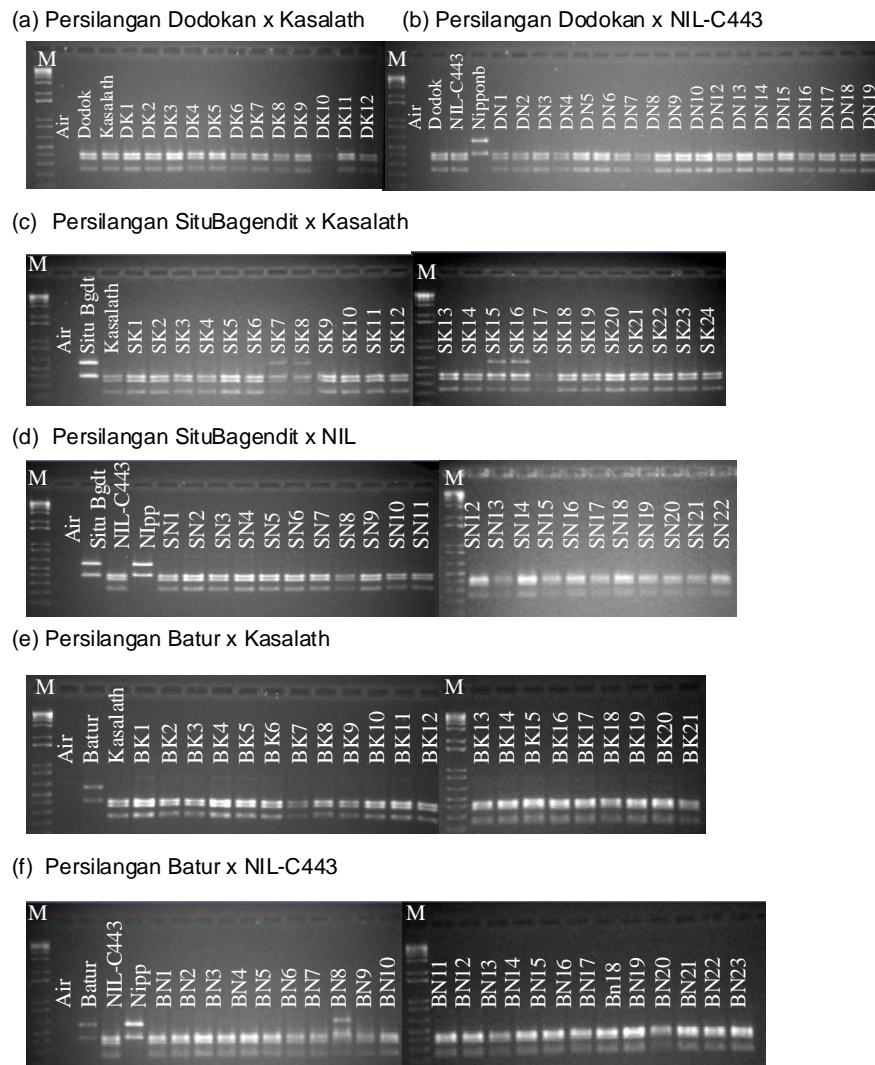
walaupun sebagai donor utama lokus *Pup1* (Takehisa *et al.* 2009), sedangkan Nipponbare sebagai tetua dari NIL-C443 tahan blas (sesuai dengan penelitian Hayashi *et al.*, 2006). Dari hasil analisis QTL terhadap persilangan Kasalath dengan Nipponbare (mengandung gen *pia* dan *pish*) diketahui bahwa Kasalath memiliki gen ketahanan yang terletak di daerah yang berdekatan dengan alel gen *pia* pada kromosom 11 dan mengindikasikan bukan sebagai alel *pia*, tetapi merupakan gen tahan yang baru. Namun, gen ketahanan tersebut tidak mampu juga menahan campuran tiga isolat yang ada di Indonesia. Nipponbare memiliki gen-gen yang cukup efektif sebagai sumber gen ketahanan untuk menghadapi isolat blas dari Indonesia.

Pada galur-galur SK dan SN terlihat galur SN memiliki tingkat ketahanan yang lebih tinggi dibandingkan

dengan SK, diduga gen karena dari NIL-C443 turut meningkatkan ketahanan, selain lokus *Pup1*. Namun, penggunaan NIL-C443 sebagai tetua donor umumnya akan menurunkan hasil, karena *background* Nipponbare yang terdapat pada NIL-C443 akan memperpendek waktu berbunga dan meningkatkan gabah hampa.

### Analisis Molekuler Integrasi Lokus *Pup1*

Hasil amplifikasi galur-galur *Pup1* menggunakan primer K20-2 dan enzim restriksi *Bsp1* menunjukkan seluruh galur DK, DN, SN, dan BK memiliki pita yang mirip dengan Kasalath dan NIL-C443, berarti lokus *Pup1* masih terintegrasi dalam genom galur-galur tersebut (Gambar 2), sedangkan skor masing-masing galur dapat dilihat pada Tabel 1-3.



Gambar 2. Hasil amplifikasi galur-galur *Pup1* menggunakan primer K20-2 yang dipotong dengan enzim *Bsp1*. M=100 bp DNA marker.

Dari persilangan SK dan BN terdapat beberapa galur seperti SK7, SK8, SK15, SK16, dan BN8 yang masih memiliki pita heterozigot. Artinya, galur-galur tersebut mengandung lokus *Pup1*, tetapi hanya terdapat pada satu lengan kromosom. Kromosom yang lain sebagai komplemennya masih membawa lokus tetua penerima. Galur-galur heterozigot tersebut memiliki peluang sebesar 50% untuk mengekspresikan lokus *Pup1*. Primer K20-2 ini merupakan salah satu primer spesifik yang dapat menunjukkan keberadaan lokus *Pup1*.

Pada generasi BC<sub>2</sub>F<sub>3</sub> sebetulnya galur-galur *Pup1* yang dianalisis molekuler menunjukkan homozigot untuk lokus *Pup1* (Prasetyono *et al.*, 2012). Pada generasi BC<sub>2</sub>F<sub>5</sub> beberapa tanaman menunjukkan lokus yang heterozigot. Walaupun primer yang digunakan pada generasi BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>/BC<sub>2</sub>F<sub>3</sub> berbeda dengan yang digunakan dalam penelitian ini (BC<sub>2</sub>F<sub>5</sub>), namun posisi primer berdekatan dengan primer K20-2, dan masih berada dalam lingkungan *Pup1*. Pada pengembangan populasi dari BC<sub>2</sub>F<sub>3</sub> ke BC<sub>2</sub>F<sub>5</sub> seluruh sampel ditanam di lapangan dan dipilih berdasarkan penampilan tanaman di lapangan. Masih terdapat lokus yang heterozigot kemungkinan disebabkan oleh peristiwa pindah silang kromosom yang tidak biasa (*non homologous crossing over*). Fenomena ini jarang terjadi, dan biasanya akan menimbulkan peristiwa duplikasi gen (Magadum *et al.* 2013). Pada padi, fenomena pindah silang yang bukan kromosom homolognya juga telah dibuktikan oleh Gong *et al.* (2011). Hal ini membuktikan pada genom padi hasil persilangan yang belum stabil dapat terjadi peristiwa yang tidak biasa untuk menuju genom yang stabil. Seleksi secara molekuler dapat menyaring individu/galur yang tidak diharapkan tersebut untuk tidak diikuti sertakan dalam pertanaman berikutnya.

Peristiwa ini menunjukkan bahwa pada kegiatan MAB sebaiknya setiap generasi dilakukan evaluasi homozigositas gen lokus secara molekuler, selain seleksi di lapangan berdasarkan penampilan tanaman. Hambatan yang biasa dihadapi adalah saat seleksi di lapangan, tanaman yang jumlahnya mencapai ribuan, sehingga untuk seleksi molekuler diperlukan biaya besar. Analisis molekuler biasanya dilakukan lagi pada saat jumlah tanaman yang terseleksi tinggal sedikit. Analisis molekuler juga dapat menyaring tanaman yang tercampur karena kesalahan seleksi di lapangan. Tanaman pada generasi BC<sub>2</sub>F<sub>5</sub> kemungkinan masih terjadi segregasi menuju kestabilan genom yang biasanya dicapai pada generasi F<sub>7</sub> (BC<sub>2</sub>F<sub>7</sub>).

Berdasarkan penelitian Chin *et al.* (2011), tetua Dodokan mengandung lokus *Pup1* secara penuh, Situ Bagendit tidak mengandung lokus *Pup1*, sedangkan Batur ternyata sudah mengandung sebagian lokus *Pup1*.

Perbedaan kondisi lokus *Pup1* ini diprediksi akan membawa pengaruh yang besar pada turunan Situ Bagendit, disusul Batur, dan efek yang kecil pada turunan Dodokan. Pita Kasalath atau NIL-C443 sejajar dengan tetua Dodokan (Gambar 1a dan 1b). Hal ini menunjukkan bahwa pada lokus tersebut tetua Dodokan memiliki lokus *Pup1* yang sama persis dengan Kasalath atau NIL-C443. Namun, uji sekuensing belum dilakukan untuk membuktikan apakah seluruh gen di daerah lokus *Pup1* pada Dodokan sama persis dengan daerah *Pup1* pada Kasalath atau NIL-C443.

## KESIMPULAN

Galur-galur BC<sub>2</sub>F<sub>5</sub> yang berasal dari persilangan varietas Dodokan x Kasalath, Dodokan x NIL-C443, Situ Bagendit x Kasalath, Situ Bagendit x NIL-C443, Batur x Kasalath, dan Batur x NIL-C443 mengandung lokus *Pup1*. Peningkatan ketahanan terhadap penyakit blas pada galur-galur padi yang memiliki lokus *Pup1* terlihat jelas pada persilangan dengan tetua Situ Bagendit. Pada persilangan dengan tetua Batur dan Dodokan, pengaruh lokus *Pup1* terhadap penyakit blas tidak terlalu besar.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Disampaikan terima kasih kepada Proyek Generation Challenge Programme yang telah membiayai penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bhuiyan, N.H., G. Selvaraj, Y. Wei, and J. King. 2009. Role of lignification in plant defense. *Plant Signaling and Behavior* 4(2): 158-159.
- Balittan. 1993. Deskripsi Varietas unggul padi 1943-1992. Pusat Penelitian dan Pengembangan Pertanian Tanaman Pangan. 123p.
- Chin, J.H., X. Lu, S.M. Haefele, R. Gamuyao, A.M. Ismail, M. Wissuwa, and S. Heuer. 2010. Development and application of gene-based markers for the major rice QTL Phosphorus uptake 1. *Theor. Appl. Genet.* 120:1073-1086.
- Chin, J.H., R. Gamuyao, C. Dalid, M. Bustamam, J. Prasetyono, S. Moeljopawiro, M. Wissuwa, and S. Heuer. 2011. Developing rice with high yield under phosphorus deficiency: *Pup1* sequence to application. *Plant Physiology* 156:1202-1216.
- Davin, L.B. and N.G. Lewis. 2000. Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radial precursor coupling in lignan and lignin biosynthesis. *Plant Physiology* 123:453-461.
- Dellaporta, S.L., J. Wood, and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant. Mol. Biol. Rep.* 1(4):19-21.

- Direktorat Jenderal Perlindungan Tanaman Pangan. 2010. Serangan penyakit blas pada padi di Indonesia masa tanam 2002-2009. Unpublished.
- Dordas, S. 2008. Role of nutrients in controlling plant diseases in sustainable agriculture: a review. p. 443-460. *In* Lichtfouse, C., M. Navarrete, P. Debacke, V. Sourchere, and C. Alberola (eds). Sustainable Agriculture, Volume 1. Springer Science+Business Media B.V.-EDP Sciences 2009. DOI 10.1007/978-90-481-2666-8\_280.
- Gamuyao R., J.H. Chin, J.P. Tanaka, P. Pesaresi, S. Catausan, C. Dalid, I.S. Loedin, E.M.T. Mendoza, M. Wissuwa, and S. Heuer 2012. The protein kinase *Pstol1* from traditional rice confers tolerance of phosphorus deficiency. *Nature* 488:535-541.
- Gong, Z., X. Liu, D. Tang, H. Yu, C. Yi, Z. Cheng, and M. Gu. 2011. Non-homologous chromosome pairing and crossover formation in haploid rice meiosis. *Chromosome* 120:47-60.
- Hayashi, K., H. Yoshida, and I. Ashikawa. 2006. Development of PCR-based allele specific and InDel marker sets for nine rice blast resistance genes. *Theor. App. Gen.* 113:251-260.
- Heuer, S., X. Lu, J.H. Chin, J.P. Tanaka, H. Kanamon, T. Matsumoto, T.D. Leon, V.J. Ulat, A.M. Ismail, M. Yano, and M. Wissuwa. 2009. Comparative sequence analyses of the major quantitative trait locus phosphorus uptake 1 (*Pup1*) reveal a complex genetic structure. *Plant Biotech. J.* 7:456-471.
- IRRI. 1996. Standard Evaluation System for Rice. International Rice Research Institute. Fourth Edition. Philippines. 52p.
- Magadum, S., U. Banerjee, P. Murugan, D. Gangapur, and R. Ravikesava. 2013. Gene duplication as a major force in evolution. *Journal of Genetics* 92:155-161.
- Prasetyono, J., T. Suhartini, I.H. Soemantri, Tasliah, S. Moeljopawiro, H. Aswidinnoor, D. Sopandie, dan M. Bustaman. 2012. Evaluasi beberapa galur-*Pup1* tanaman Padi (*Oryza sativa* L.) pada larutan hara dan lapangan. *J. Agron. Indonesia* 40(2):83-90.
- Romero, A., F. Munévar, and G. Cayon. 2011. Silicon and plant diseases. A review. *Agronomia Colombiana* 29(3):473-480.
- Suprihatno, B., A.A. Daradjat, Satoto, Baehaki S.E., Suprihanto, A. Setyono, S.D. Indrasari. I.P. Wardana, dan H. Sembiring. 2010. Deskripsi Varietas Padi. Balai Besar Penelitian Tanaman Padi, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian Departemen Pertanian. 109p.
- Takehisa, H, M. Yosuda, Y. Fukuta, N. Kobayashi, N. Hayashi, H. Nakashita, T. Abe, and T. Sato. 2009. Genetic analysis of resistance genes in Indica-type rice (*Oryza sativa* L.) Kasalath, using DNA markers. *Bred. Sci.* 59:253-260.
- Valent, B and Chumley, F.G. 1994. Avirulence genes and mechanisms of genetic instability in rice blast fungus. di dalam: R.S. Zeigler, S.A. Leong, and P.S. Teng (eds). Rice blast disease. Wallingford (UK): CAB International. hlm. 111-134.
- Wissuwa M., M. Yano, and N. Ae. 1998. Mapping of QTLs for phosphorus-deficiency tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 97: 777-783.