

Identifikasi Marka Polimorfik untuk Pemuliaan Padi Toleran Defisiensi Fosfor

Joko Prasetyono¹, Hajrial Aswidinnoor², Sugiono Moeljopawiro¹, Didy Sopandie², dan Masdiar Bustamam¹

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111

²Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Dramaga, Bogor

ABSTRACT

Identification of Polymorphic Markers for Breeding of Rice Tolerant to Phosphorus Deficiency. *Joko Prasetyono, Hajrial Aswidinnoor, Sugiono Moeljopawiro, Didy Sopandie, and Masdiar Bustamam.* Information on polymorphisms among rice parents are very important in rice breeding for tolerance to phosphorus deficiency. A study was conducted at the Molecular Biology Laboratory, Indonesian Center Agricultural Biotechnology and Genetic Resources (ICABIOGRAD) from October 2006 to July 2007 to identify polymorphism markers from 6 rice genotypes. The rice genotypes, i.e., Dodokan, Situ Bagendit, Batur, Kasalath, NIL-C443, dan K36-5-1-1 were analyzed for polymorphisms using 496 SSR markers, which cover the rice genomes. Seven of the 496 markers were used as foreground and recombinant selection markers, and the rests (489 markers) were used as background selection markers. PCR amplifications were separated on a 5% polyacrylamide gel and colored by the silver staining method. Three different markers among the seven foreground and recombinant selection markers were selected from each crossing, which are tightly linked with *Pup1* gene and have a distance less than 5 cM. These markers are Dodokan vs Kasalath (RM277, SSR3, RM519), Dodokan vs NIL-C443 (RM277, SSR3, RM519), Dodokan vs K36-5-1-1 (RM277, SSR3, RM519), Situ Bagendit vs Kasalath (RM28102, SSR3, RM519), Situ Bagendit vs NIL-C443 (RM28102, SSR3, RM519), Situ Bagendit vs K36-5-1-1 (RM511, SSR3, RM519), Batur vs Kasalath (RM277, RM1261, RM519), Batur vs NIL-C443 (RM277, RM1261, RM519), and Batur vs K36-5-1-1 (RM28102, SSR3). Variations in *background* selection primers were found in each chromosome and in each parent combinations. Primers on chromosome 4, 5, and 12 showed the lowest polymorphisms; more primers are needed for these chromosomes.

Key words: Microsatellite markers, rice breeding, phosphorus deficiency.

PENDAHULUAN

Keracunan dan defisiensi mineral merupakan masalah utama di dunia, di Asia sekitar 50% lahan padi mengalami defisiensi fosfor (P). Di Indonesia, luas lahan masam yang diperkirakan mengalami defisiensi fosfor mencapai 45.794.000 ha atau sekitar 24,3% dari total daratan yang ada (BPS 2004). Defisiensi P merupakan masalah utama di lahan pertanian, di mana

petani seringkali tidak mampu membeli pupuk fosfat dan tanah masam memiliki kapasitas pengikatan P yang tinggi. Pada tanah masam unsur P akan diikat oleh besi (Fe) pada kondisi tergenang, dan akan diikat oleh aluminium (Al) pada kondisi kering. Defisiensi unsur P juga akan mengurangi anakan tanaman, mengurangi laju pelebaran daun, dan mengurangi laju produksi asimilat per luas daun (Radin dan Eidenbock 1984). Penggunaan varietas padi yang toleran terhadap P rendah di lahan marginal merupakan pilihan yang lebih strategis daripada mengubah kondisi lahan tersebut dengan pengapuran dan pemupukan yang seringkali tidak praktis dan ekonomis dan bahkan dapat mengancam pertanian berkelanjutan.

Marker Assisted Backcrossing (MABc) adalah penggunaan marka molekuler untuk seleksi (*Marker Assisted Selection* (MAS)/*Marker Assisted Breeding* (MAB) yang dalam perkembangannya dipadukan dengan program pemuliaan silang balik. MABc dapat meningkatkan waktu persilangan untuk mendapatkan varietas/galur dengan sifat yang diinginkan. Menurut Ribaut dan Hoisington (1998) dengan menggunakan metode MABc mengembalikan genom tanaman 98% seperti tetua pemulih dibutuhkan hanya dua kali silang balik, sedangkan dengan cara konvensional (tanpa bantuan marka molekuler) diperlukan 4-5 kali silang balik. Apabila diinginkan hanya satu segmen gen saja tanpa ada gangguan dari gen pengikut lain (tidak ada *linkage drag*) bila tidak dibantu dengan marka molekuler diperlukan sampai 100 kali silang balik dan membutuhkan waktu 50 tahun, sedangkan apabila menggunakan metode MABc yang disempurnakan (menggunakan marka *foreground*, *recombinant*, dan *background*) hanya diperlukan populasi BC₂F₃ saja. Hal ini sangat menguntungkan bagi dunia pemuliaan tanaman karena dapat mempersingkat waktu perakitan varietas baru.

Perkembangan lanjut dari MABc ini adalah penggunaan marka-marka di seluruh kromosom selain marka yang terpaut dengan gen yang diinginkan. Metode ini terkenal dengan sebutan *Advanced Marker Assisted Backcrossing* (AdvMABc). Metode ini meliputi dua tahap. Tahap pertama adalah seleksi hasil persilangan dengan marka yang terpaut erat dengan gen

yang diinginkan yang dinamakan seleksi *foreground* (*foreground selection*) dan seleksi *recombinant* (*recombinant selection*). Seleksi *foreground* ini menggunakan satu marka (atau beberapa) yang terpaut sangat erat (*tightly linked*) dengan sifat yang diinginkan (apabila sudah diketahui gen yang dimaksud dapat menggunakan marka untuk gen tersebut). Seleksi *recombinant* adalah seleksi dengan menggunakan dua marka di antara marka *foreground*. Marka rekombinan ini terletak berbatasan dengan segmen gen yang dimaksud. Tahap kedua adalah dengan menggunakan marka sebanyak-banyaknya yang tersebar di seluruh kromosom. Tahap ini dinamakan seleksi *background* (*background selection*). Penggunaan seleksi *background* akan mempercepat pemulihan genom tetua pemulih. Individu yang menghasilkan marka homisogot dominan mengikuti tetua pemulih terbanyak yang akan dipilih untuk tahap persilangan berikutnya. Seleksi *background* memiliki dua tujuan, yaitu (1) mengurangi proporsi genom donor pada kromosom pembawa segmen gen donor dan (2) mengurangi genom donor pada kromosom lain (Frisch *et al.* 1999).

Penelitian yang mengeksplorasi keberadaan gen yang mengatur toleransi terhadap defisiensi P sudah dilakukan sekitar 10 tahun yang lalu. Publikasi pertama yang melaporkan eksplorasi marka yang terpaut dengan sifat defisiensi P pada padi dilaporkan oleh Wissuwa *et al.* (1998). Populasi NIL (*Near Isogenic Lines*) dari persilangan Kasalath dan Nipponbare dan dalam penelitiannya marka RFLP C498 (kromosom 6) dan C443 (kromosom 12) digunakan untuk melakukan seleksi. Pada akhir penelitian didapatkan populasi NIL-C498 yang secara genetik mengandung 96% Nipponbare, sedangkan NIL-C443 mengandung 91% Nipponbare (Wissuwa dan Ae 2001). Wissuwa *et al.* (2002) melanjutkan penelitiannya dengan mentransfer QTL dari penelitian sebelumnya, yakni dengan mendesain *Pup1*, dan mendapatkannya pada kromosom 12 dengan jarak 3 cM (= centimorgan) di antara marka S14025 dan S13126. Pada akhirnya *Pup1* dipetakan secara lebih baik dalam jarak 0,6 cM dan pemetaan fisik sekarang menempatkan *Pup1* dalam sekuen 240 kb dalam tiga klon BAC (*Bacterial Artificial Chromo-*

some). Tempat *Pup1* telah diidentifikasi dan didapatkan kira-kira 30 gen (*putative*) yang diduga terlibat dalam pengaturan *Pup1*. NIL-C443 yang membawa alel donor dari Kasalath, yang meningkatkan pengikatan P, dapat dipakai sebagai tetua donor.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan marka-marka yang polimorfik di antara tetua padi Indonesia yang sensitif terhadap defisiensi P (Dodokan, Situ Bagendit, Batur) dengan tetua padi dari IRRi yang toleran terhadap defisiensi P (Kasalath, NIL-C443, K36-5-1-1) untuk digunakan dalam kegiatan seleksi hasil persilangan.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler dan Rumah Kaca Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian mulai bulan Oktober 2006 sampai dengan Juli 2007.

Bahan Penelitian

Bahan tanaman padi yang digunakan dalam penelitian berasal dari tiga varietas unggul gogo Indonesia (Dodokan, Situ Bagendit, dan Batur) dan tiga genotipe dari IRRi (Kasalath, NIL-C443 [= Nil-*Pup1*], dan K36-5-1-1). Ketiga varietas padi gogo yang digunakan merupakan varietas peka terhadap defisiensi unsur P, berdasarkan hasil penelitian pendahuluan.

Total primer yang digunakan untuk penelitian ini berjumlah 496 primer, terdiri dari tujuh primer untuk seleksi *foreground* dan *recombinant*, 489 primer untuk seleksi *background* (sekuen 489 primer tidak ditampilkan tapi dapat dilihat dalam website <http://www.gramene.org/microsat/index.html>). Primer yang digunakan sebagai seleksi *foreground* dan seleksi *recombinant* dapat dilihat dalam Tabel 1.

Metode Penelitian

Daun dari enam tetua yang berumur sekitar dua minggu setelah berkecambah diambil dan DNA-nya diisolasi secara miniprep dengan mengacu pada metode Dellaporta (Dellaporta *et al.* 1983) yang dimodifi-

Tabel 1. Primer-primer yang digunakan untuk seleksi *foreground* dan *recombinant*.

Nama Primer	Kromosom	Forward	Reverse	Keterangan
RM 277	12	CGGTCAAATCATCACCTGAC	CAAGGCTTGCAAGGGAAG	Marka pengapit (<i>flanking marker</i>)
RM 28102	12	CACTAATTCTTCGGCTCCACTTTAGG	GTGGAAGCTCCGAGAAAGTGC	
RM 1261	12	GTCCATGCCCAAGACACAAC	GTACATCATGGGTGACCCC	
SSR3	12	xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx	xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx	
RM260	12	ACTCCACTATGACCCAGAG	GAACAATCCCTTCTACGATCG	
RM511	12	CTTCGATCCGGTGACGAC	AACGAAAGCGAAGCTGTCTC	
RM 519	12	AGAGAGCCCCTAAATTTCCG	AGGTACGCTCACCTGTGGAC	Marka pengapit (<i>flanking marker</i>)

xxxxx = belum dipublikasi (SSR3 merupakan pengembangan marka-marka baru yang terletak di antara marka RM277 dan RM 519).

kasi. Daun segar dimasukkan ke dalam tabung mikro berukuran 2 ml lalu dituang dengan nitrogen cair, kemudian dihaluskan dengan menggunakan sumpit. Serbuk daun ditambah larutan bufer ekstrak yang mengandung Na-disulfit (0,8 g/100 ml bufer ekstrak) ditambahkan dan dipanaskan dalam penangas air pada suhu 65°C, selama 15 menit. Tabung mikro dibolak-balik setiap 5 menit, kemudian ditambahkan kloroformisoamilalkohol (chisam) sebanyak 500 µl. Tabung mikro kemudian digoyang dengan tangan atau mesin penggoyang dalam kondisi pelan selama 10-15 menit, kemudian disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 15 menit. Supernatan DNA (larutan atas) dipindah ke dalam tabung plastik 2 ml yang baru dan ditambah dengan alkohol absolut (96%) atau isopropanol sampai mencapai volume 2 ml. Apabila diperlukan (cairan DNA berwarna coklat) sebelum ditambahkan etanol absolut atau isopropanol dapat ditambahkan Na/K asetat sebanyak 10% dari volume larutan. Tabung mikro diinkubasi selama 1 jam dalam freezer (-20°C), kemudian disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang, dan DNA dikeringkan menggunakan mesin vakum. Endapan DNA dilarutkan dalam 1 x bufer TE sebanyak 100-200 µl sesuai dengan besar kecilnya endapan. Kuantitas dan kualitas DNA tidak diukur, tetapi larutan DNA langsung dilarutkan ke dalam ddH₂O dengan perbandingan 1 : 50.

Reaksi PCR dilakukan pada 20 µl volume yang mengandung 1 x bufer PCR (10 mM tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,01% gelatin), 100 µM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,5 µM primer (F dan R), 1 : 10 DNA, dan 1 unit taq DNA polimerase (IRRI taq).

Program PCR yang digunakan dalam penelitian ini adalah 5 menit pada suhu 94°C untuk denaturasi permulaan, selanjutnya dilakukan 35 siklus yang terdiri dari: 60 detik pada suhu 94°C untuk denaturasi, 60 detik pada suhu 55°C untuk penempelan primer, dan 2 menit pada suhu 72°C untuk perpanjangan primer. Perpanjangan primer terakhir selama 7 menit pada suhu 72°C. Hasil PCR kemudian dipisahkan menggunakan gel poliakrilamid 5%. Pewarnaan DNA dilakukan dengan metode *silver staining*.

Primer-primer yang memberikan hasil polimorfik di antara dua tetua (satu tetua Indonesia dan satu tetua IRRI) dipilih dan dikelompokkan berdasarkan kromosom. Masing-masing primer polimorfik dilihat posisinya dalam peta mikrosatelit dalam kromosom padi. Primer-primer polimorfik yang berjarak 5-10 cM yang dipilih untuk seleksi *background*. Primer-primer utama (Tabel 1) yang polimorfik digunakan untuk seleksi *foreground* dan *recombinant*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian mengenai polimorfisme antartetua sangat diperlukan untuk menentukan primer mana yang dapat digunakan untuk keperluan seleksi progeni masing-masing persilangan. Pemilihan marka mikrosatelit sebagai marka untuk seleksi disebabkan marka jenis ini bersifat kodominan, sehingga dapat mendeteksi keragaman alel pada level yang tinggi (bisa mendeteksi asal alel dari tiap lokus), mudah dan ekonomis dalam pengaplikasiannya karena menggunakan proses PCR, dan daya ulangnya cukup tinggi (Temnykh *et al.* 2000).

Primer mikrosatelit yang digunakan untuk seleksi *foreground* dan *recombinant* digunakan pada seleksi awal untuk memilih progeni hasil persilangan yang dapat dipakai untuk tahap seleksi *background*. Hanya marka yang polimorfik antardua tetua saja yang bisa dipakai untuk kegiatan seleksi selanjutnya. Marka yang monomorfik antardua tetua tidak bisa dipakai untuk kegiatan seleksi karena tidak bisa membedakan asal sumbangan alel dalam satu lokus.

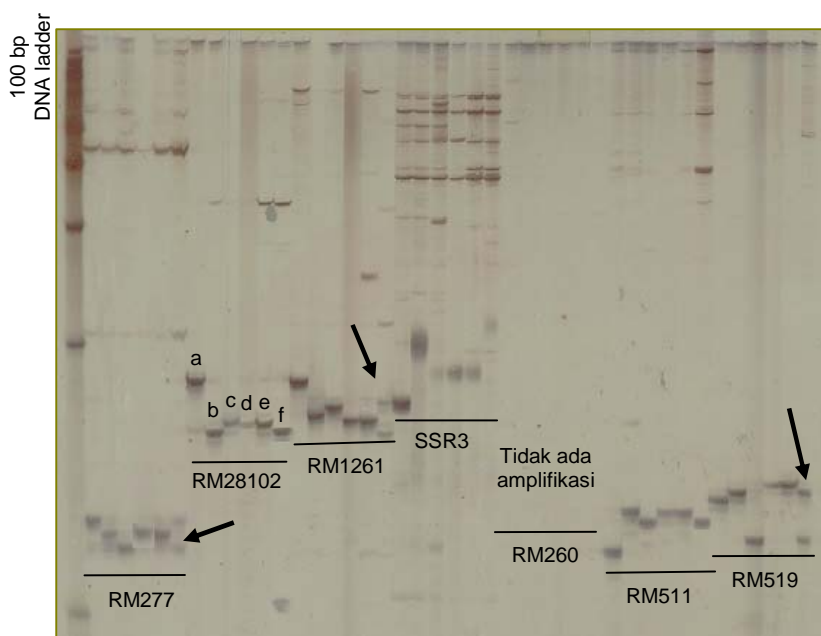
Varietas Dodokan, Situ Bagendit, dan Batur merupakan varietas unggul Indonesia yang dikenal sebagai padi gogo yang biasa ditanam petani di lahan kering. Dodokan dan Situ Bagendit bisa ditanam di lahan kering dan sawah, sedangkan Batur lebih cocok ditanam di lahan kering. Ketiga varietas ini digunakan sebagai varietas penerima (*recipient*) karena berdasarkan penelitian pendahuluan ketiganya termasuk varietas yang memiliki sifat sensitif terhadap defisiensi P. Varietas ini memiliki keunggulan-keunggulan seperti yang disebutkan dalam deskripsi varietas padi (Badan Litbang Pertanian 2002, Puslitbang Tanaman Pangan 1993). Kasalath merupakan *landrace* (padi lokal) yang berasal dari India. Padi ini termasuk padi lahan kering yang memiliki sifat sangat toleran terhadap defisiensi P. Penggunaan Kasalath sebagai tetua persilangan dengan Nipponbare (sensitif defisiensi P) telah menyebabkan peningkatan penangkapan P (*P uptake*) sebesar 28-55% lebih tinggi dibandingkan dengan Nipponbare. Gen *Pup1* yang dimiliki Kasalath sampai saat ini diperkirakan berfungsi lebih baik pada kondisi *upland* (dataran tinggi dan kering), sehingga penggunaan varietas gogo sebagai tetua penerima akan memberikan hasil yang baik.

Kasalath ternyata juga mengeluarkan asam organik (asam sitrat) ketika ditanam menggunakan larutan Yoshida dengan Fe-P sebagai sumber P sehingga P menjadi tersedia bagi tanaman (Ismail *et al.* 2005). Selain meningkatkan pengikatan P sebelum masuk ke dalam tanaman, ternyata Kasalath juga efisien dalam menggunakan P. Hal ini dibuktikan dengan introduksi gen *OsPTF1* (*Oryza sativa* L. *phosphate transcription*

factor). Gen ini diklon dari Kasalath. Introduksi gen ini ke dalam varietas yang sensitif defisiensi P (Nipponbare) melalui media *Agrobacterium tumefaciens* telah meningkatkan jumlah anakan, bobot kering akar dan tajuk sebesar 30% pada larutan hara, dan 20% pada media tanah. (Yi *et al.* 2005). Hal ini berarti Kasalath memiliki dua mekanisme sekaligus dalam menghadapi kondisi defisiensi P, yakni mekanisme eksternal dan internal. NIL-C443 atau NIL-*pup1* merupakan padi turunan hasil persilangan Nipponbare dengan Kasalath (BC5). K36-5-1-1 merupakan padi turunan hasil persilangan IR36 dengan Kasalath. Ketiga varietas padi ini mengandung gen yang sama dari Kasalath, yakni *Pup1*. Hasil survei tetua yang telah dilakukan dapat dilihat dalam Gambar 1 dan Tabel 2.

SSR3 merupakan primer mikrosatelit yang dikembangkan oleh tim peneliti di IRRI yang posisinya sangat dekat (*tightly-linked*) dengan gen *Pup1* dan berada di antara RM277 dan RM519. Beberapa marka saat ini sedang dibuat oleh tim peneliti di IRRI yang bisa memberikan informasi tentang gen *Pup1* itu sendiri. Marka-marka yang digunakan sebagai penunjuk keberadaan gen *Pup1* ini nantinya bisa digunakan sebagai marka untuk seleksi *foreground* (Dr. Joong Hyoun Chin 2007, komunikasi pribadi)

Marka RM 277 dan RM519 merupakan dua marka mikrosatelit yang diketahui terpaut dengan gen *Pup1* dengan jarak antar kedua marka tersebut sekitar 5,1 cM. Marka-marka ini berpotensi sebagai marka pengapit yang bisa digunakan untuk seleksi *recombinant*.



Gambar 1. Hasil amplifikasi 6 tetua menggunakan primer utama untuk seleksi *foreground* dan *recombinant* yang dipisahkan menggunakan gel poliakrilamid 5%. a = Dodokan, b = Situ Bagendit, c = Batur, d = Kasalath, e = NIL-C443, f = K36-5-1-1 (primer RM260 tidak menghasilkan pita). Tanda panah menunjukkan adanya dua alel pada genotipe K36-5-1-1

Tabel 2. Skoring hasil amplifikasi enam tetua menggunakan primer utama.

Primer	Persilangan								
	1vs4	1vs5	1vs6	2vs4	2vs5	2vs6	3vs4	3vs5	3vs6
RM277	P	P	P	M	M	M	P	P	M
RM511	P	P	P	M	M	P	P	P	M
RM28102	P	P	P	P	P	M	M	M	P
SSR3	P	P	P	P	P	P	M	M	P
RM1261	P	P	P	M	M	P	P	P	M
RM519	P	P	P	P	P	M	P	P	M

1 = Dodokan, 2 = Situ Bagendit, 3 = Batur, 4 = Kasalath, 5 = NIL-C433, 6 = K36-5-1-1, P = polimorfik, M = monomorfis, Warna merah = primer yang dipilih untuk seleksi *foreground*, warna biru = primer yang dipilih untuk seleksi *recombinant*.

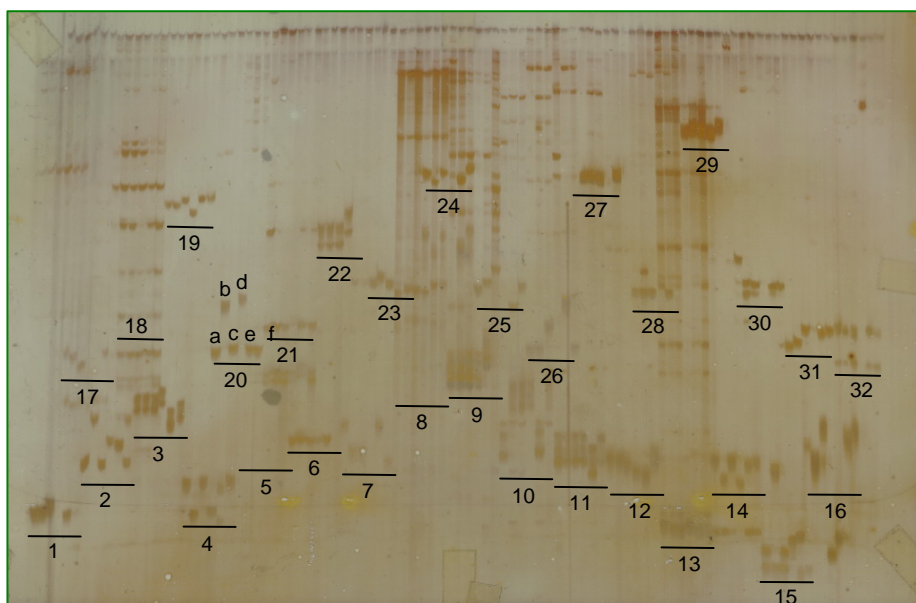
Namun, tidak semua kombinasi tetua memberikan hasil polimorfik, seperti RM277 menghasilkan pita monorfis pada tetua Situ Bagendit vs Kasalath, NIL-C443, dan K36-5-1-1, dan Batur vs K36-5-1-1. Demikian pula RM519 memberikan hasil monomorfis pada tetua Situ Bagendit vs K36-5-1-1 dan Batur vs K36-1-1. Untuk mengatasi hal ini harus digunakan marka di antara dua marka pengapit tersebut agar bisa memberikan peluang polimorfik yang lebih besar. Marka di antara dua marka pengapit tersebut bisa digunakan untuk seleksi karena segmen sepanjang 5 cM masih bisa dipantau menggunakan beberapa marka di antara dua marka pengapit tersebut (Collard *et al.* 2005). Berdasarkan Gambar 1 padi K36-5-1-1 dengan marka RM277, RM1261, dan RM519 memberikan dua pita, yang salah satu pitanya monomorfis dengan varietas Batur (lihat panah dalam Gambar 1). Walaupun primer ini polimorfis, namun primer ini tidak dapat digunakan karena salah satu pitanya ada yang sama dengan tetua Batur. Kondisi ini akan membingungkan dalam seleksi progeni hasil persilangan dua tetua tersebut. Dua alel yang akan dihasilkan dapat berasal dari alel kedua tetua atau bisa dari benih yang tercampur dengan benih K36-5-1-1.

Marka-marka untuk seleksi *foreground* dan seleksi *recombinant* sangat diperlukan untuk membantu mempertahankan segmen DNA donor yang membawa

gen *Pup1* pada kromosom progeni hasil persilangan. Pada seleksi generasi F_1 (F_1 , BC_1F_1 , BC_2F_1 , BC_3F_1 , dst.) hanya individu yang memberikan pita heterosigot (dua pita) untuk seluruh primer *foreground* dan *recombinant* yang harus dipilih, sedangkan apabila sudah menggunakan generasi F_2 (F_2 , BC_1F_2 , BC_2F_2 , BC_3F_2 , dst) individu yang memberikan pita homosigot seperti tetua donor yang harus dipilih. Segmen DNA donor ini harus dipertahankan agar tidak hilang selama proses rekombinasi saat terjadi persilangan. Oleh karena itu, penggunaan marka molekuler ini sangat membantu pemuliaan tanaman.

Pemilihan marka mikrosatelit yang akan digunakan dalam seleksi *background* telah dilakukan dengan melakukan amplifikasi PCR menggunakan primer-primer mikrosatelit yang tersebar di seluruh kromosom padi. Jumlah total primer yang telah digunakan untuk analisis ini adalah 489. Hasil amplifikasi sebagian marka-marka tersebut dapat dilihat dalam Gambar 2. Tabulasi hasil amplifikasi seluruh primer dapat dilihat dalam Tabel 3. Perbandingan jumlah primer yang polimorfik masing-masing persilangan dan tiap kromosom dapat dilihat pada Gambar 3 dan 4.

Berdasarkan Tabel 3 dan Gambar 3 jumlah primer polimorfik tiap persilangan di atas 200 primer, berarti tiap kromosom dapat menggunakan sekitar 20 primer. Jumlah primer polimorfik yang tinggi selalu di-

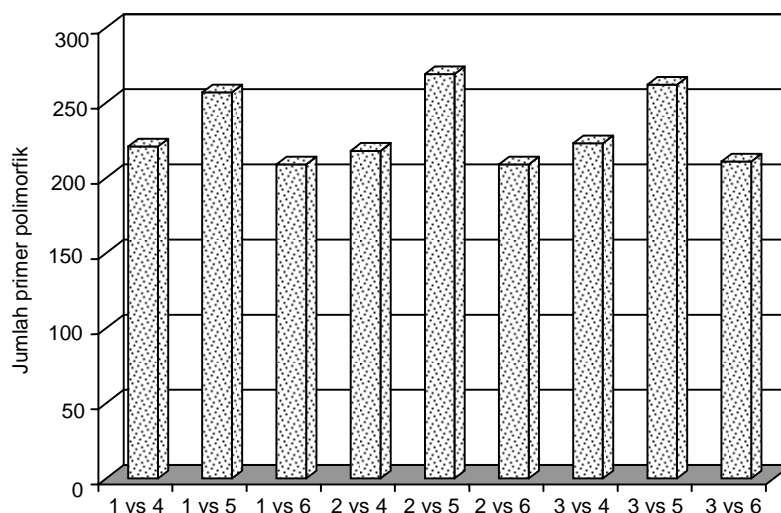


Gambar 2. Hasil amplifikasi 6 tetua menggunakan primer-primer mikrosatelit untuk seleksi *background* yang dipisahkan menggunakan gel poliakrilamid 5% (Hasil PCR hanya bisa di-load dua kali dengan selisih tiga lubang pada load kedua). a = Dodokan, b = Situ Bagendit, c = Batur, d = Kasalath, e = NIL-C443, f = K36-5-1-1, 1 = RM241, 2 = RM17, 3 = RM22, 4 = RM25, 5 = RM49, 6 = RM60, 7 = RM70, 8 = RM124, 9 = RM162, 10 = RM169, 11 = RM172, 12 = RM223, 13 = RM178, 14 = RM210, 15 = RM395, 16 = RM204, 17 = RM30, 18 = RM194, 19 = RM55, 20 = RM256, 21 = RM175, 22 = RM334, 23 = RM245, 24 = RM169, 25 = RM13, 26 = RM44, 27 = RM291, 28 = RM52, 29 = RM146, 30 = RM32, 31 = RM314, 32 = RM170.

Tabel 3. Hasil tabulasi polimorfisme pada 9 kombinasi persilangan dengan menggunakan 489 primer mikrosatelit untuk seleksi *background*.

Kromosom	Jumlah pita polimorfik dan monomorfis masing-masing persilangan																		Jumlah Primer yang digunakan tiap kromosom
	1 vs 4		1 vs 5		1 vs 6		2 vs 4		2 vs 5		2 vs 6		3 vs 4		3 vs 5		3 vs 6		
	Poli	Mono	Poli	Mono	Poli	Mono	Poli	Mono	Poli	Mono	Poli	Mono	Poli	Mono	Poli	Mono	Poli	Mono	
Kromosom 1	31	31	27	35	28	34	30	32	28	34	27	35	31	31	29	33	27	35	62
Kromosom 2	23	27	25	25	22	28	23	27	29	21	25	25	24	26	31	19	27	23	50
Kromosom 3	23	32	30	25	29	26	25	30	31	24	29	26	28	27	23	32	26	29	55
Kromosom 4	15	22	14	23	10	27	14	23	16	21	11	26	13	24	13	24	13	24	37
Kromosom 5	14	27	22	19	16	25	13	28	20	21	10	31	14	27	21	20	9	32	41
Kromosom 6	29	26	29	26	25	30	26	29	32	23	21	34	22	33	28	27	23	32	55
Kromosom 7	13	32	24	21	18	27	15	30	26	19	17	28	14	31	27	18	20	25	45
Kromosom 8	21	19	22	18	13	27	19	21	23	17	17	23	21	19	22	18	12	28	40
Kromosom 9	16	16	21	11	21	11	18	14	21	11	19	13	20	12	24	8	21	11	32
Kromosom 10	17	5	17	5	13	9	14	8	17	5	14	8	16	6	17	5	14	8	22
Kromosom 11	13	16	17	12	8	11	14	15	17	12	12	17	12	17	17	12	14	15	29
Kromosom 12	6	15	9	12	6	15	7	14	9	12	7	14	8	13	10	11	5	16	21
Jumlah	221	268	257	232	209	270	218	271	269	220	209	280	223	266	262	227	211	278	489
Rata-rata	18,42	22,33	21,42	19,33	17,42	22,5	18,17	22,58	22,42	18,33	17,42	23,33	18,58	22,17	21,83	18,92	17,58	23,17	40,75

1 = Dodokan, 2 = Situ Bagendit, 3 = Batur, 4 = Kasalath, 5 = NIL-C443, 6 = K36-5-1-1.



1 = Dodokan, 2 = Situ Bagendit, 3 = Batur, 4 = Kasalath, 5 = NIL-C443, 6 = K36-5-1-1.

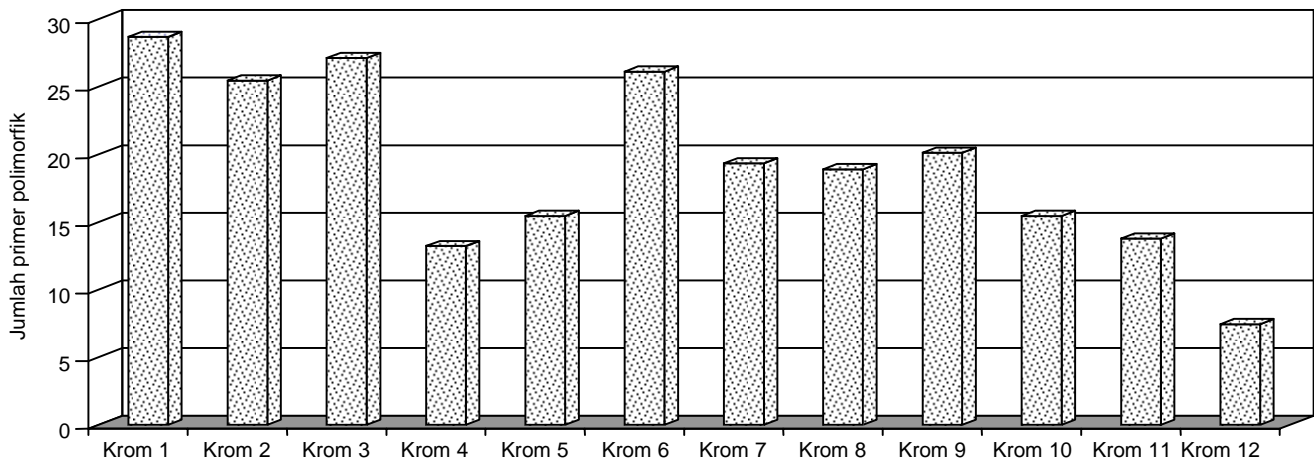
Gambar 3. Perbandingan jumlah primer polimorfik pada setiap kombinasi dari 9 persilangan.

dapatkan pada persilangan dengan NIL-C443 (Dodokan, Situ Bagendit, Batur vs NIL-C443). Hal ini disebabkan perbedaan susunan genom yang menyolok antara NIL-C443 dengan ketiga varietas unggul tersebut. NIL-C443 merupakan padi Nipponbare (japonica) yang disilangkan dengan Kasalath (indica) dengan metode silang balik (BC_5), sehingga sebagian besar genom NIL-C443 merupakan padi japonica. Adanya perbedaan genetik di antara padi indica dan japonica juga telah dibuktikan oleh Chakravarthi dan Naravaneni (2006), bahkan terdapat pula perbedaan susunan genom kloroplasnya (Garris *et al.* 2005), walaupun ada beberapa lokus yang memiliki kesamaan susunan genetiknya.

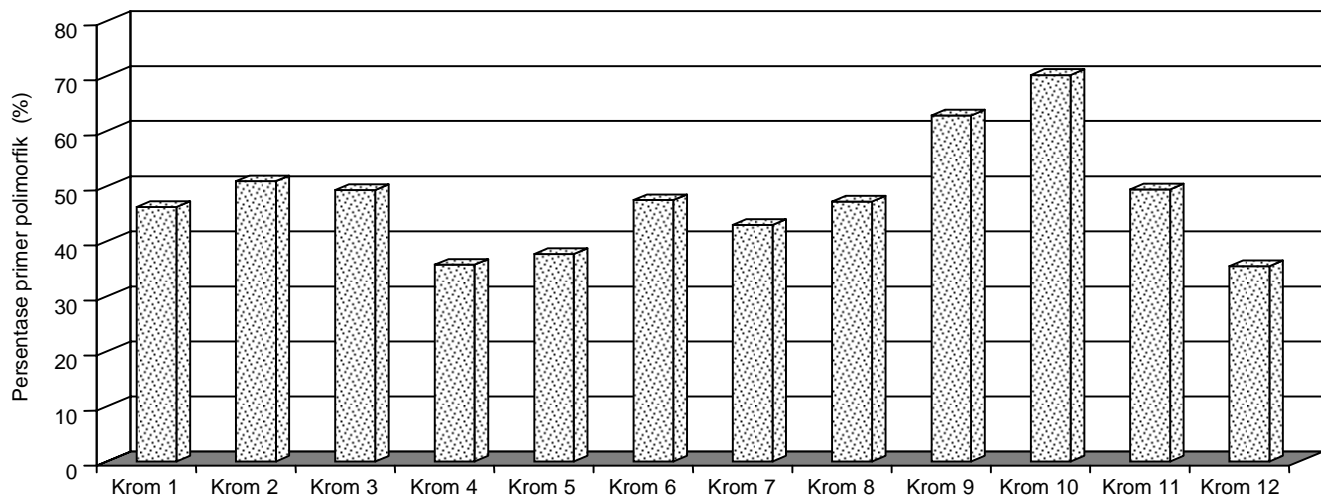
Rata-rata jumlah primer mikrosatelit yang polimorfis tiap kromosom berbeda-beda. Rata-rata terting-

gi terdapat pada kromosom 1 sehingga jumlah pilihan primer mikrosatelit yang digunakan lebih banyak dibandingkan kromosom lain. Kromosom 12 memiliki jumlah primer polimorfik yang paling sedikit (di bawah 10), sehingga memerlukan penambahan primer baru yang lebih banyak lagi, apalagi untuk mendapatkan polimorfik di antara sesama tetua jenis indica juga rendah. Primer-primer yang hendak digunakan seharusnya berjarak dekat, paling tidak 10 cM antarprimer untuk mengurangi efek *linkage drag* yang biasanya timbul ketika seleksi hasil persilangan.

Pemilihan primer yang polimorfik untuk seleksi *background* sangat penting dilakukan karena kondisi kromosom progeni hasil persilangan harus dikembali-



Gambar 4. Rata-rata jumlah primer polimorfik pada setiap kromosom dari 9 persilangan.



Gambar 5. Rata-rata persentase primer polimorfik pada setiap kromosom dari 9 persilangan.

kan semaksimal mungkin mendekati genom tetua betina, yakni varietas unggul Indonesia. Semakin banyak primer polimorfik yang dihasilkan akan semakin besar peluang pengembalian genom ke tetua penerima. Namun, peningkatan jumlah primer yang dianalisis juga tidak menjamin peningkatan jumlah primer polimorfik yang dihasilkan. Berdasarkan perhitungan persentase polimorfik (Gambar 5), hasil terendah dicapai oleh kromosom 12 (35%) dan tertinggi kromosom 10 (70%). Jadi peluang untuk mendapatkan primer polimorfik lebih besar pada kromosom 10 dibandingkan dengan primer pada kromosom 12. Berdasarkan hasil tabulasi masih diperlukan penambahan primer mikrosatelit pada beberapa kromosom seperti kromosom 4, 5, dan 12.

KESIMPULAN

Marka mikrosatelit yang dapat digunakan untuk seleksi *foreground* dan *recombinant* berjumlah enam primer, yakni RM 277, RM511, RM28102, SSR3, RM1261, dan RM519, dengan tiga primer yang berbeda untuk masing-masing persilangan, yakni Dodokan vs Kasalath (RM277, SSR3, RM519), Dodokan vs NIL-C443 (RM277, SSR3, RM519), Dodokan vs K36-5-1-1 (RM277, SSR3, RM519), Situ Bagendit vs Kasalath (RM28102, SSR3, RM519), Situ Bagendit vs NIL-C443 (RM28102, SSR3, RM519), Situ Bagendit vs K36-5-1-1 (RM511, SSR3, RM519), Batur vs Kasalath (RM277, RM1261, RM519), Batur vs NIL-C443 (RM277, RM1261, RM519), dan Batur vs K36-5-1-1 (RM28102, SSR3)

Marka mikrosatelit polimorfik yang dapat digunakan untuk seleksi *background* paling banyak terdapat

pada kromosom 1 dan 2, sedangkan paling sedikit pada kromosom 12. Penambahan jumlah primer masih diperlukan terutama untuk identifikasi tingkat polimorfisme pada kromosom 4, 5, dan 12.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kegiatan ini merupakan salah satu penelitian yang dibiayai oleh proyek *Generation Challenge Program*, Subprogram 2, yang berjudul: "*Revitalizing Marginal Lands: Discovery of genes for tolerance of saline and phosphorus deficient soils to enhance and sustain productivity*". Ucapan terima kasih disampaikan kepada Dr. Abdelbagi M. Ismail (*Senior Scientist* IRRI, dan PI proyek) yang telah memberikan padi Kasalath, NIL-C443, dan K36-5-1-1 sebagai sumber gen ketahanan terhadap defisiensi fosfor.

DAFTAR PUSTAKA

- Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. 2002.** Deskripsi Varietas Unggul Baru Padi. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. 56 hlm.
- Badan Pusat Statistik. 2004.** Statistik Indonesia. Badan Pusat Statistik. Jakarta.
- Chakravarthil, B.K. and R. Naravaneni. 2006.** SSR marker based DNA fingerprinting and diversity study in rice (*Oryza sativa* L.). *African J. Biotechnol.* 5(9):684-688.
- Collard, B.C.Y., M.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 concepts. *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.
- Frisch, M., M. Bohn, and A.E. Melchinger. 1999.** Minimum sample size and optimal positioning of flanking markers in marker-assisted backcrossing for transfer of a target gene. *Crop Sci.* 39:967-975.
- Garris, A.J., T.H. Tai, J. Coburn, S. Kresovich, and S. McCouch. 2005.** Genetic structure and diversity in *Oryza sativa* L. *Genetics* 169:1631-1638.
- Ismail, A.M., K.A. Gatduta, S. Heuer, X. Lu, and M. Wissuwa. 2005.** Phosphorus deficiency tolerance in rice genetic and molecular bases and implications for breeding. Annual meeting of project "Revitalizing marginal lands: Discovery of genes for tolerance of saline and phosphorus deficient soils to enhance and sustain productivity". *Un published*.
- Pusat Penelitian dan Pengembangan Pertanian Tanaman Pangan. 1993.** Deskripsi Varietas Unggul Padi 1943-1992. Pusat Penelitian dan Pengembangan Pertanian Tanaman Pangan. 123 hlm.
- Radin, J.W. and M.P. Eidenbock. 1984.** Hydraulic conductance as a factor limiting leaf expansion of phosphorus-deficient cotton plants. *Plant Physiol.* 75:372-377.
- Ribaut, J.M. and D. Hoisington. 1998.** Marker-assisted selection: New tools and strategies. *Mol. Breed.* 3:236-239.
- Temnykh, S., W.D. Park, N. Ayres, S. Cartinhour, N. Hanck, L. Lipovich, Y.G. Cho, T. Ishii, and S.R. McCouch. 2000.** Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 100:697-712.
- 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.
- Wissuwa, M. and N. Ae. 2001.** Further characterization of two QTLs that increase phosphorus uptake of rice (*Oryza sativa* L.) under phosphorus deficiency. *Plant Soil* 237:275-286.
- 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.
- Yi, K., Z. Wu, J. Zhou, L. Du, L. Guo, Y. Wu, and P. Wu. 2005.** OsPTF1, a novel transcription factor involved in tolerance to phosphate-starvation in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Physiol.* 138:2087-2096.
-