

Konstitusi Genetik dan Karakter Fenotipik Galur-galur Padi *Pup1* Turunan Varietas Situ Bagendit

Suwaji H. Wardoyo¹, Miftahudin², Sugiono Moeljopawiro³, dan Joko Prasetyono^{3*}

¹Program Studi Bioteknologi, Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga Bogor

²Departemen Biologi, Fakultas MIPA, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga Bogor

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

Diajukan: 7 Januari 2014; Diterima: 30 April 2014

ABSTRACT

Genetic Constitutive and Phenotypic Character of *Pup1* Rice Lines Derived from Situ Bagendit Variety. Suwaji H. Wardoyo, Miftahudin, Sugiono Moeljopawiro, and Joko Prasetyono. Acidity, phosphorus deficiency, and drought stress are major problems in Indonesia's Ultisol rice farming. Development of rice lines tolerant to those stresses is expected to be able to reduce the consumption of P fertilizer. The objectives of the research were to evaluate genetic constitutive of rice lines (BC₂F₆ population) derived from Situ Bagendit x Kasalath and Situ Bagendit x NIL-C433 crossings, and to evaluate responses of those lines to Yoshida nutrient solution under P deficiency and Al stress condition. The research was conducted at Molecular Biology Laboratory and Greenhouse of ICABIOGRAD, from November 2011 to May 2013. The result of foreground analysis showed that *Pup1* locus has been integrated into the genome of BC₂F₆ rice lines, eventhough some lines (SK5, SK6, SK7, SK8, SK9, SK10, SK19, and SK20) showed incomplete integration. Background analysis indicated that majority (95.7%) of the Situ Bagendit background has been recovered in BC₂F₆ rice lines. Al stress evaluation showed SN lines were more tolerant to P deficiency and Al stress than that of SK lines. *Pup1* locus showed good expression under low P and no Al stress. Based on genome proportion and Yoshida nutrient solution experiments, a total of three lines, namely SK13, SN2, and SN9, have potential good characteristics. Molecular analysis within a marker-assisted backcrossing (MAB) experiment should be carried out at each generation of lines for gaining fully gene segment in advanced generations.

Keywords: Rice, *Pup1*, foreground, background, Yoshida nutrient solution.

ABSTRAK

Konstitusi Genetik dan Karakter Fenotipik Galur-galur Padi *Pup1* Turunan Varietas Situ Bagendit. Suwaji Handaru Wardoyo, Miftahudin, Sugiono Moeljopawiro, dan Joko Prasetyono. Kemasaman, defisiensi P, dan kekeringan merupakan masalah utama dalam pertanian padi pada tanah Ultisol di Indonesia. Pengembangan galur padi yang toleran terhadap masalah tersebut diharapkan dapat mengurangi penggunaan pupuk P. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi konstitusi genetik galur-galur padi

populasi BC₂F₆ hasil persilangan Situ Bagendit x Kasalath dan Situ Bagendit x NIL-C433, dan mengevaluasi respon galur-galur tersebut pada kondisi defisiensi P dan cekaman Al menggunakan larutan hara Yoshida. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler dan Rumah Kaca BB Biogen dari bulan November 2011 sampai dengan Mei 2013. Hasil evaluasi *foreground* menunjukkan bahwa lokus *Pup1* telah terintegrasi, walaupun beberapa galur (SK5, SK6, SK7, SK8, SK9, SK10, SK19, dan SK20) menunjukkan integrasi yang tidak sempurna. Evaluasi *background* mengindikasikan bahwa proporsi maksimum pengembalian genom Situ Bagendit pada galur-galur turunan mencapai 95,7%. Evaluasi cekaman Al memperlihatkan bahwa pada kondisi kurang P dan cekaman Al, galur turunan SN lebih toleran daripada galur turunan SK. Lokus *Pup1* terlihat terekspresi dengan baik pada kondisi kurang P dan tanpa adanya cekaman Al. Berdasarkan proporsi genom dan pengujian larutan hara Yoshida, diperoleh tiga galur yang memiliki penampilan lebih baik dibanding dengan tetua Situ Bagendit, yaitu SK13, SN2, dan SN9. Analisis molekuler dalam penelitian *marker-assisted backcrossing* (MAB) sebaiknya dilakukan pada setiap generasi untuk mendapatkan gen secara utuh pada generasi lanjut.

Kata kunci: Padi, *Pup1*, *foreground*, *background*, larutan hara Yoshida.

PENDAHULUAN

Pada tahun 2007, luas daratan Indonesia sekitar 191.093.132 ha (BPS, 2008) sehingga luas lahan kering masam Indonesia diperkirakan mencapai 47.773.283 ha. Masalah pada tanah masam adalah kelebihan unsur Al yang mengikat P. Pada bagian lain, terdapat lahan kering berkapur yang memiliki kelebihan Ca dan mengikat P sehingga unsur P tidak tersedia bagi tanaman. Pada lahan masam sawah yang tergenang air, biasanya unsur Fe yang dominan mengikat P. Efisiensi pemupukan pada tanah jenis ini hanya sekitar 10% (Prasetyo dan Suriadikarta, 2006).

Salah satu lokus yang diduga berkontribusi dalam penangkapan P di tanah adalah lokus *P uptake 1 (Pup1)* (Wissuwa *et al.*, 1998; 2002). Lokus *Pup1* merupakan lokus yang berisi banyak gen dan beberapa di antaranya bertanggung jawab secara tidak langsung dalam penyerapan P sehingga tanaman padi

yang mengandung lokus tersebut akan toleran terhadap defisiensi hara P (Heuer *et al.*, 2009). Pada saat ini, telah diketahui gen *PSTOL1* yang berada di dalam lokus tersebut yang memegang peran sangat penting dalam peningkatan penangkapan P (Gamuyao *et al.*, 2012). Gen tersebut berperan dalam peningkatan volume akar secara eksponensial sehingga peluang penangkapan P yang tersedia di tanah menjadi semakin besar.

Perbaikan varietas unggul untuk meningkatkan kemampuan penangkapan P telah dilakukan dengan memasukkan lokus *Pup1* dari Kasalath dan NIL-C443 ke dalam padi Indonesia varietas Dodokan, Situ Bagendit, dan Batur. Introgresi lokus *Pup1* ke dalam padi-padi tersebut telah dievaluasi hingga populasi BC₂F₂ dan beberapa galur telah diidentifikasi mengandung lokus *Pup1* tersebut. Penggunaan marka *foreground* dan *background* dalam perbaikan varietas tersebut dapat memotong tahap persilangan hanya sampai BC₂, yang biasanya sampai BC₆ (Chin *et al.*, 2011; Prasetiyono, 2010; Prasetiyono *et al.*, 2012).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengevaluasi konstitusi genetik galur-galur padi populasi BC₂F₆ hasil persilangan Situ Bagendit x Kasalath dan Situ Bagendit x NIL-C433 menggunakan marka *foreground* dan *background*, dan mengevaluasi respon galur-galur tersebut pada kondisi defisiensi P dan cekaman Al menggunakan larutan hara Yoshida.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilakukan dari bulan November 2011 sampai dengan Mei 2013 di Laboratorium Biologi Molekuler dan Rumah Kaca BB Biogen, Bogor. Bahan tanaman yang digunakan adalah populasi BC₂F₆ persilangan Situ Bagendit x Kasalath (turunan SK) sebanyak 24 nomor dan Situ Bagendit x NIL-C433 (turunan SN) sebanyak 22 nomor. Di samping itu, digunakan tanaman F₁ untuk SK dan SN, serta tetua (Situ Bagendit, Kasalath, NIL-C443, dan Nipponbare).

Sebanyak 37 marka *foreground* yang terletak di daerah lokus *Pup1* digunakan untuk mengamplifikasi DNA tetua yang digunakan. Karakteristik marka mikrosatelit yang digunakan telah dilaporkan sebelumnya (Prasetiyono dan Tasliyah, 2012). Sebanyak 276 marka mikrosatelit yang menyebar merata pada seluruh kromosom padi digunakan dalam analisis *background*. Marka-marka tersebut menunjukkan polimorfisme khusus untuk tetua Situ Bagendit dan Kasalath/NIL-C443 (Prasetiyono, 2010).

Untuk penelitian uji fenotipik, digunakan larutan hara seperti yang dideskripsikan oleh Yoshida *et al.* (1976). Materi genetik yang diuji, yaitu populasi BC₂F₆

SK dan SN, tetua Situ Bagendit, Kasalath, NIL-C443, dan Nipponbare. Di samping itu, digunakan kontrol toleran Al (Dupa, Hawara Bunar) dan kontrol peka Al (ITA131).

Analisis Konstitusi Genetik

Isolasi DNA dilakukan menurut metode Dellaporta yang dimodifikasi (Dellaporta *et al.*, 1983). Amplifikasi DNA untuk daerah lokus *Pup1* dan *background* menggunakan mesin PCR dengan reaksi PCR yang mengandung 2 μ l 10 \times bufer PCR, 2 μ l 1 mM dNTP, 2 μ l primer 5 μ M (F dan R), 1 μ l *Taq DNA polymerase* (IRRI taq), 6 μ l ddH₂O, dan 2 μ l DNA. Program PCR yang digunakan adalah 5 menit suhu 94°C untuk denaturasi awal, selanjutnya dilakukan 35 siklus yang terdiri atas 60 detik suhu 94°C untuk denaturasi, 60 detik suhu 55°C untuk penempelan primer, dan 2 menit suhu 72°C untuk pemanjangan. Pemanjangan akhir selama 7 menit suhu 72°C.

Marka *foreground* digunakan untuk melihat keberadaan lokus *Pup1* dengan program amplifikasi seperti pada kegiatan amplifikasi di atas. Hasil PCR kemudian dipisahkan menggunakan gel poliakrilamid 5% (*denaturing gel*). Pewarnaan DNA dilakukan dengan metode *silver staining*.

Untuk analisis *background*, dipilih marka mikrosatelit polimorfik yang berjarak 5–10 cM, dengan program amplifikasi seperti pada amplifikasi marka *foreground*. Hasil PCR dipisahkan menggunakan gel poliakrilamid 8% (*non denaturing gel*). Pewarnaan DNA dilakukan dengan larutan *ethidium bromide* (EtBr) 0,5 μ g/ml, kemudian gel diamati di atas *UV transilluminator*. Hasil seleksi *foreground* dan *background* divisualisasikan dengan software GGT 2.0.

Evaluasi terhadap Cekaman Aluminium (Al) dan Defisiensi Fosfor (P)

Penelitian ini dilakukan menggunakan Rancangan Petak Terpisah. Sebagai petak utamanya adalah konsentrasi Al (0 ppm Al³⁺ dan 45 ppm Al³⁺) dan anak petaknya adalah konsentrasi P (0,5 ppm dan 10 ppm). Seluruh sampel diulang sebanyak enam kali. Benih padi yang digunakan pada penelitian ini dikedambakan terlebih dahulu, kemudian diletakkan di atas sterefoam (*styrofoam*) yang diberi kain kasa nyamuk. Sebanyak 10 liter larutan hara Yoshida dengan perlakuan tertentu digunakan dalam kegiatan ini. pH larutan diatur pada kisaran 4 \pm 0,2. Setiap minggu larutan hara diganti sesuai perlakuan.

Pada akhir minggu keempat sejak tanam bibit, dilakukan pengamatan panjang akar, tinggi tanaman, bobot basah akar tanaman, dan bobot kering akar-tanaman. Data yang diperoleh kemudian dianalisis

menggunakan analisis sidik ragam (uji F hitung), dilanjutkan dengan uji Dunnet 5% dengan program SAS versi 9. Skoring indeks toleransi defisiensi P dilakukan dengan mengikuti metode Fernandez (Hanum *et al.*, 2010; Iriany *et al.*, 2007):

$$ITC = (Yd/Yn) \times (Yd/Hyd)$$

ITC = indeks toleransi terhadap cekaman

Yd = perlakuan tanaman pada kondisi terkena cekaman defisiensi P (0,5 ppm)

Yn = perlakuan tanaman pada kondisi normal (10 ppm)

Hyd = perlakuan tanaman pada kondisi cekaman defisiensi P (0,5 ppm) yang tertinggi

dengan ITC >0,5 = toleran (T), ITC <0,5 = peka (P).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis Konstitusi Genetik

Seleksi *foreground* merupakan kegiatan penting dalam analisis molekuler karena berguna untuk melihat apakah suatu individu mengandung lokus *Pup1* atau tidak. Berdasarkan survei tetua, dari 37 marka *foreground* yang digunakan untuk survei polimorfisme antar tetua, hanya tujuh marka yang bisa digunakan untuk analisis *foreground*. Marka-marka tersebut adalah Lu-SSR3, Kas30n-1, Kas30n-2, Kas30n-4, Primer 40, Primer 42, dan Primer 50. Ketujuh marka

ini merupakan marka spesifik untuk lokus *Pup1*. Hasil amplifikasi galur turunan SK dan SN menggunakan marka spesifik *Pup1* di atas dapat dilihat pada Tabel 1.

Terdapat enam marka spesifik lokus *Pup1* yang dapat digunakan untuk uji galur-galur SK (Tabel 1). Teramplifikasinya enam marka spesifik lokus *Pup1* pada galur-galur BC₂F₆ persilangan Situ Bagendit x Kasalath (turunan SK) menunjukkan bahwa lokus *Pup1* terintegrasi dengan baik pada galur-galur turunan SK. Demikian juga, teramplifikasinya pita berukuran 315 bp untuk marka Kas30n-1 dan pita berukuran 368 bp untuk marka Lu-SSR3 pada galur-galur BC₂F₆ persilangan Situ Bagendit x NIL-C433 (turunan SN) menunjukkan bahwa lokus *Pup1* juga terintegrasi dengan baik pada galur-galur turunan SN tersebut. Ada tiga marka yang dapat digunakan untuk amplifikasi lokus *Pup1* pada galur-galur turunan SN (Tabel 1).

Pada penelitian sebelumnya dilaporkan bahwa galur-galur hasil persilangan Situ Bagendit x Kasalath, yaitu NIL-C433, lokus *Pup1* telah berada dalam kondisi homozigot pada generasi BC₂F₂ ke tetua donor *Pup1*. Marka yang digunakan adalah Kas30n-1 dan Kas19-C2 (Prasetyono *et al.*, 2012). Namun, pada penelitian ini terlihat ada beberapa galur (SK5, SK6, SK7, SK8, SK9, SK10, SK19, dan SK20) yang memiliki pita seperti Situ Bagendit, meskipun menggunakan marka Kas30n-1. Beberapa galur turunan SK mengandung lokus *Pup1* yang tidak terintegrasi dengan baik, diduga membawa

Tabel 1. Uji marka spesifik lokus *Pup1* pada tanaman BC₂F₆ persilangan Situ Bagendit dengan Kasalath atau NIL-C443.

Galur	Situ Bagendit x Kasalath (SK)						Galur	Situ Bagendit x NIL-C443 (SN)		
	Marka spesifik <i>Pup1</i>							Marka spesifik <i>Pup1</i>		
	Lu-SSR3	Kas30n-1	Kas30n-2	Primer 40	Primer 42	Primer 50		Lu-SSR3	Kas30n-1	Kas19C-2
SK1	B	B	B	B	B	B	SN1	B	B	B
SK2	B	B	B	B	B	B	SN2	B	B	B
SK3	B	B	B	B	B	B	SN3	B	B	B
SK4	B	B	B	B	B	B	SN4	B	B	B
SK5	B	B	A	B	B	B	SN5	B	B	B
SK6	B	A	A	B	B	B	SN6	B	B	B
SK7	B	A	A	B	B	B	SN7	B	B	B
SK8	B	A	A	B	B	A	SN8	B	B	B
SK9	B	A	B	B	B	A	SN9	B	B	B
SK10	B	B	B	B	B	A	SN10	B	B	B
SK11	B	B	B	B	B	B	SN11	B	B	B
SK12	B	B	B	B	B	B	SN12	B	B	B
SK13	B	B	B	B	B	B	SN13	B	B	B
SK14	B	B	B	B	B	B	SN14	B	B	B
SK15	B	B	B	B	B	B	SN15	B	B	B
SK16	B	B	B	B	B	B	SN16	B	B	B
SK17	B	B	B	B	B	B	SN17	B	B	B
SK18	B	B	B	B	B	B	SN18	B	B	B
SK19	B	A	A	B	B	B	SN19	B	B	B
SK20	B	B	B	B	B	A	SN20	B	B	B
SK21	B	B	B	B	B	B	SN21	B	B	B
SK22	B	B	B	B	B	B	SN22	B	B	B
SK23	B	B	B	B	B	B				
SK24	B	B	B	B	B	B				

A = Situ Bagendit, B = Kasalath untuk SK atau NIL-C443 untuk SN.

lokus *Pup1* tidak secara utuh, atau bagian ujung-ujungnya terpotong.

Penggunaan marka molekuler untuk kegiatan MAB ini hanya dilakukan hingga generasi BC_2F_2 . Setelah itu, dilakukan seleksi di lapang dan tidak dilakukan analisis molekuler. Analisis molekuler baru dilakukan setelah empat generasi berikutnya (BC_2F_6) untuk tujuan konfirmasi. Hasilnya menunjukkan masih ada variasi alel lokus *Pup1*, baik berasal dari alel tetua donor (Kasalath atau NIL-C443) maupun dari tetua pemulih (Situ Bagendit). Peristiwa pindah silang dengan pola yang tidak beraturan diduga telah menggantikan alel homozigot tetua donor pada generasi BC_2F_3 menjadi alel Situ Bagendit, atau kemungkinan juga terjadi tercampurnya serbuk sari generasi BC_2F_3 dengan Situ Bagendit di lapang, yang selanjutnya terjadi segregasi selama empat generasi. Namun demikian, peluang terjadinya kemungkinan tersebut sangat kecil karena *background* genetik di luar lokus *Pup1* dari individu yang memiliki lokus *Pup1* terpotong-potong sebagian besar telah kembali ke tetua Situ Bagendit. Hal ini tidak mungkin terjadi pada kondisi persilangan sendiri dari generasi BC_2F_3 sampai BC_2F_6 (Gambar 1).

Pada analisis *background* tanaman BC_2F_6 , digunakan marka-marka mikrosatelit sebanyak mungkin untuk melihat komposisi genotipe yang dimiliki oleh turunan SK ataupun SN. Semakin banyak marka mikrosatelit polimorfik yang digunakan dalam seleksi *background*, semakin besar peluang melihat *background* genetik yang dimiliki turunan SK dan SN. Dari 276 marka SSR yang digunakan dalam penelitian ini untuk analisis *background*, hanya 130 (47%) marka polimorfik yang dapat digunakan untuk SK dan 158 (57%) marka polimorfik yang dapat digunakan untuk SN. Contoh elektroforegram hasil seleksi *background* disajikan pada Gambar 2.

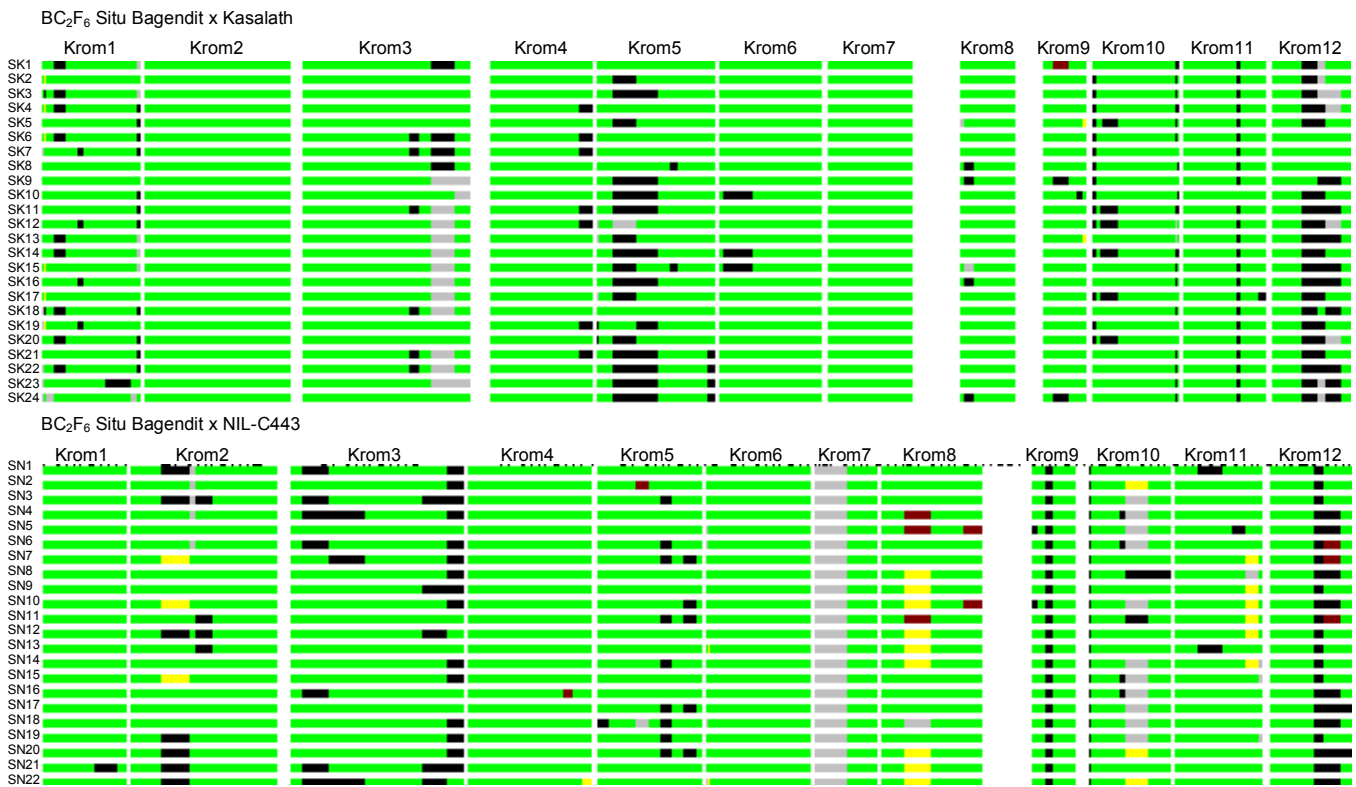
Persilangan silang balik akan mengembalikan proporsi genom tetua pemulih (*recipient*) 50% tiap generasi atau $(1/2)^t$ setiap t generasi silang balik (Babu *et al.*, 2004). Dari seleksi persilangan dengan metode konvensional pada generasi BC_2 biasanya akan diperoleh proporsi genom tetua pemulih sekitar 82% dan untuk memperoleh proporsi genom pemulih sebesar 99,2% diperlukan silang balik sebanyak enam generasi (BC_6), sedangkan seleksi dengan menggunakan marka molekuler dapat diperoleh proporsi genom tetua pemulih sekitar 87,5% pada generasi BC_2 (Babu *et al.*, 2004; Collard *et al.*, 2005).

Pada generasi BC_2F_6 , galur turunan SK rata-rata telah memiliki 90,6% genom Situ Bagendit, dengan empat belas galur telah memiliki genom Situ Bagendit di atas 90% (Tabel 2). Galur SK2 memiliki proporsi

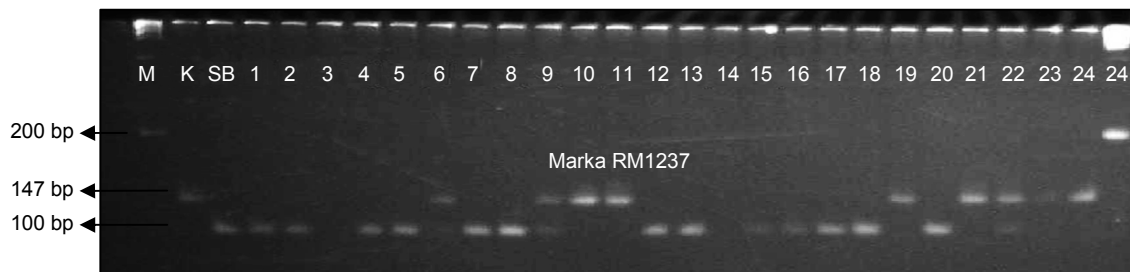
genom Situ Bagendit yang tertinggi (95,7%). Galur-galur turunan SN rata-rata telah memiliki 89,41% genom Situ Bagendit, dengan sepuluh galur telah memiliki genom Situ Bagendit di atas 90% (Tabel 2). Kesepuluh galur tersebut, yaitu SN1, SN2, SN7, SN8, SN9, SN13, SN14, SN15, SN17, dan SN19. Galur SN2 memiliki proporsi genom Situ Bagendit yang tertinggi (93,6%) (Tabel 2). Gambaran lengkap kondisi genom setiap individu dapat dilihat pada Gambar 1.

Tabel 2. Proporsi pengembalian genom Situ Bagendit pada turunan SK dan SN.

Galur	Pengembalian genom Situ Bagendit (%)	Panjang kromosom* (cM)
SK1	93,7	1440,9
SK2	95,7	1471,1
SK3	91,2	1402,8
SK4	94,9	1459,3
SK5	92,4	1421,0
SK6	94,3	1456,3
SK7	94,9	1459,7
SK8	94,2	1448,1
SK9	88,0	1353,1
SK10	88,7	1364,6
SK11	85,7	1318,6
SK12	87,9	1351,0
SK13	90,6	1393,8
SK14	82,2	1264,1
SK15	84,3	1295,7
SK16	89,0	1368,5
SK17	90,4	1389,5
SK18	92,6	1424,7
SK19	95,6	1469,6
SK20	90,5	1391,9
SK21	90,8	1396,9
SK22	88,0	1353,9
SK23	88,8	1365,9
SK24	89,2	1371,1
Rata-rata	90,6	1393,0
SN1	93,1	1335,3
SN2	93,6	1342,1
SN3	84,2	1207,9
SN4	84,3	1207,2
SN5	87,9	1261,0
SN6	88,5	1269,6
SN7	90,3	1295,0
SN8	90,2	1293,6
SN9	93,3	1338,0
SN10	88,3	1267,0
SN11	87,0	1248,1
SN12	89,4	1282,1
SN13	92,3	1324,3
SN14	92,5	1326,4
SN15	92,8	1330,8
SN16	88,6	1270,5
SN17	91,5	1312,0
SN18	88,6	1271,0
SN19	93,0	1334,4
SN20	89,9	1288,9
SN21	87,1	1249,7
SN22	80,5	1155,0
-	-	-
-	-	-
Rata-rata	89,4	1282,3



Gambar 1. Konstitusi *background* hasil analisis GGT 2.0 pada populasi BC₂F₆. ■ = Situ Bagendit, ■ = Kasalath/NIL-C443, ■ = heterozigot, ■ = kosong/tidak ada amplifikasi, ■ = berbeda dengan yang lain, Krom = kromosom.



Gambar 2. Elektroforegram hasil seleksi *background* pada populasi BC₂F₆ Situ Bagendit x Kasalath (turunan SK) dengan menggunakan marka RM1237 yang dipisahkan pada gel poliakrilamid 8%. M = 100 bp DNA *ladder*, K = Kasalath, SB = Situ Bagendit, 1 = SK1, 2 = SK2, ..., 24 = SK24.

Berdasarkan Gambar 2, hampir semua individu, baik persilangan SK maupun SN, masih mengandung alel tetua donor (Kasalath atau NIL-C443), walaupun dalam seleksi telah digunakan marka molekuler (marka *foreground* dan *background*). Hal ini menunjukkan seleksi menggunakan marka molekuler tidak bisa menghilangkan kontaminasi tetua donor pada daerah yang tidak diinginkan. Pengaruh *linkage drag* masih akan terjadi pada seluruh individu tersebut. Uji lapang hanya menyeleksi tanaman dengan penampilan yang diinginkan dan menunjukkan ekspresi dari lokus *Pup1*.

Evaluasi terhadap Cekaman Aluminium (Al) dan Defisiensi Fosfor (P)

Perlakuan konsentrasi Al dan P berpengaruh sangat nyata terhadap panjang akar, tinggi tanaman, dan bobot kering tanaman (analisis ragam tidak ditampilkan). Hal ini menunjukkan bahwa karakter agronomis dipengaruhi oleh konsentrasi Al dan P. Keberadaan lokus *Pup1* pada galur-galur BC₂F₆ berpengaruh terhadap peningkatan panjang akar dan tinggi tanaman. Berdasarkan nilai ITC panjang akar (Tabel 3) pada kondisi 0 ppm Al, sebanyak 98,8% galur turunan SK toleran terhadap defisiensi P, sedangkan galur turunan SN sebanyak 13,6% toleran terhadap

Tabel 3. Nilai indeks toleransi terhadap cekaman (ITC) panjang akar (PA) terhadap defisiensi P dari galur generasi BC₂F₆ turunan SK dan SN, tetua, dan varietas kontrol pada uji larutan hara Yoshida.

Genotipe	0 ppm Al			TT terhadap defisiensi P	45 ppm Al			TT terhadap defisiensi P	10 ppm P		ITC	TT terhadap defisiensi P
	0,5P	10P	ITC		0,5P	10P	ITC		0AI	45AI		
SB	32,33	24,47	0,69	T	8,17	13,40	0,18	P	24,47	13,40	0,25	P
SK1*	18,75	14,42	0,39	P	8,58	6,58	0,40	P	14,42	6,58	0,10	P
SK2*	21,83	14,10	0,54	T	7,92	6,33	0,36	P	14,10	6,33	0,10	P
SK3*	43,50	22,88	1,33	T	5,78	8,90	0,14	P	22,88	8,90	0,12	P
SK4*	36,75	27,03	0,80	T	5,85	9,08	0,14	P	27,03	9,08	0,10	P
SK13*	41,45	24,28	1,14	T	9,98	16,97	0,21	P	24,28	16,97	0,40	P
SK17*	41,25	25,57	1,07	T	9,08	13,50	0,22	P	25,57	13,50	0,24	P
SK18*	46,33	25,97	1,33	T	6,67	13,72	0,12	P	25,97	13,72	0,25	P
SK21*	41,83	27,38	1,03	T	9,08	11,45	0,26	P	27,38	11,45	0,16	P
SN1*	21,33	14,17	0,52	T	12,50	11,92	0,47	P	14,17	11,92	0,34	P
SN2*	17,92	12,33	0,42	P	13,50	12,50	0,52	T	12,33	12,50	0,43	P
SN7*	18,75	10,90	0,52	T	11,00	9,17	0,47	P	10,90	9,17	0,26	P
SN8*	16,50	12,67	0,35	P	11,70	12,17	0,40	P	12,67	12,17	0,40	P
SN9*	18,92	14,25	0,40	P	12,67	11,08	0,52	T	14,25	11,08	0,29	P
SN13*	18,40	14,10	0,39	P	10,83	7,53	0,56	T	14,10	7,53	0,14	P
SN14*	16,92	11,67	0,39	P	11,75	11,50	0,43	P	11,67	11,50	0,39	P
SN15*	17,83	12,50	0,41	P	11,08	9,25	0,48	P	12,50	9,25	0,23	P
SN17*	18,58	13,17	0,42	P	8,83	9,50	0,30	P	13,17	9,50	0,23	P
SN19*	17,25	12,25	0,39	P	9,10	6,87	0,43	P	12,25	6,87	0,13	P
Kasalath**	62,13	43,13	1,44	T	2,10	6,45	0,02	P	43,13	6,45	0,03	P
NIL-C433**	47,00	27,45	1,30	T	19,97	25,80	0,56	T	27,45	25,80	0,82	T
DUPA**	50,42	32,05	1,28	T	21,25	29,40	0,55	T	32,05	29,40	0,92	T
ITA131	30,00	23,40	0,62	T	5,48	8,67	0,12	P	23,40	8,67	0,11	P
Hawara Bnr**	57,50	39,33	1,35	T	27,83	18,67	1,49	T	39,33	18,67	0,30	P
Nipponbare	31,50	24,00	0,67	T	15,53	22,87	0,38	P	24,00	22,87	0,74	T

T = toleran, P = peka, TT = tingkat toleransi.

*Proporsi genom Situ Bagendit telah mencapai di atas 90%.

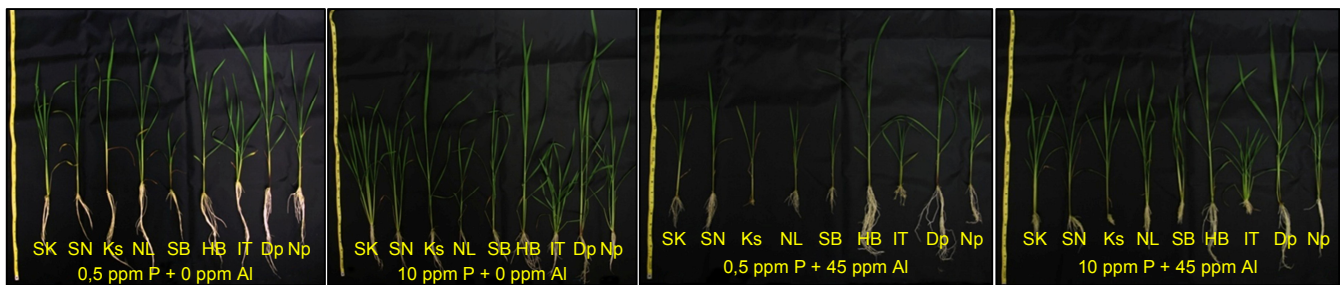
**Signifikan pada uji Dunnett $\alpha = 0,05$. Hyd 0,5P-0AI = 62,13, Hyd 0,5P-45AI = 27,83, Hyd 45AI-10P = 29,40.

defisiensi P. Sebaliknya, pada kondisi 45 ppm Al, semua galur turunan SK peka terhadap defisiensi P, tetapi 45,5% galur turunan SN toleran terhadap defisiensi P. Hal ini menunjukkan bahwa pada kondisi tanpa cekaman Al (0 ppm), aktivitas pemanjangan akar galur turunan SK lebih toleran terhadap defisiensi P dibanding dengan galur turunan SN, tetapi sebaliknya pada kondisi cekaman Al (45 ppm), galur turunan SN lebih toleran terhadap defisiensi P dibanding dengan galur turunan SK. Profil tanaman pada larutan hara Yoshida disajikan pada Gambar 3 dan 4.

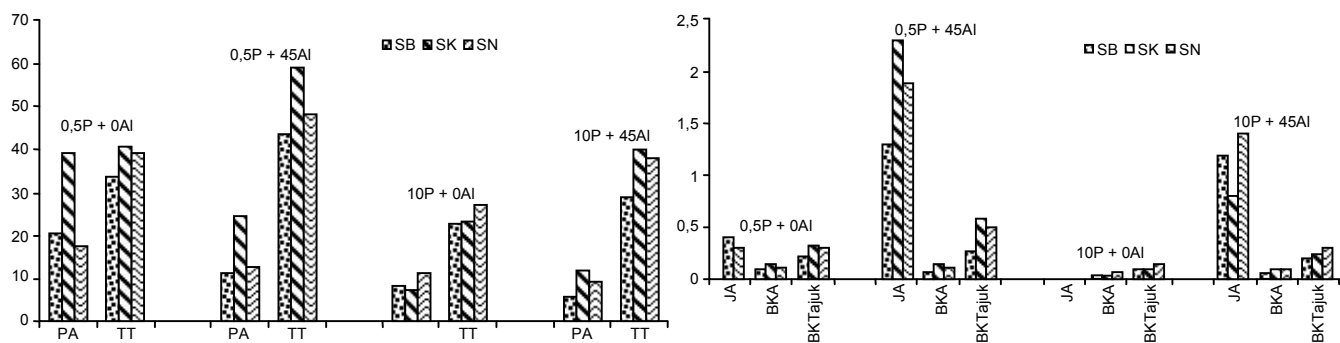
Kasalath dan NIL-C433 memperlihatkan pertumbuhan panjang akar yang lebih responsif pada kondisi kurang P (0,5 ppm) dibanding dengan pada kondisi cukup P (10 ppm) (Gambar 3). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Shimizu *et al.* (2004) dan Prasetyono *et al.* (2012) sehingga galur turunan dari persilangan tersebut diduga memiliki gen untuk kedua karakter tersebut. Namun demikian, pada penelitian ini pemilihan galur terbaik didasarkan juga pada kadar sifat tetua pemulih (Situ Bagendit) yang telah dimiliki oleh galur-galur yang terseleksi. Tanaman padi toleran terhadap defisiensi P dicirikan oleh pemanjangan akar (Wissuwa, 2005), serta sistem perakaran yang lebih responsif terhadap defisiensi P dan lebih efisien dalam menyerap P (Lynch dan Brown, 2001).

Pada cekaman Al (45 ppm), genotipe Kasalath lebih sensitif daripada genotipe NIL-C433, bahkan dibanding dengan genotipe ITA131, baik pada kondisi kurang P maupun kondisi cukup P. Hasil ini sejalan dengan penelitian Ma *et al.* (2002), Prasetyono (2010), dan Prasetyono *et al.* (2012) yang menunjukkan bahwa Kasalath merupakan genotipe yang sensitif terhadap toksisitas Al. Cekaman Al yang tinggi dapat merusak sistem perakaran tanaman (Kochian *et al.*, 2004) dan pertumbuhan akar semakin terhambat (Wang dan Kao, 2004). Tingginya cekaman Al juga menyebabkan defisiensi unsur P.

Peubah yang lain, seperti tinggi tanaman (tajak), jumlah anakan, dan bobot kering tanaman menunjukkan penurunan pada kondisi adanya cekaman Al dibanding dengan kondisi tanpa cekaman Al. Hal ini membuktikan bahwa untuk mengatasi defisiensi P, tidak cukup hanya lokus *Pup1* saja tetapi harus dibantu dengan gen-gen lain yang bisa melepaskan ikatan P dengan unsur lain, misalnya Al. Ikatan Al-P harus dilepas oleh gen toleransi keracunan Al (*Alt*), sehingga P yang telah terlepas bisa dengan mudah diserap oleh *Pup1*. Lokus *Pup1* sangat mempengaruhi penampilan tanaman BC₂F₆ turunan SK dan SN, lebih baik dibanding dengan tetua pemulih (Situ Bagendit) (Gambar 4). Heuer *et al.* (2009) melaporkan



Gambar 3. Perbedaan respon tanaman padi yang mengandung *Pup1* dan kontrol pada berbagai kondisi P dan Al dalam larutan hara Yoshida. SK = BC₂F₆ Situ Bagendit x Kasalath, SN = BC₂F₆ Situ Bagendit x NIL-C443, Ks = Kasalath, NL = NIL-C443, SB = Situ Bagendit, HB = Hawara Bunar (kontrol toleran terhadap Al), IT = ITA131 (kontrol peka terhadap Al), Dp = Dupa (kontrol toleran terhadap Al), dan Np = Nipponbare.



Gambar 4. Histogram perbandingan tetua Situ Bagendit dengan turunannya pada berbagai kondisi larutan hara Yoshida. SB = Situ Bagendit, SK = BC₂F₆ Situ Bagendit x Kasalath, SN = BC₂F₆ Situ Bagendit x NIL-C443, PA = panjang akar (cm), TT = tinggi tanaman/tajuk (cm), JA = jumlah anakan, BKA = bobot kering akar (g), dan BKTajuk = bobot kering tajuk (g).

bahwa *Pup1* berperan dalam pembentukan volume akar. Pembentukan akar yang responsif akan meningkatkan penyerapan air, P, dan unsur-unsur lainnya. Pemilihan galur yang mempunyai sifat toleran terhadap defisiensi P dan cekaman Al dalam penelitian ini dilakukan pula dengan memilih panjang akar yang konsisten (tinggi) dalam beberapa pengujian.

Beberapa tanaman beradaptasi terhadap cekaman Al maupun defisiensi P dengan mengeluarkan senyawa pengasam (asam organik) dan atau pengkelat seperti asam sitrat dan asam malat. Senyawa pengkelat seperti sitrat dan malat akan menempati tempat yang mengikat P (penukar ligan), kemudian melarutkan P yang diikat oleh partikel tanah (Lambers *et al.*, 2008). Senyawa pengkelat (senyawa organik) tersebut akan mengikat Al, Fe, dan Ca sehingga P menjadi bebas, yang akhirnya dapat diserap oleh akar tanaman.

Berdasarkan proporsi genom Situ Bagendit dan nilai ITC panjang akar, diperoleh enam galur turunan SK (SK2, SK3, SK4, SK13, SK17, SK18, dan SK21) pada kondisi tanpa cekaman Al dan tiga galur turunan SN (SN2, SN9, dan SN13) pada kondisi cekaman Al yang lebih toleran terhadap defisiensi P daripada tetua pemulih (Situ Bagendit). Tujuh galur menunjukkan sifat lebih toleran terhadap cekaman Al dibanding

dengan tetua pemulih (Situ Bagendit) dan mendekati Hawara Bunar (kontrol toleran Al), yaitu SK13, SN1, SN2, SN7, SN8, SN9, dan SN14 (Tabel 3). Berdasarkan kondisi tersebut, galur terpilih dari turunan SK lebih toleran terhadap defisiensi P pada kondisi tanpa cekaman Al, sedangkan galur turunan SN lebih toleran terhadap defisiensi P pada kondisi cekaman Al. Berdasarkan Tabel 3, terdapat tiga galur turunan SK dan turunan SN yang menunjukkan toleran terhadap defisiensi P pada kondisi cekaman Al maupun tidak ada cekaman Al dibanding dengan tetua pemulih (Situ Bagendit), yaitu galur SK13, SN2, dan SN9.

KESIMPULAN DAN SARAN

Semua galur hasil persilangan Situ Bagendit x Kasalath dan Situ Bagendit x NIL-C433 telah membawa lokus *Pup1* secara utuh, kecuali SK5, SK6, SK7, SK8, SK9, SK10, SK19, dan SK20. Proporsi terbaik genom Situ Bagendit dari turunan SK (galur SK2) mencapai 95,7%, sedangkan proporsi terbaik genom Situ Bagendit dari turunan SN (galur SN2) mencapai 93,4%. Berdasarkan proporsi genom dan pengujian larutan hara Yoshida, diperoleh enam galur yang mempunyai kemampuan toleran terhadap defisiensi P pada kondisi tanpa cekaman Al, yaitu SK3, SK4, SK13,

SK17, SK18, dan SK21. Tiga galur toleran terhadap defisiensi P pada kondisi cekaman Al dibanding dengan Situ Bagendit, yaitu SK13, SN2, dan SN9.

Dalam penelitian *marker-assisted breeding*, sebaiknya analisis molekuler tetap dilakukan pada setiap generasi sampai generasi F₇ untuk mendapatkan gen yang utuh.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Proyek *Generation Challenge Programme*. Ucapan terima kasih disampaikan kepada Sdr. Mahrup, Endang Ibrahim, dan Suganda atas bantuan teknis dalam penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Babu, R., S.K. Nair, B.M. Prasanna, and H.S. Gupta. 2004. Integrating marker-assisted selection in crop breeding-prospects and challenges. *Curr. Sci.* 87(5):607-619.
- Badan Pusat Statistik. 2008. Statistik Indonesia. Jakarta.
- Chin, J.H., R. Gamuyao, C. Dalid, M. Bustaman, J. Prasetyono, S. Moeljopawiro, M. Wissuwa, and S. Heuer. 2011. Developing rice with high yield under phosphorus deficiency: *Pup1* sequence to application. *Plant Physiol.* 156:1202-1216.
- Collard, B.C.Y., M.Z.Z. Jahufer, J.B. Brouwer, and E.C.K. Pang. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concept. *Euphytica* 142:169-196.
- Dellaporta, S.L., J. Wood, and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1(4):19-21.
- Gamuyao, R., J.H. Chin, J. Pariasca-Tanaka, P. Pesaresi, S. Catausan, C. Dalid, I. Slamet-Loedin, E.M. Tecson-Mendoza, M. Wissuwa, and S. Heuer. 2012. The protein kinase *Pstol1* from traditional rice confers tolerance of phosphorus deficiency. *Nature* 488:535-541.
- Hanum, T., Swasti, E., dan Sutoyo. 2010. Uji toleransi beberapa genotipe padi beras merah lokal (*Oryza sativa* L.) terhadap kekeringan selama fase semai. *Jerami* (3):182-192.
- Heuer, S., X. Lu, J.H. Chin, J.P. Tanaka, H. Kanamori, T. Matsumoto, T. De Leon, V.J. Ulat, A.M. Ismail, M. Yano, and M. Wissuwa. 2009. Comparative sequence analysis of the major quantitative trait locus phosphorus uptake 1 (*Pup1*) reveals a complex genetic structure. *Plant Biotech. J.* 7:456-471.
- Iriany, R.N., A. Takdir, M. Yasin, and M.J. Mejaya. 2007. Maize genotypes tolerance to drought stress. *Penelitian Pertanian Tanaman Pangan* 26(3):156-160.
- Kochian, L.V., O.A. Hoekenga, and M.A. Pineros. 2004. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Ann. Rev. Plant Biol.* 55:459-493.
- Lambers, H., F.S. Chapin III, and T.L. Pons. 2008. *Plant Physiological Ecology*. 2nd Ed. Springer. New York, USA. 610 p.
- Lynch, J.P. and K.M. Brown. 2001. Topsoil foraging an architectural adaptation of plants to low phosphorus availability. *Plant Soil* 237:225-237.
- Ma, J.F., R. Shen, Z. Zhao, M. Wissuwa, Y. Takeuchi, T. Ebitani, and M. Yano. 2002. Response of rice to Al stress and identification of quantitative trait loci for Al tolerance. *Plant Cell Physiol.* 43(6):652-659.
- Prasetyono, J. 2010. Studi efek introgresi *Pup1* (*P Uptake 1*) untuk meningkatkan toleransi padi terhadap defisiensi Fosfor. Disertasi S3, Progam Studi Agronomi, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor. 185 hlm.
- Prasetyono, J. dan Tasliah. 2012. Pemetaan, karakterisasi, dan pengembangan primer-primer lokus *Pup1* (*P uptake1*) pada padi untuk peningkatan toleransi terhadap defisiensi Fosfor. *J. AgroBiogen* 8(3):120-129.
- 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.
- Prasetyo, B.H. dan D.A. Suriadikarta. 2006. Karakteristik, potensi, dan teknologi pengelolaan tanah ultisol untuk pengembangan pertanian lahan kering di Indonesia. *J. Litbang Pertanian* 25(2):40-46.
- Shimizu, A., S. Yanagihara, S. Kawasaki, and H. Ikehashi. 2004. Phosphorus deficiency-induced root elongation and its QTL in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 109:1361-1368.
- Wang, J.W. and C.H. Kao. 2004. Reduction of aluminium-inhibited root growth of rice seedlings with supplemental calcium, magnesium and organic acids. *Crop Env. Bioinf.* 1:191-198.
- Wissuwa, M. 2005. Combining a modelling with a genetic approach in establishing associations between genetic and physiological effects in relation to phosphorus uptake. *Plant Soil* 269:57-68.
- Wissuwa, M., J. Wegner, N. Ae, and M. Yano. 2002. Substitution mapping of *Pup1*: A major QTL increasing phosphorus uptake of rice from a phosphorus-deficient soil. *Theor. Appl. Genet.* 105:890-897.
- 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.
- Yoshida, S., D.A. Forno, J.H. Cock, and K.A. Gomez. 1976. *Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice*. 3rd Ed. IRRI. Manila, Philippines. 83 p.