

# Isolasi, Identifikasi, dan Karakterisasi Cendawan Blas *Pyricularia oryzae* Hasil Rejuvenasi

Puji Lestari, Wawan, Tri P. Priyatno, Wening Enggarini, Reflinur, dan Yadi Suryadi\*

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111  
Telp. (0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820; \*E-mail: yshid@yahoo.co.uk

Diajukan: 12 Februari 2014; Diterima: 10 April 2014

## ABSTRACT

**Isolation, Identification, and Characterization of Blast Fungus *Pyricularia oryzae* Derived from Rejuvenation.** Puji Lestari, Wawan, Tri P. Priyatno, Wening Enggarini, Reflinur, and Yadi Suryadi. Blast disease caused by *Pyricularia oryzae* (*Po*) is one of the important diseases on rice crop in Indonesia. This study was aimed at obtaining blast fungus pathogen rejuvenated from preserved seed origin, agar medium and rice leaf tissue. In addition, we identified blast isolates for long-term storage collection, and characterized isolates towards their specific locus of genes virulence. The results revealed that 22.7% isolates stored in agar media produced a typical mycelium of *Po*. The specificity of total genomic DNA banding pattern of isolates which were analyzed using specific primers encoding virulence genes of *Cut1*, *Erg2*, and *Pwl2*, showed six haplotypes consist of B-001 (1 isolate), C-011 (1 isolate), D-111 (8 isolate), F-110 (1 isolate), G-100 (3 isolate), and H-101 (2 isolate). None of haplotypes A-000 and E-010 were found among the isolates studied. In regard to its pathogenicity, the majority of *Po* fungal isolates had *Cut1*, *Pwl2*, and *Erg2* genes. Among the total isolates of the *Po* fungus, the greatest proportion of genes were *Pwl2* (87.5%) followed by *Cut1* (75%) and *Erg2* (62.4%) genes.

**Keywords:** Rice, characterization, blast, *Pyricularia oryzae*, rejuvenation.

## ABSTRAK

Penyakit blas yang disebabkan oleh cendawan *Pyricularia oryzae* (*Po*) merupakan salah satu penyakit penting pada pertanaman padi di Indonesia. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan cendawan patogen blas yang berasal dari hasil rejuvenasi simpanan benih, media agar, dan jaringan daun padi. Selain itu, identifikasi koleksi isolat blas yang ditujukan untuk penyimpanan jangka panjang dan karakterisasi kespesifikan tiap isolat terhadap lokus spesifik gen virulensi. Hasil pengujian menunjukkan 22,7% isolat yang tersimpan dalam media agar masih menunjukkan tipikal miselium *Po*. Kespesifikan pola pita DNA genomik total isolat yang dianalisis berdasarkan primer penyandi gen spesifik virulensi *Cut1*, *Erg2*,

dan *Pwl2*, diperoleh sebanyak enam haplotipe meliputi B-001 (1 isolat), C-011 (1 isolat), D-111 (8 isolat), F-110 (1 isolat), G-100 (3 isolat), dan H-101 (2 isolat). Tidak ditemukan haplotipe A-000 dan E-010 pada isolat *Po* yang dianalisis. Dalam hubungannya dengan patogenisitas, mayoritas cendawan *Po* mempunyai gen *Cut1*, *Pwl2*, dan *Erg2*. Di antara total isolat cendawan *Po*, gen yang paling besar ditemukan proporsinya adalah gen *Pwl2* (87,5%) diikuti *Cut1* (75%) dan *Erg2* (62,4%).

**Kata kunci:** Padi, karakterisasi, blas, *Pyricularia oryzae*, rejuvenasi.

## PENDAHULUAN

Penyakit blas yang disebabkan oleh cendawan *Pyricularia oryzae* (*Po*) adalah salah satu penyakit penting pada padi gogo, pasang surut atau lahan rawa dan dapat menyebabkan penurunan produksi padi secara drastis. Penyakit ini mudah beradaptasi dalam kondisi lingkungan dengan suhu yang fluktuatif dan kelembaban tinggi. Blas juga tersebar di sawah tadah hujan maupun sawah beririgasi (Santoso *et al.*, 2007). Penyakit blas dilaporkan di banyak negara penghasil padi (Rao, 1994), termasuk banyak ditemukan pada ekosistem padi gogo di Indonesia, di mana luas serangan penyakit blas diperkirakan mencapai 19.629 ha dari total luas pertanaman padi sebesar 12.883.576 ha pada tahun 2009 (BPS, 2010). Penanaman varietas tahan merupakan cara yang paling efektif dan ekonomis untuk mengendalikan penyakit blas padi. Banyak varietas tahan telah dikembangkan, namun seiring waktu, ketahanan dengan gen dominan tunggal mengalami penurunan terutama karena munculnya ras patogen baru (Utami *et al.*, 2006). Hal ini dikarenakan perubahan secara genetik pada cendawan *Po* berlangsung terus menerus sehingga varietas

tahan akhirnya pada titik tertentu terpatahkan oleh infeksi patogen (Kang dan Lee, 2000).

Serangan cendawan *Po* dapat terjadi pada daun, buku, leher malai, bulir padi, dan leher daun (Scardaci *et al.*, 1997). Gejala khas pada malai yang sering ditemukan, yaitu adanya bercak kehitaman dengan malai yang patah, atau bulir yang mengering dan hampa, menyebabkan persentase gabah berisi sangat rendah. Pada taraf serangan blas daun yang tinggi dapat menyebabkan infeksi serangan pada tangkai malai (*neck blast*) sehingga dapat menyebabkan kehilangan hasil (Gill dan Bonman, 1988).

Gejala blas pada biji padi biasanya berbentuk bintik-bintik dan bercak cokelat, dan kadang-kadang berbentuk berlian klasik seperti sering terlihat pada daun. Meskipun peran benih padi dalam siklus hidup cendawan belum jelas, *Po* dianggap patogen tular benih yang sangat penting dan memiliki frekuensi terdeteksi yang rendah (Mew dan Gonzales, 2002). Namun demikian, dalam teknik penyimpanan isolat, cendawan *Po* sering diisolasi dari daun, biji padi/gabah maupun bagian tanaman lainnya dan sering disimpan pada media kertas saring steril atau langsung pada biji padi yang merupakan salah satu teknik penyimpanan cendawan patogen blas.

Gen yang berhubungan dengan sifat virulensi pada *Po* secara genetik telah dikaji oleh beberapa peneliti (Chao dan Ellingboe, 1997; Valent *et al.*, 2001). Selain itu, beberapa gen resisten terhadap *Po*, gen yang mengontrol kompatibilitas dengan varietas tertentu, dan gen-gen yang mengontrol perkembangan blas selama infeksi termasuk gen yang mempengaruhi pembentukan apresorium dan fungsi penetrasi apresorium juga telah dilaporkan (Chao dan Ellingboe, 1997; Kang dan Lee, 2000; Lau dan Ellingboe, 1993). Famili gen *Pwl* selain *Pwl1* (Kang dan Lee, 2000) dan beberapa gen spesifik yang berperan dalam pengenalan inang *Po*, yaitu *Cut1*, *Erg2*, dan *Pwl2*. Gen *Cut1* merupakan lokus yang menjadikan gen *cutinase* berfungsi sebagai pendegradasi lapisan kutikula tanaman (Sweigard *et al.*, 1992). Gen *Erg2* berperan sebagai penyandi metabolit sekunder pada cendawan yang menjadi target antifungal pada sel tanaman (Keon *et al.*, 1994), sedangkan *Pwl2* dikenal sebagai gen avirulen yang bersifat spesifik inang (Valent dan

Chumley, 1994). Ketiga gen tersebut banyak digunakan sebagai marka DNA yang dikenal sebagai *sequence characterized amplified region* (SCAR) (Soubabere *et al.*, 2001), termasuk penggunaannya dalam studi keragaman genetik cendawan *Po* (Reflinur *et al.*, 2005).

Tujuan penelitian ini adalah (1) merejuvenasi cendawan patogen blas yang berasal dari biji padi sebagai media penyimpanan cendawan dan bagian jaringan lain padi, (2) mengidentifikasi isolat blas dalam usaha pengoleksian dan penyimpanan di bank gen, dan (3) mengkarakterisasi kespesifikan isolat *Po* terhadap lokus spesifik yang berhubungan dengan gen virulensi.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia, Laboratorium Mikrobiologi, Laboratorium Terpadu, dan Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian pada tahun 2011. Sebagai sumber isolat, sebanyak 32 isolat cendawan blas hasil koleksi Kelti Biologi Molekuler diisolasi kembali dari sarana penyimpanan biji padi, dan diperbanyak kembali pada media agar. Sebanyak delapan sampel daun padi yang diduga terinfeksi patogen blas juga digunakan sebagai sumber materi untuk isolasi cendawan.

### Isolasi dan Identifikasi Cendawan *Po*

Isolasi cendawan blas *Po* dari biji padi dilakukan menggunakan metode monokonidia (Agrios, 1988; Bonman *et al.*, 1986). Benih atau bagian jaringan tanaman yang diduga mengandung patogen blas ditumbuhkan pada cawan petri steril yang dijaga kelembabannya. Cendawan yang tumbuh pada benih dipindah dan ditumbuhkan pada cawan petri yang mengandung media agar buatan *potato dektrose agar* (PDA) (terdiri atas kentang 300 g, dektrose 20 g, bakto agar 20 g, dilarutkan dalam H<sub>2</sub>O 1 liter), kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 5–7 hari. Miselia cendawan yang sudah tumbuh dipindahkan pada tabung agar miring. Untuk membuktikan bentuk spora cendawan blas, miselium ditumbuhkan kembali pada media *oat meal agar* (OMA) (30 g *oat meal*, 20 g agar, dan

5 g sukrose) diinkubasi selama 7–8 hari suhu pada ruang. Cendawan yang tumbuh pada media agar tersebut secara aseptik dicuci air destilata steril untuk menghilangkan hifa *aerial*. Selanjutnya cendawan diberi perlakuan penyinaran (Manandhar, 1998) selama 3–5 hari untuk menginduksi pembentukan spora. Spora dikoleksi dengan menyiramkan sebanyak 10 ml destilata steril pada permukaan cendawan, kemudian spora dipanen dengan cara digosok menggunakan kuas steril. Suspensi spora disaring dengan kain saring steril dan disimpan dalam tabung erlenmeyer sampai dilakukan pengamatan. Sampel suspensi spora yang diduga patogen blas diidentifikasi bentuk dan jenisnya (Bonman *et al.*, 1986) dan diamati di bawah mikroskop cahaya dengan berbagai perbesaran. Cendawan *Po* dapat diidentifikasi dengan adanya konidia yang berbentuk mirip gada warna abu-abu dan umumnya memiliki dua septa, namun kadang-kadang ditemukan juga satu atau tiga septa. Isolat yang menunjukkan cendawan *Po* disimpan di agar PDA maupun gliserol 10% untuk disimpan sebagai stok murni. Biakan tersebut juga digunakan sebagai sumber isolasi DNA untuk dilakukan amplifikasi PCR.

#### Isolasi DNA Cendawan *Po*

Sebanyak 16 isolat cendawan yang terdiri atas 12 isolat patogen blas *Po* dan empat isolat yang diduga sebagai *Po*, ditumbuhkan dalam media PD cair selama 5–7 hari. Miselia cendawan disaring dari kultur cair menggunakan kain saring *Whatman* No. 1, kemudian disimpan di dalam wadah atau dibungkus menggunakan alumunium foil steril. Miselia selanjutnya dikeringkan pada suhu 50°C selama 24 jam. Miselia disimpan pada suhu -20°C sampai siap diisolasi DNA-nya. Isolasi DNA dilakukan mengikuti prosedur Pich dan Schubert (1993). Miselia kering digerus menggunakan mortar steril lalu ditambahkan bufer ekstraksi sebanyak 1 ml. Campuran miselia halus tersebut dimasukkan dalam tabung mikro ukuran 1,5 ml. Sebanyak masing-masing 100 µl bufer SDS 20% dan PVP 6% ditambahkan, kemudian campuran divorteks sampai tidak ada gumpalan, dan diinkubasi pada suhu 65°C selama 30 menit dalam oven/*waterbath*. Sebanyak 150 µl potasium asetat 5 M ditambahkan, divorteks kemudian diinkubasi dalam *freezer* -20°C selama

30 menit. Setelah inkubasi, campuran disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Supernatan yang diambil ditambah 200 µl fenol dan 200 µl kloroform isoamilalkohol (24 : 1), dicampur perlahan, kemudian disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 10 menit. Supernatan ditambahkan 100 µl sodium asetat 3 M, dan 500 µl isopropanol dingin, diinkubasi pada suhu -20°C selama 30–60 menit. Akhir inkubasi, campuran disentrifugasi lagi pada 12.000 rpm selama 10 menit. Pelet yang mengendap di bagian bawah tabung dicuci dengan 100 µl ethanol absolut, kemudian pelet dipisahkan dari supernatan dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Pelet yang mengandung DNA dilarutkan dengan bufer TE atau air destilata dan disimpan pada suhu -20°C. Hasil DNA yang berhasil diisolasi kemudian diuji kuantitas dan kualitasnya dengan alat NanoDrop2000.

#### Amplifikasi PCR

Uji genotipe cendawan *P. oryzae* dilakukan menggunakan marka berbasis gen untuk sifat virulensi, yaitu marka *Erg2*, *Pwl2*, dan *Cut1* (Soubabere *et al.*, 2001). Ukuran ampikon tiap primer untuk gen *Erg2* adalah 1.440 bp, *Pwl2* 900 bp, dan *Cut1* 1.730 bp berlainan pada DNA genomik cendawan *Po*. Urutan basa tiap primer tersebut adalah *Cut1* : F:5'-TATAGCGTTGACCTTGTTGGA-3', R:5'-TAAGCATCTCAGACCGAACC-3', *Erg2* : F:5'-GCAGGGCTCATTCTTTTCT-3', R:5'-CCGACTGGAAGGTTTCTTTA-3'; dan *Pwl2* : F:5'-TCCGCCACTTTTCTCATTC-3', R:5'-GCCCTCTTCTCGCTGTTTCAC-3'.

Reaksi PCR dilakukan pada total reaksi 20 µl volume yang mengandung 40 ng DNA, 0,2 µM dNTPs, 1 pmol primer *forward* dan *reverse*, 1 U enzim *Taq* DNA *polymerase* (Vivantis), 1x bufer dan GC-rich 5%. Program PCR diawali dengan denaturasi awal pada 94°C selama 5 menit, proses amplifikasi sebanyak 30 siklus, yakni 94°C selama 30 detik, 52°C selama 30 detik, 72°C selama 30 detik, dan siklus terakhir pada 72°C selama 10 menit. Elektroforesis produk PCR dilakukan pada gel agarosa 2% (w/v) untuk mengidentifikasi ampikon tiap primer sesuai ukuran referensi (Soubabere *et al.*, 2001). Pita DNA hasil amplifikasi yang muncul untuk setiap primer dari masing-masing isolat

diskor dengan nilai 1 (ada) dan 0 (tidak ada). Selanjutnya data ini digunakan untuk mengelompokkan isolat-isolat uji menjadi beberapa haplotipe, berdasarkan kombinasi ketiga jenis gen (*Pwl2*, *Erg2*, dan *Cut1*) pada isolat-isolat yang diuji.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Isolasi dan Identifikasi Cendawan *Po*

Hasil rejuvenasi isolat *Po* dan identifikasi berdasarkan morfologi konidia dari total koleksi 22 isolat patogen blas yang disimpan pada biji padi, menunjukkan lima isolat benar-benar murni merupakan miselia *Po*, selain dua isolat murni yang tersimpan dalam media agar. Daftar isolat hasil isolasi baru dan identifikasi koleksi sebelumnya disajikan

pada Tabel 1. Hasil isolasi dari daun padi di lapang yang diduga terinfeksi patogen blas menunjukkan adanya satu isolat cendawan *Po* (isolat Kuningan). Sisa isolat blas yang disimpan dalam benih/gabah kemungkinan terkontaminasi dengan cendawan lain, dan perlu pemurnian lanjut. Hal tersebut dapat diketahui dari hasil benih padi yang ditumbuhkan secara langsung pada media PDA teridentifikasi adanya kontaminasi cendawan jenis lain antara lain *Curvularia* sp., *Aspergillus* spp., *Nigrospora oryzae*, *Penicillium* sp. Kemungkinan transmisi cendawan jenis lain muncul saat penyimpanan, sehingga purifikasi dan identifikasi secara berkala sangat diperlukan. Seperti ditekankan oleh Mew dan Gonzales (2002) bahwa cendawan patogen yang terdeteksi pada benih sering dideteksi, meskipun peran benih padi dalam siklus hidup cendawan

Tabel 1. Identifikasi isolat cendawan yang diduga sebagai *Po*.

Kode isolat	Asal dan bagian jaringan	Identifikasi visual	Jenis fungi
R.123	BM/isolat murni	Ada	<i>Po</i>
R.033	BM/isolat murni	Ada	<i>Po</i>
04.383	BM/Gabah	Ada	<i>Po</i>
04.242	BM/Gabah	Tidak ada	<i>Nigrospora oryzae</i>
04.381	BM/Gabah	Tidak ada	ND
04.371	BM/Gabah	Tidak ada	<i>Penicillium</i> sp
04.388	BM/Gabah	Ada	<i>Po</i>
06.126	BM/Gabah	Tidak ada	ND
06.127	BM/Gabah	Tidak ada	ND
05.060	BM/Gabah	Ada	<i>Po</i>
06.001	BM/Gabah	Ada	<i>Po</i>
06.065	BM/Gabah	Ada	<i>Po</i>
06.080	BM/Gabah	Tidak ada	ND
05.049	BM/Gabah	Tidak ada	ND
07.006	BM/Gabah	Tidak ada	ND
07.113.a	BM/Gabah	Tidak ada	ND
<b>07.113.b</b>	<b>BM/Gabah</b>	<b>Tidak ada</b>	<b>ND</b>
07.129	BM/Gabah	Tidak ada	ND
07.127	BM/Gabah	Tidak ada	ND
06.118	BM/Gabah	Tidak ada	ND
06.121	BM/Gabah	Tidak ada	ND
06.039	BM/Gabah	Tidak ada	ND
04.376	BM/Gabah	Tidak ada	ND
05.023	BM/Gabah	Tidak ada	ND
KR.001	Daun/Ciapus, Bogor	Tidak ada	<i>Curvularia</i> spp
KR.002	Daun/Ciapus, Bogor	Tidak ada	<i>Curvularia</i> spp
KR.003	Daun/Ciapus, Bogor	Tidak ada	<i>Curvularia</i> spp
KR.004	Daun/Ciapus, Bogor	Tidak ada	<i>Curvularia</i> spp
PO.01	Daun/Kuningan, Jawa Barat	Ada	<i>Po</i>
PO.02	Daun/Kuningan, Jawa Barat	Ada	<i>Po</i>
PO.03	Daun/Kuningan, Jawa Barat	Ada	<i>Po</i>
Kuningan	Daun/Kuningan, Jawa Barat	Ada	<i>Po</i>

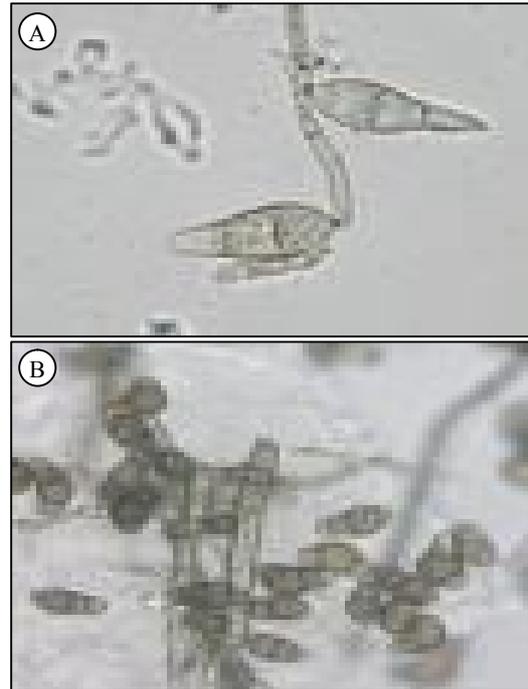
\*Pengamatan di bawah mikroskop pembesaran 10x, 40x, dan 100x. ND = belum ditentukan.

masih belum jelas. Hal lebih penting lagi adalah deteksi cendawan *Po* asal simpanan media benih/gabah menunjukkan level yang rendah sehingga memerlukan upaya peremajaan isolat dan identifikasi secara berkala.

Dalam penelitian ini cendawan blas diremajakan kembali menggunakan medium basal PDA dan menunjukkan pertumbuhan yang baik. Media PDA dilaporkan memberikan pertumbuhan maksimum pada cendawan blas dibanding dengan media lain seperti media Richard's agar dan *host extract* + 2% sukrosa (Meena, 2005). Koloni cendawan *Po* pada media PDA menunjukkan pertumbuhan yang baik pada suhu ruang dan optimum pada kisaran suhu 25–30°C. Observasi di bawah mikroskop menunjukkan bahwa semua isolat *Po* dalam kajian ini memiliki bentuk konidia *pyriform* di mana umumnya bagian dasarnya bulat dan ujungnya menyempit. Hampir semua tidak berwarna/transparan (hialin) dan berwarna pucat olive. Rata-rata terdapat dua septa dengan tiga sel yang berbeda luas (Gambar 1), yang selaras dengan hasil penelitian sebelumnya (Meena, 2005).

Isolat *Po* biasanya ditandai dengan warna kekuningan yang mengkilap ataupun hitam keabuan. Beberapa isolat menampilkan pinggiran koloni yang lebih halus namun ada juga yang tidak teratur. Pada umumnya miselia cendawan *Po* mempunyai bentuk lingkaran seperti cincin konsentris yang mengarah ke pusat. Dengan demikian berdasarkan pengamatan morfologi, hasil pemurnian kembali memiliki variasi pada tipe pertumbuhan, warna koloni maupun batas pinggir koloni cendawan. Variasi morfologi isolat cendawan *Po* penting dari sudut pandang biologi patogen karena patogen ini terjadi di alam sehingga terkait langsung dengan perkembangan ras patogen *Po*. Secara umum perubahan ras *Po* terjadi di alam yang mendukung variasi tinggi dalam populasi patogen blas dan terlibat dalam faktor penurunan atau hilangnya ketahanan (Kang dan Lee, 2000).

Hasil isolasi cendawan baru, teridentifikasi *Curvularia* pada daun padi daerah Ciapus (KR001-004) sangat menarik perhatian. Bentuk konidiana mirip dengan konidia patogen blas dan berwarna cokelat dengan jumlah septa umumnya tiga buah atau lebih (Tabel 1, Gambar 1). Gejala pe-



Gambar 1. Konidia *Po* dan *Curvularia* sp. di bawah mikroskop cahaya. A = konidia *Po* dengan dua septa dan tiga sel (100x), B = konidia *Curvularia* sp. berwarna cokelat dengan bentuk bulat dengan septa dua atau lebih (40x).

nyakit pada daun padi yang disebabkan oleh cendawan ini yang ditemukan di lapang menunjukkan kemiripan dengan gejala blas. Patogen ini umumnya ditemukan pada tanaman gulma seperti rumput-rumputan. Dengan ditemukannya gejala serangan patogen tersebut pada padi sangat penting untuk dikaji lebih lanjut. Selain itu, ada tiga isolat cendawan dengan kode PO (01–03) yang diisolasi dari daun padi yang menunjukkan gejala seperti blas juga dikoleksi. Isolat cendawan ini diikutkan dalam karakterisasi secara molekuler menggunakan primer spesifik virulensi. Aplikasi marka spesifik terkait gen virulensi dapat membantu dalam memberikan informasi tentang mekanisme potensial dari variasi ras cendawan *Po* (Launge dan de Wit, 1988). Usaha dalam mengidentifikasi kembali beberapa isolat blas tersebut dilakukan untuk tujuan pemurnian dan karakterisasi sebelum dilakukan penyimpanan untuk koleksi mikroba di BB Biogen.

## Karakterisasi Molekuler dengan Primer Penyandi Gen Spesifik Virulensi

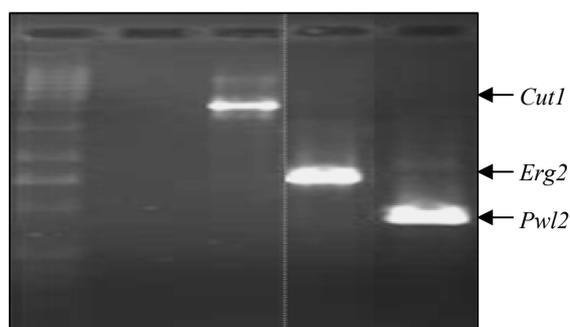
Hasil DNA yang diisolasi menunjukkan kualitas dan kuantitas yang sesuai dengan rekomendasi sehingga layak untuk digunakan dalam amplifikasi PCR. Kualitas DNA pada rasio 260/280 pada kisaran 1,8–2, sehingga dapat dikatakan bahwa kontaminan protein rendah. Demikian juga kemurnian DNA cukup tinggi dari kontaminan fenol ataupun bahan organik pada rasio 260/230 juga pada kisaran 1,8–2.

Amplifikasi berdasarkan primer penyandi gen spesifik virulensi *Cut1*, *Erg2*, dan *Pwl2* menunjukkan bahwa primer tersebut tidak teramplifikasi pada semua isolat yang dikarakterisasi. Contoh variasi ampikon pada isolat cendawan yang diamati beserta ukuran gen virulensi tercantum pada Gambar 2 dan Gambar 3. Berdasarkan kespesifikan pola pita pada DNA genomik total isolat yang dianalisis untuk ketiga primer tersebut, diperoleh enam haplotipe (Tabel 2). Jenis haplotipe dari penelitian sebelumnya, enam haplotipe yang berhasil diidentifikasi meliputi B-001 (satu isolat), C-011 (satu isolat), D-111 (delapan isolat), F-110 (satu isolat), G-100 (tiga isolat), dan H-101 (dua isolat). Tidak ditemukan haplotipe A-000 dan E-010 dalam isolat yang dianalisis. Haplotipe terbanyak adalah D-111 sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya (Reflinur *et al.*, 2005), diikuti oleh haplotipe G-100, sedangkan haplotipe B-001 dan C-011 ditemukan paling sedikit.

Isolat cendawan blas yang diisolasi dari beberapa tempat terinfeksi penyakit blas menunjukkan keragaman yang tinggi mengingat ada enam haplotipe yang ditemukan yang hanya bersumber dari 16 isolat. Isolat dengan kode PO (01–03) terdeteksi dalam haplotipe yang sama, yaitu G-100. Sementara *Culvularia* (KR01, KR02, KR03, KR04) ternyata menunjukkan adanya posisi ketiga gen virulensi tersebut dalam genomnya sesuai strain, yaitu terbagi dalam haplotipe mayor (D-111) diikuti H-101, B-001, dan C-011. Pengujian dan identifikasi kembali isolat yang diduga *Curvularia* spp. perlu dilakukan, kemungkinan ditemukan adanya *Po* atau ada kedekatan secara genetik. Hal ini membuktikan bahwa mayoritas cendawan *Po* mampu

Tabel 2. Haplotipe isolat blas berdasarkan pola ampikon ketiga gen virulensi.

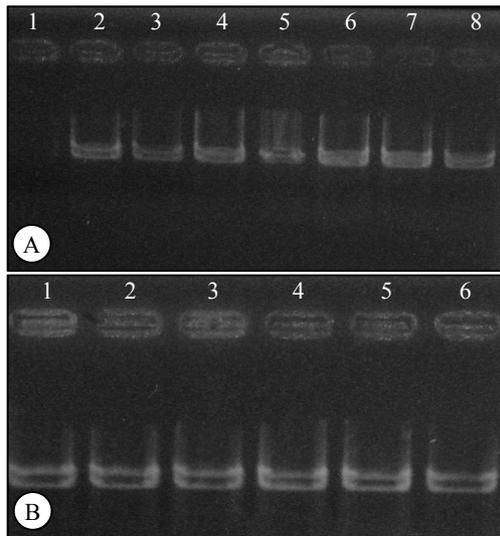
Kode isolat	Keberadaan ampikon			Haplotipe
	<i>Pwl2</i>	<i>Erg2</i>	<i>Cut1</i>	
05.060	1	0	1	H-101
04.383	1	1	1	D-111
04.388	1	1	1	D-111
06.065	1	1	1	D-111
R.033	1	1	0	F-110
R.123	1	1	1	D-111
Kuningan	1	1	1	D-111
07.113	1	1	1	D-111
06.118	1	1	1	D-111
PO.01	1	0	0	G-100
PO.02	1	0	0	G-100
PO.03	1	0	0	G-100
KR.01	1	1	1	D-111
KR.02	0	0	1	B-001
KR.03	0	1	1	C-011
KR.04	1	0	1	H-101



Gambar 2. Pola pita hasil amplifikasi DNA genomik cendawan *Po* dengan gen virulensi. Sumur paling kiri adalah DNA ladder 1 kb.

nyai gen *Cut1*, *Pwl2*, dan *Erg2* dalam hubungannya dengan patogenisitas terhadap penyakit blas padi.

Di antara total isolat cendawan dengan mengabaikan geografi sumber infeksi, gen yang paling besar proporsinya ditemukan adalah gen *Pwl2* (87,5%) diikuti *Cut1* (75%) dan selanjutnya adalah *Erg2* (62,4%). Sesuai dengan pendapat Tenjo dan Hamer (2002) bahwa perkembangan *Po* selama proses infeksi dikendalikan oleh banyak gen. Dengan demikian gen spesifik yang merupakan faktor virulensi berpengaruh terhadap patogenisitas cendawan *Po* dan dalam menginvasi jaringan tanaman inang. Virulensi ini menyebabkan isolat cendawan tersebut dapat menyebabkan penyakit blas pada tanaman padi. Keragaman haplotipe *Po* tidak lepas dari pengaruh faktor lingkungan seperti suhu dan kelembaban, baik pada lokasi yang sama maupun berbeda. Menurut Agrios (1988), lingkungan dapat



Gambar 3. Contoh amplikon yang dihasilkan pada beberapa isolat cendawan *Po* menggunakan primer penyandi gen virulensi. A = *Erg2*, B = *Pwl2*, No. 1-8 = kode isolat cendawan.

mempengaruhi ketersediaan inokulum, tingkat pertumbuhan patogen, daya tahan hidup patogen, kerentanan genetik inang, serta arah dan jarak penyebaran patogen.

Dilaporkan bahwa gen virulen, termasuk *Pwl2* tidak stabil (Valent dan Chumley, 1994). Dari penelitian ini, isolat *Po* yang mengandung satu atau lebih gen virulen tidak stabil seperti haplotipe D-111, H-101, F-110, dan G-100 kemungkinan sering mengalami mutasi spontan yang berpengaruh terhadap virulensinya cukup tinggi. Sebaliknya *Po* yang mengalami gen dengan frekuensi mutasi normal menunjukkan bahwa ketidakstabilan genetik dapat mempengaruhi bagian tertentu genom *Po* dan efeknya bervariasi tergantung ras (Valent, 1997).

Dengan demikian marka berbasis PCR merupakan teknik ampuh untuk mendeteksi variasi genetik fitopatogen (Annamalai *et al.*, 1995) termasuk *Po*. Variasi yang tinggi dari koleksi cendawan *Po* hasil isolasi dari studi ini ditunjukkan dengan jumlah haplotipe yang tinggi dari total 16 isolat yang diidentifikasi berdasarkan gen virulensi. Variasi ini berhubungan dengan variasi genetik inang yang sangat dipengaruhi oleh sejumlah tekanan seleksi patogen, seperti yang dilaporkan peneliti sebelumnya (Chada dan Gopalkhrisnan, 2005; Shrinivasachary *et al.*, 2002). Mekanisme genetik yang dapat menerangkan variasi ras *Po* dapat terjadi

akibat mutasi ataupun rekombinasi (Zeigler, 1998). Analisis struktur populasi patogen blas menggunakan marka genetik selaras dengan uji spektrum virulensinya yang mengikutsertakan varietas referensi pada uji sehingga dapat memberikan pandangan baru tentang dinamika evolusi dari ras *Po* di lapang.

## KESIMPULAN

Sebanyak 22,7% isolat yang tersimpan dalam media agar masih menunjukkan tipikal miselium *Po*. Berdasarkan pengujian kespesifikan pola pita DNA genomik dengan primer penyandi gen spesifik virulensi *Cut1*, *Erg2*, dan *Pwl2*, diperoleh enam haplotipe meliputi B-001 (satu isolat), C-011 (satu isolat), D-111 (delapan isolat), F-110 (satu isolat), G-100 (tiga isolat), dan H-101 (dua isolat).

Untuk keperluan koleksi isolat *Po*, sebelum dilakukan penyimpanan jangka panjang dan mencegah kemungkinan kontaminasi dengan jenis cendawan lain selama di penyimpanan, maka pemurnian secara spora tunggal dan identifikasi/karakterisasi secara berkala perlu dilakukan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agrios, N.G. 1988. Plant Pathology. Academic Press, University of Florida, USA. p. 198-235.
- Annamalai, P., H. Ishii, D. Lalithakumari, and R. Revathi. 1995. Polymerase chain reaction and its application in fungal diseases diagnosis. J. Plant Dis. Prot. 102:91-104.
- Bonman, J.M., T.I Vergel De Dios, and M.M. Khin. 1986. Physiologic specialization of *P. oryzae* in the Philippines. Plant Dis. 70:767-769.
- Badan Pusat Statistik. 2010. Luas serangan hama penyakit tanaman pangan di Indonesia. Jakarta: Badan Pusat Statistik.
- Chada, S. and T. Gopalkrishnan. 2005. Genetic diversity of Indian isolates of rice blast pathogen (*M. grisea*) using molecular markers. Curr. Sci. 88:1466-1469.
- Chao, C.T. and A.H. Ellingboe. 1997. Genetic analysis of avirulence/virulence of an isolate of *Magnaporthe grisea* from a rice field in Texas. Phytopathol. 87:71-76.
- Gill, M. and J.M. Borman. 1988. Effect of water deficit on rice blast. Influence of water deficit on component of resistance. Plant Prot. Tropic 5:61-66.

- Kang, S. and Y.H. Lee. 2000. Population structure and race variation of the rice blast fungus. *Plant Pathol. J.* 16:1-8.
- Keon, J.P., C.S. James, and S. Court. 1994. Isolation of *Erg2* gene, encoding sterol delta 8 to delta isomerase, from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* and its expression in the maize smut pathogen *Ustilago maydis*. *Curr. Genet.* 25:531-537.
- Launge, R. and P.J.G.M. de Wit. 1998. Fungal avirulence genes structure and possible function. *Fungal Genet. Biol.* 24:285-297.
- Lau, G.W. and A.H. Ellingboe. 1993. Genetic analysis of mutation to increase virulence in *Magnaporthe grisea*. *Phytopathol.* 83:1093-1096.
- Manandhar, J.B. 1998. Effect of light, temperature and water potential on growth and sporulation of *Microdochium oryzae*. *Mycologia* 90:995-1000.
- Meena, B.S. 2005. Morphological and molecular variability of rice blast pathogen *P. grisea*. Master Thesis. Dharwal Univ. of Agric. Sci. 87 p.
- Mew, T.W. and P. Gonzales. 2002. A Handbook of Rice Seedborn Fungi. Los Banos, Philippines: International Rice Research Institute. 83 p.
- Pich, U. and I. Schubert. 1993. Miniprep method for isolation of DNA from plants with a high content of polyphenolic. *Nucleic Acid Res.* 21:3328.
- Rao, K.M. 1994. Rice Blast Disease. Delhi, India: Daya Publishing. House. 112 p.
- Reflinur, M. Bustamam, U. Widyastuti, dan H. Aswidinnoor 2005. Keragaman genetik cendawan *Pyricularia oryzae* berdasarkan primer spesifik gen virulensi. *J. Bioteknologi Pertanian* 10:50-60.
- Santoso, A. Nasution, D.W. Utami, I. Hanarida, A.D. Ambarwati, S. Moeljopawiro, dan D. Tharreau. 2007. Variasi genetik dan spektrum virulensi patogen blas pada padi asal Jawa Barat dan Sumatra. *Penelitian Pertanian Tanaman Pangan* 26(3):150-155.
- Scardaci, S.C., R.K. Webster, C.A. Greer, J.E Hill, J.G. Williams, R.G. Mutters, D.M. Brandon, K.S. McKenzie, and J.J. Oster. 1997. Rice blast: A new disease in California. *Agronomy Fact Sheet Series 1997-2*. Davis, CA, USA: Department of Agronomy and Range Science, University of California. 3 p.
- Shrinivasachary, S. Hittalmani, S. Shivayogi, M.G. Vaishali, H.E Shashidar, and K.G. Kumar. 2002. Genetic analysis of rice blast fungus of southern Karnataka using DNA markers and reaction of popular rice genetics. *Curr. Sci.* 42:25-28.
- Soubabere, O., V. Jorge, J.L. Notteghem, M.H. Lebrun, and D. Tharreau. 2001. Sequence characterized amplified region markers for the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Mol. Ecol. Notes* 1(1-2):11-12.
- Sweigard, J.A., F.G. Chumley, and B. Valent. 1992. Disruption of *Magnaporthe grisea* cutinase gene. *Mol. Gene Genet.* 232:183-190.
- Tenjo, F.A. and J.E. Hamer. 2002. Pathogenic development in *Magnaporthe grisea*. p. 399-418. *In* J.W. Goethe (ed.) *Molecular Biology of Fungal Development*. Germany: Universitat Frankfurt.
- Utami, D.W., I. Hanarida, H. Aswidinnoor, and S. Moeljopawiro. 2006. Inheritance of blast resistance (*P. grisea* Sacc) on interspecific crossing between IR 64 and *Oryza rufipogon* Sacc. *Hayati* 13(3):107-172.
- Valent, B. 1997. The rice blast fungus, *M. grisea*. *Mycota* V. Berlin, Germany: Springer-Verlag. p. 37-53.
- Valent, B. and F.G. Chumley. 1994. Avirulence genes and mechanisms of genetic instability in rice blast fungus. p. 111-134. *In* R.S. Zeigler, S.A. Leong, and P.S. Teng (eds.) *Rice Blast Disease*. Wallingford (UK): CAB International.
- Valent, B., G.T. Bryan, Y. Jia, L. Farall, S.A. Mc Adams, K. Foulk, and H.P. Hershey. 2001. Molecular interactions between the rice blast resistance gene *Pi-ta* and its corresponding avirulence gene. p. 174-183. *In* N.T. Keen, J.E. Leach, and S. Maryama (eds.) *Delivery and reception of pathogen signal in plants*. St Paul, MN, USA: APS Press.
- Zeigler, R.S. 1998. Recombination in *M. grisea*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36:249-276.