

Keragaman Genetik Isolat Cendawan *Pyricularia oryzae* Menggunakan Primer Pot-2 (Rep-PCR)

Tasliah, Reflinur, dan Masdiar Bustamam

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111

ABSTRACT

Genetic Diversity of Rice Blast Fungus *Pyricularia oryzae* Based on a Specific Primer Pot-2 (Rep-PCR). *Tasliah, Reflinur, and Masdiar Bustamam.* Rice blast (*Pyricularia oryzae*) is one of the most important diseases of rice. It can be very destructive in the field, when the environmental conditions are favourable. Information on genetic diversity of this pathogen could assist plant breeders in determining strategy for a successful control of the disease. This study was conducted to analyze genetic diversity in *P. oryzae* isolates by a pair of Pot-2 primers using the rep-PCR technique. These primers were designed from a transposon element of the entire blast fungus genomic DNA. DNA samples were extracted from 212 isolates of *P. oryzae* collected from two endemic areas of the disease in Indonesia, i.e., Tamanbogo, Lampung, and Sukabumi, West Java, as well as from some non-endemic areas in North Sumatra and West Sumatra. Results of the study indicated that the 212 isolates could clustered into 21 haplotypes. The most dominant haplotypes as indicated by their highest frequency of haplotypes were haplotype Pot 2-019 (54.46%) followed by haplotype Pot 2-021 (14.73%) and haplotype Pot 2-016 (6.25%). Regardless of origins of the *P. oryzae* isolates, we found 6 haplotypes from Tamanbogo (out of 117 samples), 13 haplotypes from Sukabumi (out of 77 samples), and 11 haplotypes from North Sumatra and West Sumatra (out of 18 isolates). It seems that genetic diversity of the *P. oryzae* isolates was not affected by the total number of samples/isolates, but rather by place of the origin and rice genotypes from which the isolates were collected.

Key words: Genetic diversity, *Pyricularia oryzae*, Pot-2 primer, rep-PCR.

PENDAHULUAN

Penyakit blas yang disebabkan oleh cendawan *Pyricularia oryzae* merupakan salah satu penyakit penting pada tanaman padi, terutama padi gogo (Ou 1985). Serangan yang disebabkan oleh patogen ini sangat serius karena dapat menyerang padi pada semua stadia pertumbuhan, mulai dari pesemaian hingga tanaman dewasa. Penyakit blas dijumpai di daerah tanpa irigasi, dataran tinggi tropis, subtropis, dan daerah *temperate* (Yap 1994). Di Indonesia penyakit blas merupakan salah satu kendala yang sangat penting dalam peningkatan produksi padi gogo, bahkan dilaporkan

bahwa serangan penyakit blas telah meluas pada pertanaman padi sawah (Rahama dan Hasanuddin 1993).

Secara ekonomis serangan penyakit blas di pesemaian tidak separah serangan busuk leher (*neck blast*) pada tanaman dewasa. Serangan berat di pesemaian atau stadia anakan bisa menyebabkan tanaman puso, sementara serangan berat pada tanaman dewasa yang menyebabkan busuk leher dapat mengakibatkan gagal panen dan tidak tersedianya benih untuk generasi selanjutnya (Bustamam dan Mahrup 2004).

Tingginya kerugian yang disebabkan oleh cendawan blas mengharuskan pemulia terus mengembangkan varietas unggul tahan terhadap penyakit blas sebagai salah satu strategi pengendalian penyakit ini. Tidak dapat dipungkiri bahwa menanam varietas tahan merupakan cara penanggulangan penyakit blas yang murah, efisien, dan aman dari risiko pencemaran pestisida. Namun ketahanan suatu varietas padi terhadap penyakit blas hanya dapat dimanfaatkan beberapa tahun saja. Menurut beberapa ahli (Ou 1985, Latterell dan Rossi 1986, Hittalmani *et al.* 1995) ketidakstabilan varietas padi terhadap penyakit blas disebabkan oleh kompleksitas patogen yang dengan mudah dapat mematahkan ketahanan varietas terutama bila ketahanan varietas ditentukan oleh satu gen dominan.

Studi mengenai biologi populasi patogen yang merupakan sintesis antara disiplin ilmu epidemiologi dan genetika populasi patogen (Milgroom 2001, Milgroom dan Peever 2003) merupakan pendekatan yang berbasis "*problem-oriented*". Pada genetika populasi, penelitian difokuskan pada faktor yang mempengaruhi perubahan genetika populasi patogen (evolusi), karena perubahan waktu (lebih dari 2 musim tanam), tempat, dan tekanan lingkungan (genotipe tanaman inang, aplikasi fungisida dan pemupukan, irigasi dan rotasi tanaman). Pengkajian faktor yang mempengaruhi dinamika populasi patogen diharapkan dapat membantu pemulia dalam menentukan strategi perakitan dan *deployment* dari varietas unggul baru yang dihasilkan (Mc Donald 1997, 2004). Di samping itu, pengkajian dinamika populasi cendawan blas di lapang merupakan langkah awal yang harus dilakukan untuk mendapatkan informasi gen-gen resisten tanaman yang efektif untuk lokasi tertentu (George *et al.* 1998). Keragaman genetik dalam biologi populasi pa-

togen dapat diketahui melalui pemantauan keragaman ras fisiologi (*patotipe*) yang diklasifikasikan berdasarkan reaksi patogen pada tanaman diferensial, pengelompokan (*lineage*) yang dihasilkan dari analisis DNA patogen dengan marka molekuler RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) dan PCR (*Polymorphism Chain Reaction*) atau gabungan dari kedua pendekatan itu.

Analisis genetik cendawan blas di Indonesia telah dilakukan sebelumnya dengan teknik RFLP menggunakan pelacak MGR586 yang merupakan fragmen elemen loncat (transposon) (George *et al.* 1998). Dewasa ini telah dikembangkan pendekatan baru menggunakan teknik PCR untuk mengatasi keterbatasan-keterbatasan metode RFLP. Keterbatasan metode RFLP adalah memerlukan jumlah DNA total yang banyak, pelabelan probe (pelacak) baik secara kimia (Dig-UTP) maupun secara radioaktif, serta pemindahan fragmen DNA ke membran nitroselulosa. Metode PCR yang dikenal dengan teknik Rep-PCR menggunakan primer Pot-2 dirancang berdasarkan elemen transposon Pot-2 dalam genom cendawan blas (*endogenous repetitive DNA sequences*). Elemen ini merupakan salah satu elemen sekuen berulang (selain sekuen berulang MGR) yang tersebar pada genom cendawan blas (Kachroo *et al.* 1994) dan didapatkan kira-kira 100 kopi di sepanjang genom cendawan (George *et al.* 1998). Analisis klaster dari data yang dihasilkan primer Pot-2 (Rep-PCR) dilaporkan tidak berbeda dengan klasterisasi yang dihasilkan oleh analisis DNA dengan prob MGR pada teknologi RFLP (Babujee dan Gnana-manickam 2000).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keragaman genetik (haplotipe) yang menggambarkan famili genetik cendawan blas berdasarkan analisis menggunakan marka molekuler (Leung *et al.* 1993) dari isolat-isolat asal daerah endemis penyakit blas (Tamanbogo, Lampung dan Sukabumi, Jabar) yang sering digunakan sebagai lokasi pengujian ketahanan varietas padi terhadap penyakit ini serta isolat-isolat dari daerah lain yang bukan daerah endemik (Sumatera Barat dan Sumatera Utara) berdasarkan analisis Rep-PCR (primer Pot-2). Menurut Amir *et al.* (1999), *P. oryzae* diketahui mempunyai keragaman genetik yang tinggi. Sukabumi dan Tamanbogo merupakan daerah endemik di Indonesia dan telah ditemukan 25 ras fisiologis, dengan dominasi ras-ras yang berbeda dari musim tanam ke musim tanam berikutnya. Informasi yang dihasilkan merupakan data awal dari studi biologi populasi cendawan blas guna mendapatkan informasi tentang dinamika populasi patogen ini. Haplotipe yang dihasilkan tidak ada kaitannya dengan virulensi,

tetapi menggambarkan keragaman genetik patogen secara molekuler (Leung *et al.* 1993).

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi 212 isolat cendawan blas koleksi Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian yang terdiri dari 117 isolat berasal dari Tamanbogo, 77 isolat dari Sukabumi, 18 isolat dari Sumatera Utara (Sumut) dan Sumatera Barat (Sumbar). Tamanbogo dan Sukabumi merupakan daerah endemik penyakit blas, sedangkan Sumut dan Sumbar bukan daerah endemik blas. Isolat-isolat tersebut dikoleksi mulai tahun 1998-2004 dari bermacam-macam tanaman padi. Primer yang digunakan adalah Pot 2-1 (5'-cggaagccctaaagctgtttt-3') dan Pot 2-2 (5'-ccctcattcgctcacacgttc-3').

Ekstraksi DNA Genom

Ekstraksi DNA genom cendawan blas dilakukan dari kultur cair dari miselia cendawan dengan penyediaan kultur miselia mengikuti metode Chen (1993). Miselia dipanen dari kultur cair menggunakan kertas saring Whatman No. 1 yang diletakkan pada alat filtrasi Buchner. Selanjutnya miselia diliofilisasi dengan vakum dan dikeringbekukan selama 24 jam pada suhu 50°C dengan tekanan 50-70 atmosfer. Miselia kering dapat disimpan pada suhu -20°C sampai saat digunakan. DNA total genom cendawan blas diisolasi menggunakan larutan CTAB/NaCl mengikuti metode IRRI (1994).

Amplifikasi DNA Cendawan Blas

Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan teknik PCR berdasarkan metode George *et al.* (1998) dengan total reaksi 25 μ l yang mengandung 25 ng DNA genomik cetakan, masing-masing dNTP 185 μ M (dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP), 0,5 μ M masing-masing primer (Pot 2-1/Pot 2-2), 1 Unit *Taq Polimerase* di dalam bufer PCR. Campuran reaksi dimasukkan ke dalam plat PCR dan diberi satu tetes minyak mineral untuk menghindari penguapan. Reaksi amplifikasi DNA dilakukan pada mesin PCR PTC-100 *thermal cycler* (MJ Research, Watertown, MA) dengan profil sebagai berikut: inisiasi denaturasi pada suhu 95°C selama 2,5 menit, diikuti dengan 30 siklus tahapan denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 62°C selama 1 menit, dan reaksi pemanjangan pada suhu 65°C selama 10 menit. Pada tahapan akhir dilakukan proses pemanjangan akhir pada suhu 65°C selama 15 menit. Visualisasi hasil PCR dilakukan pada 2% gel elektrofore-

sis (0,5% agarose, 0,75% synergel (Diversified Biotech, Newton, MA) di dalam bufer TBE 0,5x, selanjutnya gel direndam dalam etidium bromida dan didokumentasikan dengan ChemiDoc™ EQ, BioRad.

Analisis Data

Mengingat tidak ada analisis segregasi pada studi keragaman genetik pada isolat-isolat ini, maka kontrol genetik dari fenotipe tidak diketahui. Leung *et al.* 1993 menganjurkan agar frekuensi gabungan beberapa genotipe dari satu isolat disebut haplotipe. Pita DNA hasil amplifikasi dengan primer Pot-2 dari masing-masing isolat diskor sebagai data biner dengan nilai 1 (bila ada pita) dan 0 (bila tidak ada pita). Selanjutnya data ini digunakan untuk mengelompokkan isolat uji menjadi haplotipe-haplotipe melalui analisis kluster SAHN pada program NTSYS pc. 2.1 (Rohlf 1993).

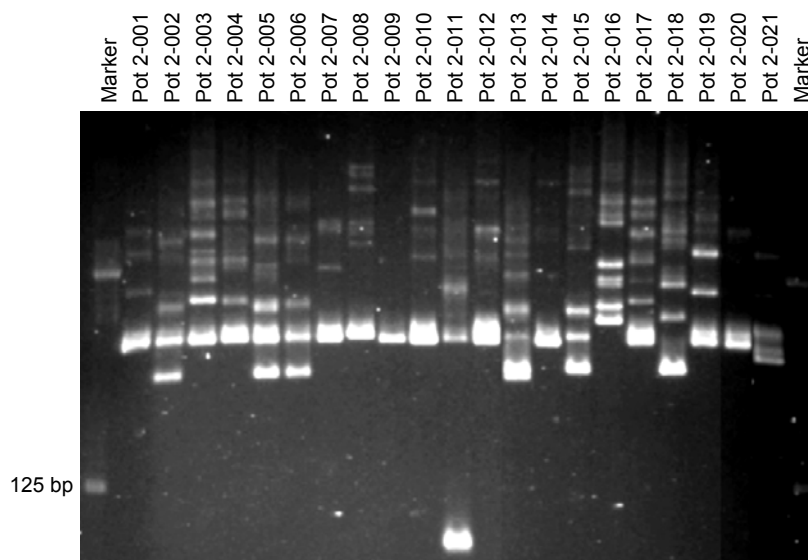
Heterogenitas haplotipe yang dihasilkan Pot-2, ditentukan berdasarkan indeks keragaman genetik (H) cendawan menurut rumus $H = [n/(n-1)][1 - \sum X_i^2]$ yang dikemukakan oleh Nei (1973), di mana H adalah keragaman genetik, n adalah jumlah isolat *P. oryzae* yang diuji, dan X_i adalah frekuensi relatif haplotipe ke-i dalam isolat cendawan yang dianalisis. Koefisien diferensiasi genetik (*GST*) dihitung berdasarkan persamaan $GST = (HT - HS) / HT$ (Nei 1973, Crow 1986) di mana HT adalah perkiraan keragaman genetik haplotipe dari total isolat dan HS adalah nilai rata-rata perkiraan keragaman isolat-isolat yang diuji.

HASIL DAN PEMBAHASAN

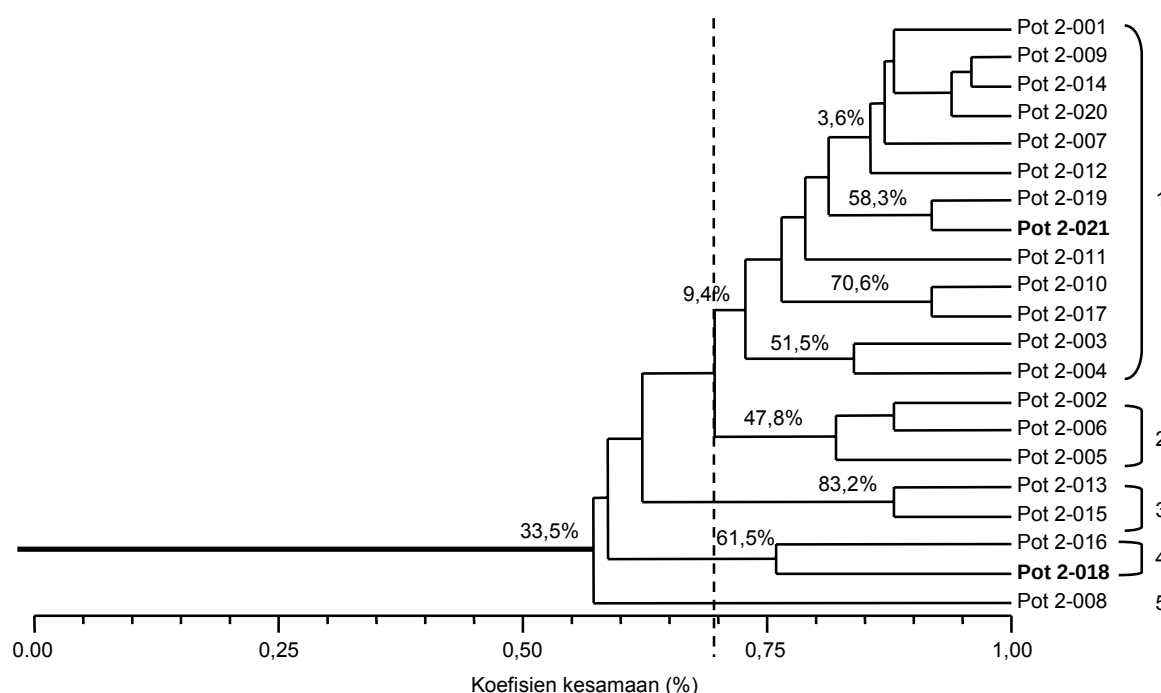
Untuk keperluan analisis data maka 212 isolat yang digunakan pada penelitian ini dikelompokkan menjadi tiga, yaitu kelompok 1 (Tamanbogo), kelompok 2 (Sukabumi) yang merupakan daerah endemik, dan kelompok lain-lain (Sumut dan Sumbar) yang bukan daerah endemik.

Hasil amplifikasi PCR genomik DNA dari 212 isolat *P. oryzae* dengan primer Pot-2 menunjukkan ada 21 macam profil pola pita DNA (haplotipe) pada gel agarose (Gambar 1). Amplifikasi genomik DNA *P. oryzae* dengan Pot-2 menghasilkan 24 fragmen yang dapat diskor. Hal ini sesuai dengan penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Zulheri (data tidak dipublikasi). George *et al.* (1998) pada isolat Filipina dengan primer Pot-2 mendapatkan sekitar 30 fragmen.

Analisis UPGMA melalui klusterisasi SAHN pada program NTSYS pc 2.1 (Rohlf 1993), menunjukkan bahwa data biner 1 (ada) dan 0 (tidak ada) pita DNA dari ke-21 haplotipe ini, tersusun dalam suatu dendrogram (Gambar 2). Pada tingkat 70% koefisien kesamaan terlihat bahwa haplotipe Pot-2 dari isolat *P. oryzae* yang dianalisis, dapat dikelompokkan dalam lima kelompok berbeda, yaitu kelompok 1, 2, 3, 4, dan 5. Setelah dilakukan analisis *winboot*, ternyata tingkat kepercayaan dendrogram yang dihasilkan masih sangat rendah. Rendahnya tingkat kepercayaan dendrogram menunjukkan bahwa pengelompokan UPGMA yang dihasilkan tidak stabil. Felsenstein (1985) menyatakan bah-



Gambar 1. Profil DNA cendawan *Pyricularia oryzae* menurut analisis DNA genom dengan Pot-2 pada gel agarose 2%. Angka 001, 002, 003, dst. adalah representatif haplotipe Pot-2 dari Lampung, Sukabumi, dan lain-lain (Sumut dan Sumbar). Pot 2-018 dan Pot 2-021 adalah kelompok yang dominan.



Gambar 2. Dendrogram dari haplotipe Pot-2 *Pyricularia oryzae* menurut analisis kluster dengan metode SAHN pada program NTSYS-pc 2.1. Kelompok Pot 2-018 dan Pot 2-021 merupakan kelompok paling dominan. Haplotipe Pot-2 terbagi menjadi lima kelompok berdasarkan koefisien kesamaan 75%.

wa klasterisasi suatu dendrogram dinyatakan sebagai kelompok yang stabil apabila nilai *bootstrap* (pengelompokan) mencapai 95% atau lebih. Rendahnya tingkat kepercayaan dari dendrogram yang dihasilkan pada penelitian ini, diduga disebabkan oleh kecilnya jumlah isolat per lokasi. Kemungkinan lain juga dapat disebabkan oleh sangat bervariasinya asal isolat yang digunakan baik dari tanaman inang (genotipe padi) maupun lokasi asal isolat. Dari data dukung, diketahui bahwa isolat Lampung berasal dari inang galur-galur persilangan Way Rarem dan *Oryzica ilanos* 5 dan 2 isolat dari lahan petani. Isolat Sukabumi berasal dari inang galur-galur persilangan Danau Tempe dan Kencana Bali, 5 isolat dari lahan petani, 1 isolat dari Way Rarem, dan 1 isolat dari Ciherang. Isolat Sumut dan Sumbar berasal dari inang Batang Sumani, Cisokan, IR64, K. Kusuik, Ramos, Simerim, dan Silembu.

Dilihat dari tempat asal isolat *P. oryzae* yang digunakan, ternyata jumlah haplotipe Pot-2 cukup bervariasi (Tabel 1). Dari Tamanbogo didapatkan 6 haplotipe, dari Sukabumi 13 haplotipe, dan dari Sumut dan Sumbar, kelompok lain-lain sebanyak 11 haplotipe. Tipe Pot 2-019 merupakan haplotipe yang paling dominan dengan total frekuensi 54,42% dari 212 isolat atau seluruh isolat yang dianalisis. Frekuensi tertinggi haplotipe berikutnya Pot 2-021 dengan total frekuensi 14,63%. Frekuensi tertinggi dari haplotipe Pot 2-021 ini

dijumpai pada isolat asal Sukabumi. Berdasarkan dendrogram yang dihasilkan program NTSYS (Gambar 2) dapat diketahui bahwa haplotipe Pot 2-019 dan Pot 2-021 terletak pada satu percabangan yang relatif dekat dengan nilai pengelompokan 90%. Apakah kedua haplotipe ini betul-betul berasal dari satu induk yang terpecah menjadi dua haplotipe berbeda karena faktor evolusi, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut, misalnya dengan penambahan jumlah isolat yang berasal dari satu lokasi dan penambahan jumlah lokasi atau menggunakan pendekatan lainnya.

Pada isolat yang berasal dari daerah Sumut dan Sumbar diketahui bahwa Pot 2-03 merupakan haplotipe dominan nomor dua sesudah Pot 2-019. Analisis UPGMA (Gambar 2) menunjukkan bahwa haplotipe Pot 2-003 ini mengelompok pada kelompok 2, sama dengan Pot 2-019 dan Pot 2-021. Tetapi, haplotipe Pot 2-003 tidak dijumpai pada isolat asal Tamanbogo dan Sukabumi, kemungkinan besar haplotipe ini disumbangkan oleh isolat asal Sumut atau Sumbar. Keragaman genetik (H) ternyata tidak dipengaruhi oleh besarnya sampel (jumlah isolat) atau tempat asal isolat (Tabel 1 dan Gambar 3). Nilai H_i (H sublokasi) terendah diperoleh dari isolat asal Tamanbogo (0,28), yaitu dari 117 isolat, disusul oleh nilai H_i dari isolat asal lain-lain (Sumut dan Sumbar) (0,52), yaitu dari analisis 18 isolat. Nilai H_i tertinggi (0,82) didapatkan dari 77 isolat

yang berasal dari Sukabumi. Rendahnya nilai keragaman genetik *P. oryzae* pada isolat asal Tamanbogo diperkirakan karena pengaruh keragaman genetik ketahanan varietas padi asal isolat yang digunakan relatif sempit dibandingkan dengan keragaman varietas inang isolat *P. oryzae* dari daerah lain. Hal ini karena isolat-isolat asal Tamanbogo diperoleh dari suatu populasi tanaman padi hasil persilangan antara tanaman tahan dan agak tahan terhadap penyakit blas yang ditanam di Tamanbogo, Lampung. Menurut Leung *et al.* (1993) di antara tekanan evolusi yang sangat berperan dalam pembentukan struktur genetik patogen adalah seleksi tanaman inang, terutama akibat tekanan gen ketahanan dari tanaman oleh gen virulen pada patogen. Leung *et al.* (2003) juga melaporkan bahwa berdasarkan analisis sidik jari DNA *P. oryzae* keragaman genetik cendawan ini pada lahan yang ditanami dengan campuran beberapa genotipe padi lebih bervariasi dibandingkan dengan keragaman genetik isolat yang berasal dari lahan yang ditanami dengan satu varietas (monogenik). Sebaliknya, tingginya keragaman genetik pada isolat lain-lain (Tabel 1), diperkirakan tidak saja dipengaruhi oleh lokasi yang berbeda-beda, tetapi juga karena beragamnya varietas padi inang asal

isolat yang ditanam petani di daerah endemik Tamanbogo, Sukabumi, dan daerah non endemik (Sumut dan Sumbar). Nilai koefisien diferensiasi genetik yang tinggi antarisolat Tamanbogo, Sukabumi, dan beberapa daerah lain ($GST = 0,67$) menunjukkan bahwa perbedaan lokasi asal isolat sangat berpengaruh terhadap diferensiasi cendawan *P. oryzae*. Kenyataan ini didukung oleh hasil analisis X^2 dan uji F yang sangat berbeda nyata (data tidak ditampilkan). Namun, karena asal isolat bukan dari satu genotipe padi yang sama, maka tingginya nilai GST diperkirakan tidak saja disebabkan oleh perbedaan lokasi, tetapi juga karena beragamnya genotipe tanaman padi asal isolat.

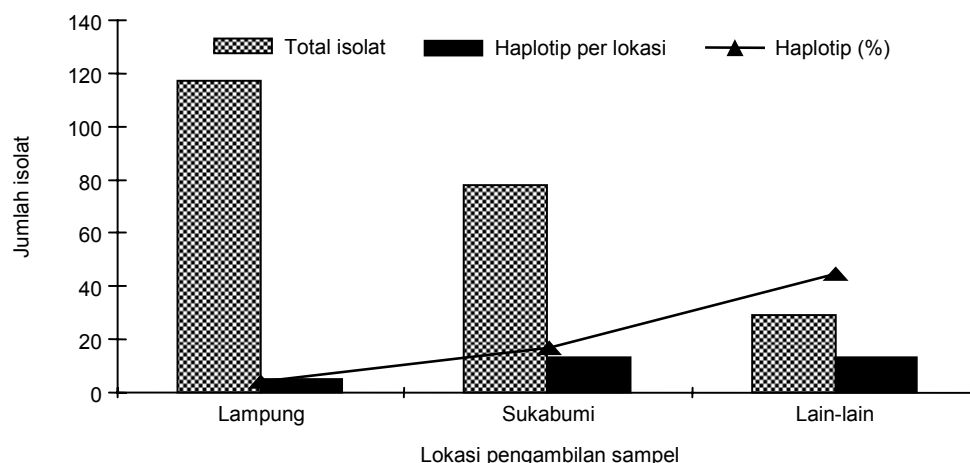
KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan uji dengan teknik rep-PCR menggunakan primer Pot-2, maka keragaman genetik 212 isolat *P. oryzae* yang berasal dari berbagai tanaman padi di dua daerah endemik dan dua daerah non endemik penyakit blas di Indonesia dapat dikelompokkan menjadi 21 haplotipe yang pada koefisien kesamaan 75% terbagi menjadi 5 kelompok. Frekuensi haplotipe tertinggi adalah Pot 2-019 (54,42%), diikuti oleh haplotipe

Tabel 1. Frekuensi haplotipe dan keragaman genetik cendawan blas (*Pyricularia oryzae*) asal Tamanbogo, Sukabumi, dan lain-lain (Sumut dan Sumbar) menurut analisis genomik DNA dengan primer Pot-2.

Haplotipe	Jumlah isolat per lokasi			Total isolat	Frekuensi (%)
	Lampung	Sukabumi	Sumut dan Sumbar		
Pot 2-001	0,00	1,00	2,00	3,00	1,34
Pot 2-002	0,00	1,00	0,00	1,00	0,45
Pot 2-003	0,00	0,00	6,00	6,00	2,68
Pot 2-004	0,00	1,00	2,00	3,00	1,34
Pot 2-005	0,00	0,00	1,00	1,00	0,45
Pot 2-006	0,00	0,00	2,00	2,00	0,89
Pot 2-007	0,00	1,00	2,00	3,00	1,34
Pot 2-008	0,00	0,00	1,00	1,00	0,45
Pot 2-009	0,00	9,00	0,00	9,00	4,02
Pot 2-010	0,00	9,00	0,00	9,00	4,02
Pot 2-011	0,00	1,00	0,00	1,00	0,45
Pot 2-012	0,00	1,00	0,00	1,00	0,45
Pot 2-013	0,00	0,00	1,00	1,00	0,45
Pot 2-014	8,00	6,00	0,00	14,00	6,25
Pot 2-015	0,00	0,00	1,00	1,00	0,45
Pot 2-016	0,00	2,00	0,00	2,00	0,89
Pot 2-017	1,00	0,00	1,00	2,00	0,89
Pot 2-018	1,00	0,00	0,00	1,00	0,45
Pot 2-019	99,00	16,00	0,00	115,00	54,25
Pot 2-020	2,00	3,00	0,00	5,00	2,36
Pot 2-021	6,00	26,00	0,00	31,00	14,63
Total isolat	117,00	77,00	18,00	212,00	100,00
Jumlah	6,00	13,00	11,00		
HS	0,28	0,82	0,52		
HT				2,00	
GST				0,67	

Isolat yang digunakan berasal dari Lampung, Sukabumi, dan lain-lain (Sumut dan Sumbar). H_i = keragaman genetik (haplotipe Pot-2) per lokasi [$H_i = n/n-1-(1-SX_i^2)$] atau keragaman genetik tiap-tiap lokasi, HT = keragaman genetik total haplotipe dari seluruh isolat yang dianalisis, HS = nilai rata-rata keragaman genetik per lokasi, GST = koefisien diferensiasi genetik [$GST = (HT-HS)/HT$].



Gambar 3. Perbandingan jumlah isolat *Pyricularia oryzae* yang dianalisis dan haplotipe Pot-2 yang diperoleh untuk tiap-tiap lokasi.

Pot 2-021 (14,63%) dan Pot 2-014 (6,25%). Isolat yang berasal dari Tamanbogo (117 isolat) dikelompokkan menjadi 6 haplotipe. Isolat asal Sukabumi (77 isolat) dikelompokkan menjadi 13 haplotipe, sedangkan isolat lain (18 isolat) yang berasal dari Sumatera Utara dan Sumatera Barat dikelompokkan menjadi 11 haplotipe. Keragaman genetik *P. oryzae* tidak dipengaruhi oleh jumlah sampel isolat, tetapi diduga erat kaitannya dengan tempat asal dan genotipe padi inangnya.

Untuk penelitian lanjutan sebaiknya dilakukan penelitian sejenis dengan menggunakan marka yang terkait dengan virulensi seperti *Cut1*, *Pwl2*, dan *Erg2* (Soubabere *et al.* 2001), untuk lebih memahami mekanisme interaksi tanaman padi dengan blas.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Sdr. Mahrup yang membantu secara teknis penyiapan isolat dan Sdri. Ma'sumah yang membantu dalam ekstraksi DNA cendawan blas.

DAFTAR PUSTAKA

- Amir, M., A. Nasution, dan Santosa. 1999.** Inventarisasi ras *P. oryzae* di Daerah Sukabumi, Jawa Barat musim tanam 1993-1998. Makalah dalam Seminar PFI. Purwokerto, September 1999.
- Bustamam, M. dan Mahrup. 2004.** Penyimpanan cendawan blas *Pyricularia grisea* untuk jangka panjang. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian. 12 hlm.
- Babujee, L. and S.S. Gnanamanickam. 2000.** Molecular tools for characterization of rice marker-assisted breeding for disease resistance. *Curr. Sci.* 70(3):248-257.
- Chen, D. 1993.** Population structure of *Pyricularia grisea* at two screening sites and quantitative characterization of major and minor resistance genes. A Thesis Doctor of Philosophy. University of the Philippines at Los Banos.
- Crow, J.F. 1986.** Basic Concepts in Population, Quantitative and Evolutionary of Genetic. W.H. Freeman, San Francisco.
- Felsenstein, J. 1985.** Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- George, M.L.C, R.J. Nelson, R.Z. Zeigler, and H. Leung. 1998.** Rapid population analysis of *Magnaporthe grisea* by using rep-PCR and endogenous repetitive DNA sequence. *Phytopathology* 88:223-229.
- Hittalmani, S.T. W. Mew, N.R. Fooland, and N. Huang. 1995.** Identification of blast resistance gene Pi-2(t) in a segregation population of rice. *Theor. Appl. Genet.* 91:9-14.
- International Rice Research Institute. 1994.** Protocols for DNA typing of the blast fungus pathogen *Pyricularia grisea*. Mol. Plant Pathology Laboratory Entomolgy and Pathology Division The International Rice Research Institute, Los Banos. 25 p.
- Kachroo, P., S.A Leong, and B.B. Chatto. 1994.** Pot-2, an inverted repeat transposon from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol. Gene. Genet.* 245:39-348.
- Latterell, F.M. and A.E. Rossi 1986.** Longevity and pathogenic stability of *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology* 76:231-235.
- Leung, H., R.J. Nelson, and J.E. Leach. 1993** Population structure of plant pathogenic fungi and bacteria. *Adv. Plant Pathol.* 10:157-205.
- Leung, H., J.X. Fan, Y. Zhu, H. Chen, I. Revilla-Monila, I. Pangga, C.V. Cruz, and T.W. Mew. 2003.** Using genetic diversity to achieve sustainable rice diseases management. *Plant Disease* 87(10):1156-1169.

- McDonald, B.A. 1997.** The population genetics of fungi, tools and techniques. *Phytopathology* 87(4):448-453.
- McDonald, B.A. 2004.** Population genetics of plant pathogens. The plant health instructor DOI:10.1094/PHI-A-2004-025-01. APSnet Education Center Advance Topics. 8 p.
- Milgroom, M.G. 2001.** The synthesis of genetics and epidemiology: Contributions of population biology in plant pathology. *J. Plant Path.* 83(2):57-62.
- Milgroom, M.G. and T.L. Peever. 2003.** Population biology of plant pathogens: The synthesis of plant disease epidemiology and population genetics. *Plant Disease* 87(06):608-617.
- Nei, M. 1973.** Relative role of mutation and selection in the maintenance of genetic variability. *Philos. Trans. R. Soc. London B* 319:615-629.
- Ou, S.H. 1985.** Rice Disease. 2nd ed. Commonwealth Mycological Institute Publication. Kew Surrey. 380 p.
- Rahama, S. dan A. Hasanuddin. 1993.** Resistensi beberapa varietas dan galur padi terhadap penyakit blas (*Pyricularia oryzae*). Kongres Nasional XII dan Seminar Ilmiah Perhimpunan Fitopatologi Indonesia, Yogyakarta. 125 hlm.
- Rohlf, F.J. 1993.** NTSys-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Applied Biostatistics. New York.
- Soubabere, O., V. Jorge, J.L. Notteghem, M.H. Lebrun, and D. Tharreau. 2001.** Sequence characterized amplified region markers for the rice blast fungus, *Magnaphorthe grisea*. *Molecular Ecology Notes* 1. Blackwell Science, Ltd.
- Yap, I.V. 1994.** Evaluation of deployment strategies for resistance in rice to *Pyricularia grisea* by simulation modeling. Thesis Master of science. UPLB. Philippines.
-