

Pencarian Alel untuk Identifikasi Gen Ketahanan Penyakit Hawar Daun Bakteri, *Xa7* pada Plasma Nutfah Padi Lokal Indonesia

Dwinita W. Utami¹, Endang M. Septiningsih², Triny S. Kadir³, Fatimah¹, dan Siti Yuriyah¹

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

²International Rice Research Institute, DAPO Box 7777, Metro Manila, Philippines

³Balai Besar Penelitian Tanaman Padi, Jl. Raya 9, Sukamandi-Subang 41256

ABSTRACT

Allele Mining of Bacterial Blight Resistance Gene, *Xa7* on Indonesian Local Rice Germplasm. Dwinita W. Utami, Endang M. Septiningsih, Triny S. Kadir, Fatimah, and Siti Yuriyah. The abundance of novel genetic variation existing in germplasm collections is the foundation for variety improvement in plant breeding program. Nevertheless, studies on Indonesian genetic diversity rice germplasm using molecular markers are still poorly. Recent advances in utilizing of simple sequence repeat (SSR) in QTL mapping and whole rice genome sequences were positive support on genetic diversity of rice germplasm research. Based on these advance technology, we developed the research to discover new alleles at important gene loci that can be used for rice improvement. This approach is recognized as *allele mining* technology. On this study the target genes for *allele mining* research is the resistance gene for bacterial leaf blight pathogen, *Xa7*. This point was introduced by identify the genetic diversity of 96 accessions Indonesian local rice germplasm. The *Xa7* *allele mining* was done by SNP (single nucleotide polymorphism) designing primers based on DNA sequence around the gene target. The significant LD map was detected by association mapping between phenotype and SNP genotyping data of the selected germplasm which having superior performance on BLB resistance and representing on genetic diversity clustering. The results shown that *Xa7* allele variation were found in *Parekaligolara* (*Indica*, 15141), and *Gajah Mada* (*Indica*, 5856), which resistant to BLB races IV and VIII on generative stage and field condition. The significant *Xa7*-SNP8 and *Xa7*-SNP11 markers were associating with the LD map position of *Xa7* gene on 28, 05-28,1Mb of chromosome 6 in rice genome.

Key words: *Xa7*, *allele mining*, Indonesian rice local.

PENDAHULUAN

Hakekat dari kegiatan pemuliaan tanaman yang telah terjadi selama ratusan tahun yang lalu, pada dasarnya adalah memilih alel-alel yang menguntungkan pada lokus-lokus yang penting. Hal ini dilakukan secara tidak langsung, yaitu dengan memilih tanaman berpenampilan terbaik berdasarkan fenotipnya. Dasar dari kegiatan pemuliaan tanaman ini adalah me-

limpahnya keragaman genetik yang tersimpan dalam koleksi plasma nutfah di seluruh dunia. Kekayaan keragaman genetik ini merupakan bahan dasar untuk memperbaiki berbagai karakter tanaman, khususnya pada tanaman penting seperti padi. Kesulitan yang dihadapi dalam hal ini adalah bagaimana alel-alel menguntungkan yang cukup langka itu dapat ditemukan secara efisien di antara ribuan koleksi aksesori padi. Masalah ini menjadi lebih terasa ketika seleksi berdasarkan fenotipe saja sering tidak dapat digunakan untuk menemukan alel "terbaik" tersebut. Dengan pendekatan biologi molekuler, yaitu melalui teknologi pemetaan gen/*Quantitative Trait Loci* (QTL) diketahui bahwa alel-alel yang menguntungkan tersebut sering "tersembunyi" dan hanya dapat dideteksi dengan marka molekuler yang dapat secara langsung terpaud dengan alel menguntungkan yang diinginkan (Tanksley dan McCouch 1997).

Perkembangan teknologi genomik, yang meliputi: pemetaan QTL, penemuan gen (*gene discovery*), dan tersedianya sekuen genom secara lengkap telah memungkinkan untuk mencari alel-alel yang berguna dalam koleksi plasma nutfah padi untuk perbaikan varietas melalui suatu strategi yang disebut dengan *allele mining* (pencarian alel). Secara umum, istilah ini mengacu pada tujuan untuk mendapatkan alel-alel yang menguntungkan dalam koleksi plasma nutfah menggunakan teknologi molekuler terkini. Definisi yang lebih spesifik mengacu pada proses untuk mendesain primer-primer untuk *Polymerase Chain Reaction* (PCR) berdasarkan sekuen DNA untuk suatu gen kandidat pada suatu varietas dari koleksi plasma nutfah yang ada dan bahkan juga dari kerabat liarnya. Alel-alel ini disekuen dan kemudian dibandingkan untuk menentukan perbedaan polimorfismenya. Dengan proses ini, berbagai alel dari suatu lokus dapat diisolasi (Latha *et al.* 2004, Rangan *et al.* 1999). Namun apabila gen kandidat belum tersedia, pendekatan lain harus ditempuh. Salah satu alternatifnya adalah menggunakan pendekatan pemetaan LD (*linkage disequilibrium*) untuk mendapatkan daerah genom yang sempit yang mengandung alel yang diinginkan (Morton 2005). Ber-

lainan dengan pemetaan QTL, yang menggunakan populasi yang dikembangkan dari dua tetua saja, pemetaan LD dapat menggunakan secara langsung beberapa sampai ratusan aksesori yang berbeda untuk membuat peta tanpa harus melakukan persilangan (Flint-Garcia *et al.* 2003). Salah satu keunggulan dari teknologi pencarian alel (*allele mining*) ini, yaitu kita dapat memilih daerah genom yang relatif kecil dengan lebih akurat menggunakan marker yang berpaut ketat dengan sifat penting yang diinginkan, sehingga dapat mengurangi atau bahkan meniadakan segregasi yang tidak diinginkan (*negative linkage drag*). Di samping itu, dengan teknologi ini dimungkinkan untuk memilih secara langsung alel yang kita inginkan pada suatu lokus, melalui proses yang disebut dengan pemilihan alel secara langsung (*direct allele selection*) (<http://smallgrains.cit.cornell.edu/about.html>). Analisis gen kandidat dapat dilakukan dengan DNA *sequencing* dan *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) *genotyping*. Marka SNP mempunyai keunggulan dalam mendeteksi ada tidaknya polimorfisme dibandingkan dengan marka yang lain, karena marka ini dapat mendeteksi perbedaan hingga 1 nukleotida saja (Feltus *et al.* 2004). Hal ini sangat penting karena yang menjadi obyek penelitian dalam pencarian alel adalah daerah genom yang sudah sangat kecil, yaitu QTL atau gen. Dengan demikian perbedaan terkecil dalam QTL atau gen yang memberikan kontribusi yang nyata pada fenotipe dapat terdeteksi.

Penyakit hawar daun bakteri (HDB) disebabkan oleh bakteri patogen *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*, merupakan salah satu penyakit utama pada pertanian padi dan menyebabkan kehilangan hasil yang cukup signifikan setiap tahunnya, yaitu mencapai 15-25% (Yamamoto *et al.* 1977) dan bahkan perkembangan terakhir dapat mencapai 30-40% (Triny *et al.* 2007). Beberapa hasil pengujian pada tahun-tahun sebelumnya menunjukkan bahwa gen ketahanan terhadap penyakit HDB *Xa7*, belum "terpatahkan" oleh beberapa strain HDB yang dominan di lokasi endemik penyakit ini di Indonesia. Oleh karena itu gen *Xa7* potensial sebagai kandidat gen pengendali penyakit HDB di Indonesia, sehingga pencarian alel gen *Xa7* ini pada sejumlah koleksi plasma nutfah padi lokal Indonesia perlu dilakukan untuk mendapatkan sumber donor gen ini. Padi lokal adalah salah satu sumber genetik padi yang saat ini sudah terdesak oleh varietas unggul (Crowder 1997). Untuk itu perlu dilakukan eksploitasi plasma nutfah padi lokal yang selama ini masih banyak yang belum terkarakterisasi (Silitonga *et al.* 1995).

Tujuan dari penelitian ini adalah mengidentifikasi alel gen *Xa7* pada beberapa aksesori plasma nutfah padi

lokal Indonesia dengan pendekatan *allele mining* menggunakan marka molekuler SNP yang spesifik untuk *Xa7*.

BAHAN DAN METODE

Material Genetik dan Evaluasi Tingkat Ketahanan Hawar Daun Bakteri

Material genetik yang digunakan adalah 96 nomor aksesori plasma nutfah padi lokal yang memiliki keragaman genetik berdasarkan 30 marka SSR. Beberapa aksesori tersebut termasuk subspecies Indica dan Tropikal Japonica (Utami *et al.* 2006). Total 96 aksesori plasma nutfah tersebut tercantum pada Tabel 1. Sedangkan Ras/isolat HDB yang digunakan dalam penelitian ini adalah tiga ras HDB yang dominan di beberapa lokasi endemik penyakit ini di lapang, di Indonesia, yaitu RasIII, RasIV, dan RasVIII dan satu isolat yang secara relatif bersifat spesifik (*correspond*) untuk gen *Xa7* yang belum diidentifikasi rasnya (Utami *et al.* 2007).

Evaluasi tingkat ketahanan terhadap penyakit HDB dari 96 nomor aksesori plasma nutfah dilakukan di rumah kaca dan lapang, dengan menggunakan tiga ras dan satu isolat HDB.

Pengujian dan penentuan tingkat ketahanan terhadap penyakit HDB di rumah kaca dilakukan dengan metode inokulasi penggungtingan terhadap 96 nomor aksesori plasma nutfah yang masing-masing ditanam 5-10 tanaman sebagai ulangan. Sedangkan pengujian di lapang juga dilakukan dengan metode inokulasi penggungtingan terhadap 5-10 tanaman di 4 titik diagonal dan 1 titik di tengah di setiap plot pengujian masing-masing nomor aksesori. Skoring tingkat serangan dilakukan berdasarkan skala intensitas serangan dan skala skor, sesuai dengan SES IRRI (1996). Data hasil pengujian fenotipe selanjutnya dianalisis statistik dengan metode Analisis Gerombol (*Principal Component Analysis/PCA*). Analisis ini dilakukan untuk mengelompokkan data berdasarkan kemiripan sifat tingkat ketahanan ke-96 nomor aksesori plasma nutfah yang diuji berdasarkan analisis perbaikan jarak dengan metode pautan rata-rata (*Average Linkage*) (Karson 1982). Tujuan dari analisis PCA ini adalah untuk memperoleh subsampel representatif yang meliputi aksesori-aksesori yang bersifat superior tahan ataupun yang bersifat peka (sebagai kontrol negatif untuk alel *Xa7*). Subsampel aksesori-aksesori plasma nutfah yang terpilih selanjutnya digunakan dalam analisis *Xa7*-LD dan *Xa7*-SNP *genotyping*.

Tabel 1. Sembilan puluh enam aksesi plasma nutfah padi lokal yang digunakan untuk evaluasi tingkat ketahanan penyakit HDB dan identifikasi alel *Xa7*.

| No. | Plasma nutfah | No. reg | Subspesies | No. | Plasma nutfah | No. reg | Subspesies |
|-----|---------------------|---------|------------|-----|--------------------|---------|--------------------|
| 1. | Hawara Bunar | 19285 | Indica | 50. | Pulut Namang | 21256 | Indica |
| 2. | P. Timai | 19974 | Indica | 51. | Rumbay | 20968 | Indica |
| 3. | Mashuri | - | Indica | 52. | Pae Gudo | 6332 | Indica |
| 4. | Getik | 5643 | Indica | 53. | Sampang | 5737 | Indica |
| 5. | Menta | 5758 | Indica | 54. | Mendalet | 5742 | Indica |
| 6. | Gajah Mada | 5856 | Indica | 55. | Manggar | 5744 | Indica |
| 7. | Pudak Kuning | 6204 | Indica | 56. | Ganefo | 5648 | Indica |
| 8. | Djedah | 6601 | Indica | 57. | P. ketan Alay | C82 | Indica |
| 9. | Tjere Bandung | 6858 | Indica | 58. | P. Belanda | C98 | Indica |
| 10. | Komas a | 6877A | Indica | 59. | P. A'gan | C116 | Indica |
| 11. | Utri Deli | 5730 | Indica | 60. | P. Ba'an | C119 | Indica |
| 12. | Markuti | 5754 | Indica | 61. | P. Jata | C159 | Indica |
| 13. | Mutu | 5758 | Indica | 62. | Sibau | 19780 | Trop-Jap |
| 14. | Gemas | 7072 | Indica | 63. | Padi Jawa | 19732 | Trop-Jap |
| 15. | Kruet Sintang | 8146 | Indica | 64. | Melaya | 19736 | Trop-Jap |
| 16. | Rias | 8244 | Indica | 65. | Semirit | 19839 | Trop-Jap |
| 17. | Suling | 21290 | Indica | 66. | Gundil | 12348 | Trop-Jap |
| 18. | Sirentek | 8194 | Indica | 67. | Pare Lambeun | 15153 | Trop-Jap |
| 19. | Gondok | 12571 | Indica | 68. | Ciganjur | 21177 | Trop-Jap |
| 20. | Buban | 13152 | Indica | 69. | Pandan | 21242 | Trop-Jap |
| 21. | Bulang | 13160 | Indica | 70. | Bumbuy Inih | 21244 | Trop-Jap |
| 22. | Kartuna | 13270 | Indica | 71. | Pulut Timuru | 21248 | Trop-Jap |
| 23. | Padi Lungkai | 14716 | Indica | 72. | Dupa | - | Trop-Jap |
| 24. | Ileuy | 14785 | Indica | 73. | P. Hitam | C2 | Trop-Jap |
| 25. | Jerai | 14964 | Indica | 74. | P. Pulut Saleng | C6 | Trop-Jap |
| 26. | Nippon | 14997 | Indica | 75. | P. Pulut Longbanga | C13 | Trop-Jap |
| 27. | Parekaligolara | 1514 | Indica | 76. | P. Ketan Merah | C18 | Trop-Jap |
| 28. | Padi Banten | 15195 | Indica | 77. | P. Puti | C20 | Trop-Jap |
| 29. | IR54 | 21165 | Indica | 78. | P. Timai | C28 | Trop-Jap |
| 30. | Batanghari | 21174 | Indica | 79. | P. Imban | C37 | Trop-Jap |
| 31. | Indragiri | 21175 | Indica | 80. | P. Atok | C41 | Trop-Jap |
| 32. | Lima Bulan Kamang | 12399 | Indica | 81. | Plong Liyo | C47 | Trop-Jap |
| 33. | Padi Belanak K | 12674 | Indica | 82. | P. Mayun | C50 | Trop-Jap |
| 34. | Puteh Gaca | 12992 | Indica | 83. | P. Pulut Jangan | C60 | Trop-Jap |
| 35. | Teratai | 13102 | Indica | 84. | Pubek Bala | C68 | Trop-Jap |
| 36. | Pulut Pagae | 13163 | Indica | 85. | P. ketan Sit | C75 | Trop-Jap |
| 37. | Inceklabu | 13194 | Indica | 86. | P. Sekrit | C107 | Trop-Jap |
| 38. | Kuntu Ameh | 13222 | Indica | 87. | P. Krayan | C109 | Trop-Jap |
| 39. | Sirandah Hitam Ekor | 13232 | Indica | 88. | Pbat Kanjat | C122 | Trop-Jap |
| 40. | Lantiak | 13236 | Indica | 89. | P. Kelawit | C126 | Trop-Jap |
| 41. | Padi Tinggi | 13253 | Indica | 90. | P. Kendanggang | C131 | Trop-Jap |
| 42. | Bintang Ladang | 13284 | Indica | 91. | P. Pui | C135 | Trop-Jap |
| 43. | Ketupat | 14657 | Indica | 92. | P. Seribu | C142 | Trop-Jap |
| 44. | Condong | 14732 | Indica | 93. | P. Kley | C146 | Trop-Jap |
| 45. | Arias Halus | 14749 | Indica | 94. | P. Telengusan | C150 | Trop-Jap |
| 46. | Sipulut Merah A | 14834A | Indica | 95. | P. Siam | C166 | Trop-Jap |
| 47. | Nuri Bura | 14895 | Indica | 96. | P. Libang | C182 | Trop-Jap |
| 48. | Pare Bakatokaka | 15138 | Indica | 97. | TN1 | - | Kontrol peka |
| 49. | Pare Mangata | 15148 | Indica | 98. | IRBB7 | - | Kontrol <i>Xa7</i> |

Disain Primer *Xa7*-LD dan *Xa7*-SNP Berdasarkan Analisis Gen Kandidat dan DNA Sequencing

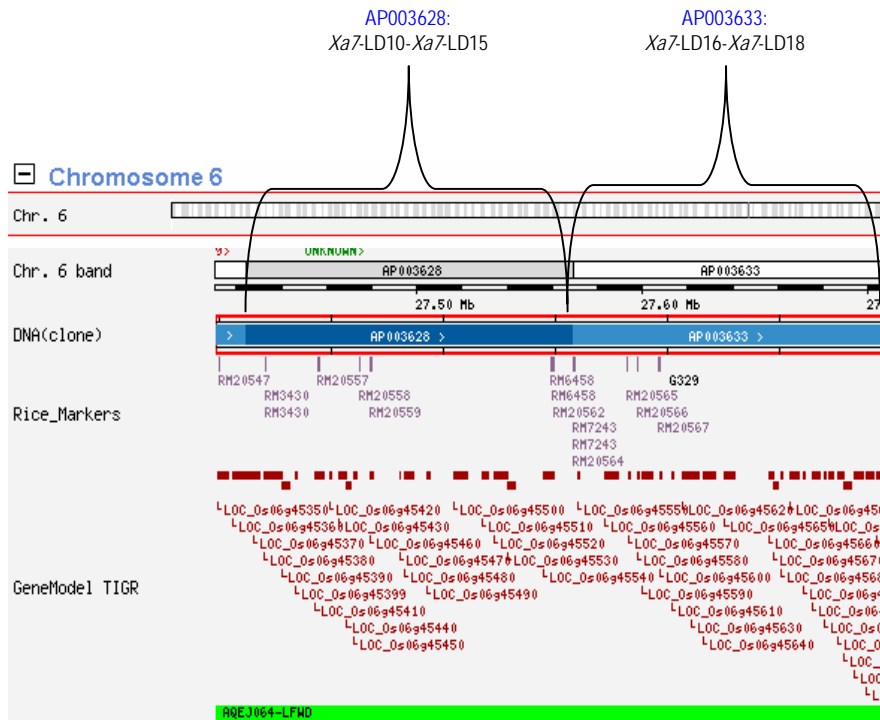
Target dari penelitian *allele mining* ini adalah alel dari gen ketahanan HDB, *Xa7*. Gen ketahanan ini pada genom padi terdapat di kromosom 6 dengan ukuran ~1.200 kb. Untuk mengidentifikasi gen sebesar ini maka didisain 60 pasang PCR primer, yang ditandai dengan nama primer *Xa7*-LD. Primer-primer ini tersebar pada beberapa *contig* yang menjadi target, seperti terlihat pada Gambar 1. Primer-primer *Xa7*-LD tersebar

dari *contig* AP004744 (pada posisi genom: 27.221.015-27.221.432 bp) sampai dengan *contig* AP004797 (pada posisi genom: 28.409.251-28.409.822 bp). Disain primer dilakukan berdasarkan *overlapping* sekuen sepanjang 800 bp untuk setiap kali sekuen. Hasil sekuen dengan primer *Xa7*-LD selanjutnya dilakukan *multiple alignment* ke *rice genome database* (subspesies *Japonica*: <http://rgp.dna.affrc.go.jp> dan subspesies *Indica*: <http://www.genomics.org.cn>).

Setiap hasil sekuen dari masing-masing produk PCR *Xa7*-LD yang diperoleh, selanjutnya digunakan

untuk mengidentifikasi adanya situs SNP, yaitu adanya polimorfisme 1 basa nukleotida antara genom Indica dan genom Japonica. Berdasarkan situs SNP yang diperoleh selanjutnya didisain primer SNP, yang ditandai dengan nama *Xa7*-SNP dengan kriteria: primer yang berakhir satu basa sebelum lokasi SNP yang diminati. Target primer *Xa7*-SNP adalah produk PCR sebesar 700-800 pb (pasang basa), di setiap 20-30 kb daerah

genom di sekitar dan dalam lokus gen-gen *Xa7*. Primer *Xa7*-SNP ini selanjutnya digunakan untuk kegiatan *Xa7*-SNP *genotyping* pada aksesori-aksesori plasma nutfah terpilih menggunakan Beckman SNP primer extension kit. Total primer *Xa7*-SNP yang digunakan adalah 12 primer yang tersebar di beberapa *contig* sekitar gen target *Xa7* (Tabel 2).



Gambar 1. Beberapa *contig* target primer *Xa7*-LD, yaitu AP003628 (27.413.412-27.487.479) didisain primer: *Xa7*-LD10-15, AP003633 (27.413.804-27.541.675) didisain primer: *Xa7*-LD16-18; AP003635 (27.633.052-27.712.398) didisain primer: *Xa7*-LD19-22, AP005192 (27.734.724-27.781.279) didisain primer: *Xa7*-LD28.

Tabel 2. Dua belas primer *Xa7*-SNP yang didisain dan digunakan untuk kegiatan *Xa7*-SNP *genotyping*.

| No. aksesori <i>contig</i> | Lokus TIGR | Primer <i>Xa7</i> -LD | Primer <i>Xa7</i> -SNP | Posisi SNP (bp) | Motif SNP | Panjang (bp) | Deskripsi gen <i>Xa</i> -LD |
|----------------------------|----------------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------|-----------|--------------|--|
| AP004744 | LOC_Os06g45120.1 (TIGR_LOCUS ID) | <i>Xa7</i> -LD3 | <i>Xa7</i> -SNP1 | 746 | C/T | 25 | V-type ATPase, A subunit |
| AP003633 | LOC_Os06g45560.1 (TIGR_LOCUS ID) | <i>Xa7</i> -LD16 | <i>Xa7</i> -SNP2 | 664 | G/A | 30 | hypothetical protein |
| AP003633 | LOC_Os06g45590.1 (TIGR_LOCUS ID) | <i>Xa7</i> -LD17 | <i>Xa7</i> -SNP3 | 100 | G/A | 35 | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, type I, putative |
| AP003628 | LOC_Os06g45480.1 (TIGR_LOCUS ID) | <i>Xa7</i> -LD13 | <i>Xa7</i> -SNP4 | 582 | C/T | 40 | hyuC-like protein [imported]-Arabidopsis thaliana |
| AP006454 | LOC_Os06g46120.1 (TIGR_LOCUS ID) | <i>Xa7</i> -LD34 | <i>Xa7</i> -SNP5 | 633 | G/T | 45 | polyubiquitin, putative |
| AP003628 | LOC_Os06g45500.1 (TIGR_LOCUS ID) | <i>Xa7</i> -LD14 | <i>Xa7</i> -SNP6 | 669 | T/C | 50 | copper-translocating P-type ATPase, putative |
| AP003628 | LOC_Os06g45510.1 (TIGR_LOCUS ID) | <i>Xa7</i> -LD15 | <i>Xa7</i> -SNP7 | 418 | G/A | 55 | thioredoxin, putative |
| AP004989 | LOC_Os06g46330.1 (TIGR_LOCUS ID) | <i>Xa7</i> -LD42 | <i>Xa7</i> -SNP8 | 342 | C/T | 60 | Protein kinase domain, putative |
| AP003728 | LOC_Os06g46370.1 (TIGR_LOCUS ID) | <i>Xa7</i> -LD43 | <i>Xa7</i> -SNP9 | 583 | C/T | 65 | 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, putative |
| AP003728 | LOC_Os06g46380.1 (TIGR_LOCUS ID) | <i>Xa7</i> -LD44 | <i>Xa7</i> -SNP10 | 709 | A/T | 70 | Protein prenyltransferase alpha subunit repeat, putative |
| AP004989 | LOC_Os06g46310.1 (TIGR_LOCUS ID) | <i>Xa7</i> -LD40 | <i>Xa7</i> -SNP11 | 705 | T/C | 75 | metal transporter nramp1 (atramp1) |
| AP004744 | LOC_Os06g45350.1 (TIGR_LOCUS ID) | <i>Xa7</i> -LD9 | <i>Xa7</i> -SNP12 | 309 | A/G | 80 | expressed protein |

***Xa7*-SNP Genotyping pada Akses-Akresi Terseleksi**

Xa7-SNP genotyping dilakukan pada 22 aksesi plasma nutfah yang bersifat superior tahan berdasarkan analisis statistik untuk data hasil uji fenotipe di rumah kaca dan lapang ditambah dua galur kontrol, yaitu TN1 sebagai galur kontrol peka dan IRBB7 sebagai galur isogenik kontrol untuk gen *Xa7*. DNA dari plasma nutfah tersebut diamplifikasi dengan primer *Xa7*-LD, dengan komposisi PCR: 2 µl 10x bufer PCR; 0,6 µl MgCl₂; 0,6 µl dNTP mix (10 mM); 1,2 µl *Xa7*-LD primer (F+R) (5 µM); 0,15 µl *taq Polymerase*; 2 µl DNA template (10 ng/µl). Program PCR yang digunakan sebagai berikut: 94°C, 2 menit untuk denaturasi awal; 94°C, 45 detik untuk denaturasi; 55°C, 45 detik untuk *annealing*; 68°C, 2 menit untuk proses pemanjangan (*extension*) dan total siklus yang digunakan 29 siklus, proses pemanjangan terakhir pada 72°C selama 7 menit. Setelah dilakukan purifikasi dengan enzim exonuclease I dan shirmp alkaline phosphatase (Exo/SAP), produk *Xa7*-LD yang diperoleh selanjutnya diamplifikasi dengan primer *Xa7*-SNP menggunakan *Beckman SNP primer extension kit*, untuk menandai posisi targer SNP di sekitar gen *Xa7*. Program PCR untuk *Xa7*-SNP adalah sebagai berikut: 96°C, 3 menit untuk denaturasi awal; 94°C, 20°C proses denaturasi; 50°C, 11 detik untuk *annealing*; total siklus sebanyak 25 siklus dan proses pemanjangan akhir dilakukan pada 72°C selama 30 detik. Hasil dari proses SNP *genotyping* selanjutnya di-*running* di mesin *genetic analyzer* CEQ8000 setelah dilakukan purifikasi SAP.

Uji Gabungan (*Association Test*)

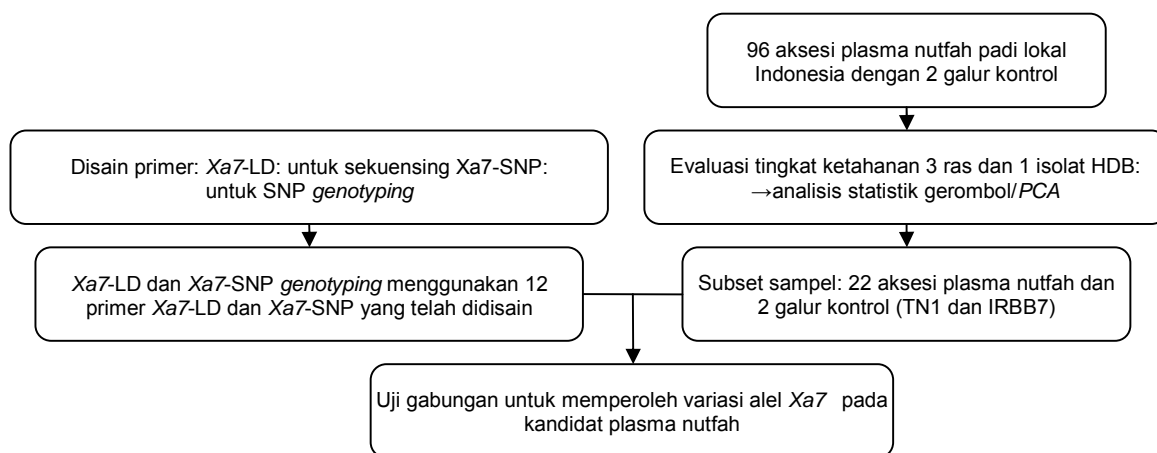
Signifikansi korelasi antara keberadaan polimorfisme SNP dengan data fenotipe yang diperoleh di rumah kaca dan lapang untuk sifat ketahanan terhadap

penyakit HDB dianalisis dengan Uji Gabungan (*Association Test*) menggunakan *software Tassel2_9_4i*. Dari uji gabungan akan terdeteksi variasi alel gen *Xa7* yang secara signifikan berkontribusi dalam membentuk keragaman sifat ketahanan terhadap ras dan isolat HDB uji. Secara garis besar tahapan analisis yang dilakukan dalam penelitian ini seperti pada diagram alur pada Gambar 2.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengujian Fenotipe Tingkat Ketahanan terhadap Empat Isolat/Ras HDB

Data hasil pengujian fenotipe tingkat ketahanan terhadap tiga ras dominan (Ras III, IV, dan VIII) dan satu isolat yang relatif *correspond* untuk gen *Xa7* menunjukkan adanya keragaman dalam respon tingkat ketahanannya. Keragaman ini terlihat dari hasil analisis gerombol yang dilakukan berdasarkan dengan pemotongan dendrogram kesamaan pada tingkat 76,5%. Karakteristik setiap gerombol diperoleh berdasarkan nilai rata-rata masing-masing peubah yang diamati, yaitu tingkat ketahanan terhadap ras/isolat uji. Berdasarkan hasil analisis ini menunjukkan bahwa pada pengujian di rumah kaca pada fase bibit dan dewasa secara berurutan mengelompok menjadi 7 dan 6 gerombol. Sedangkan berdasarkan hasil pengujian di lapang, 96 aksesi plasma nutfah yang diuji berdasarkan tingkat ketahanannya terhadap penyakit HDB, mengelompok menjadi 9 gerombol (data tidak ditampilkan). Berdasarkan hasil analisis gerombol, selanjutnya dipilih aksesi plasma nutfah yang termasuk dalam gerombol terbaik (bersifat superior tahan) baik pada fase bibit, dewasa ataupun di lapang. Aksesi yang terpilih adalah Parekaligolara, Gajah Mada, Inceklabu, dan Pare Lambeun. Di samping aksesi-aksesi tersebut



Gambar 2. Diagram alur tahapan penelitian pencarian alel gen ketahanan terhadap penyakit HDB, *Xa7*.

beberapa aksesi dengan penampilan terbaik di setiap gerombol yang lain juga dipilih sehingga total aksesi plasma nutfah terpilih sebanyak 22 aksesi ditambah dua galur kontrol, yaitu TN1 sebagai galur kontrol peka terhadap penyakit HDB dan IRBB7 sebagai galur isogenik untuk gen *Xa7*. Secara keseluruhan ke-24 nomor aksesi beserta respon tingkat ketahanannya ditampilkan pada Tabel 3. Hasil pada Tabel 3 menunjukkan bahwa respon tingkat ketahanan terhadap 4 ras/ isolat HDB pada 22 nomor aksesi plasma nutfah padi lokal beserta 2 galur kontrol (TN1 dan IRBB7) menunjukkan adanya respon ketahanan yang bervariasi dari respon sangat tahan (ST) sampai dengan sangat peka (SP). Keragaman respon ketahanan pada sampel material genetik yang digunakan ini penting untuk dipertahankan dalam penentuan subsampel karena untuk menjamin tersedianya semua kemungkinan variasi alel sehingga analisis LD untuk gen target *Xa7* lebih terandal. Di samping itu, Tabel 3 juga menunjukkan bahwa galur kontrol peka TN1 bersifat peka (P) dengan demikian menunjukkan bahwa pengujian di atas telah optimum. Sedangkan tanaman kontrol galur isogenik *Xa7*, IRBB7 menunjukkan respon agak tahan (AT). Respon AT untuk semua isolat ras dan isolat HDB yang digunakan pada galur IRBB7 menunjukkan aktivasi gen *Xa7* yang tidak optimum oleh isolat 93-229. Hal ini karena belum diketahuinya faktor virulensi yang terdapat pada ras-ras dan isolat uji yang digunakan, termasuk

isolat 93-229, sehingga aktivasi spesifik gen *Xa7* belum diperoleh.

Namun demikian ketahanan beberapa aksesi plasma nutfah terpilih menunjukkan respon tahan terhadap ras-ras HDB dominan baik dalam pengujian di rumah kaca ataupun di lapang. Beberapa aksesi ini berpotensi memiliki alel ketahanan terhadap penyakit HDB. Data fenotipe di atas selanjutnya digunakan untuk analisis *Xa7*-SNP *genotyping*.

Xa7-SNP *Genotyping*

Analisis *Xa7*-SNP *genotyping* dilakukan menggunakan 12 primer SNP yang telah didisain di sekitar gen *Xa7* (Tabel 2) pada 22 sampel nomor aksesi plasma nutfah padi lokal dan 2 galur kontrol. Salah satu hasil analisis *genotyping* dengan primer *Xa7*-SNP6 yang di-*running* di mesin *genetic analyzer* CEQ8000, seperti pada Gambar 3.

Salah satu hasil *Xa7*-SNP *genotyping* pada Gambar 3 menunjukkan bahwa salah satu aksesi plasma nutfah padi yang dianalisis menggunakan primer *Xa7*-SNP6, yaitu Parekaligolara pada basa nuklotidanya ke-47 memiliki basa T (Timin). Basa T pada lokus *Xa7*-SNP6 ini menunjukkan bahwa Parekaligolara mempunyai tipe *Xa7*-SNP6 yang termasuk dalam kelompok padi subspecies Indica. Hal ini terlihat pada Tabel 2 bahwa *Xa7*-SNP6 memiliki motif SNP T/C. Hal ini me-

Tabel 3. Respon tingkat ketahanan 24 aksesi plasma nutfah padi lokal terhadap 3 ras HDB dominan di lapang, yaitu RasIII, RasIV, dan Ras VIII dan 1 isolat spesifik untuk gen *Xa7*, isolat 93-229.

| Sampel | Subspesies | 93-229* | Stadia Bibit | | | Stadia Dewasa | | | Lapang | | |
|------------------|------------|---------|--------------|----|------|---------------|----|------|--------|----|------|
| | | | III | IV | VIII | III | IV | VIII | III | IV | VIII |
| Gondok | Indica | AP | AP | AP | T | T | T | T | AT | AT | AT |
| Pulut Namang | Indica | P | T | T | T | AP | AP | T | AT | AT | AT |
| Manggar | Indica | P | ST | MS | AT | AT | AT | T | MS | MS | MS |
| Parekaligolara | Indica | AP | T | T | T | AT | AT | T | AT | AT | AT |
| P. Pui | Trop Jap | P | AT | AT | ST | AP | AT | AT | AT | AP | P |
| P. Kley | Trop Jap | AP | AT | T | ST | AT | AT | AT | AT | MS | P |
| P. Belanda | Indica | P | T | T | T | AT | AT | AT | AT | P | P |
| P. Puti | Trop Jap | AP | T | T | T | MS | MS | MS | AT | P | P |
| Sampang | Indica | AP | T | T | ST | AT | AT | AT | AT | P | P |
| P. Kendanggang | Trop Jap | AP | ST | AP | ST | AT | AT | AT | AT | P | P |
| Pae Gudo | Indica | P | T | AT | ST | T | AT | AT | AT | AT | AT |
| P. Siam | Trop Jap | AP | ST | AT | AP | AP | AP | AP | AT | AT | AP |
| Menta | Indica | AP | AT | ST | AP | AT | T | AP | AT | AP | AP |
| Kuntu Ameh | Indica | AP | T | T | T | T | AT | AT | AT | AT | AP |
| Pulut Long Banga | Trop Jap | AP | ST | AT | ST | AT | AT | AT | AT | P | P |
| Gajah Mada | Indica | AP | AT | T | AT | AT | T | AT | AT | AT | AT |
| Melaya | Trop Jap | AT | AP | AP | - | T | AT | AT | AT | AP | AP |
| Semirit | Trop Jap | AT | AT | AT | P | P | - | - | AT | P | AP |
| Mahsuri | Indica | AT | AT | AT | AP | AT | AT | AT | AP | P | AP |
| Tjere Bandung | Indica | AT | AT | MS | - | AT | - | - | AT | P | P |
| Pandan | Trop Jap | AT | T | T | AP | AT | - | - | AT | P | P |
| TN1 | Japonica | AT | AT | T | T | AP | AT | AP | T | AT | AT |
| IRBB7 | Indica | AT | AT | AT | AT | AT | AT | AT | AT | AT | AT |

* berdasarkan pengujian di rumah kaca. ST = sangat tahan (0%), T = tahan (1-5%), AT = agak tahan (6-25%), AP = agak peka (26-50%), P = peka (51-75%), SR = sangat rentan (76-100%).

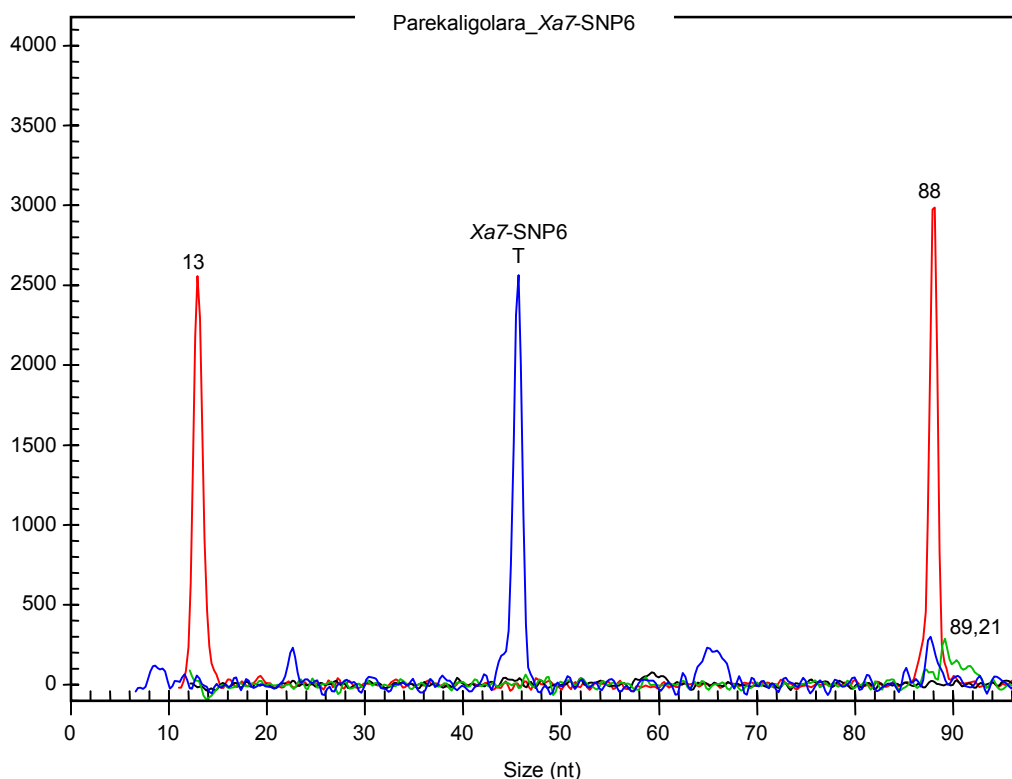
nunjukkan adanya polimorfisme basa nukleotida T (Timin) pada subspecies Indica dan C (Cytisin) pada subspecies Tropical Japonica. IRBB7 sebagai tanaman kontrol isogenik gen *Xa7*, merupakan galur isogenik dari persilangan kultivar DV85 (Indica, asal Bangladesh) sebagai donor gen *Xa7* dengan kultivar IR24 (Indica, asal IRRI, sebagai tetua pemulih) (Sidhu *et al.* 1978, Ogawa *et al.* 1991), memiliki tipe *Xa7*-SNP kelompok subspecies Indica.

Berdasarkan data SNP *genotyping* dengan 12 primer *Xa7*-SNP selanjutnya dilakukan analisis LD *mapping* gen target *Xa7* dan diperoleh hasil seperti tergambar dalam Gambar 4. Hasil tersebut menunjukkan adanya 3 region LD dengan tingkat signifikansi polimorfis paling tinggi. Ketiga region LD gen *Xa7* adalah LD1: SNP2 sampai SNP12 (meliputi LD16-LD9 dengan posisi *contig* = 27.370.133-27.541.931); LDII: SNP4 sampai SNP10 (meliputi LD13-LD44 dengan posisi *contig* = 27.451.531-28.100.952); dan LDIII: SNP5 sampai SNP6 (meliputi LD34-LD14 dengan posisi *contig* = 27.475.112-27.914.495). Posisi LDI, LDII, dan LDIII yang bersifat signifikan digambarkan pada Gambar 4.

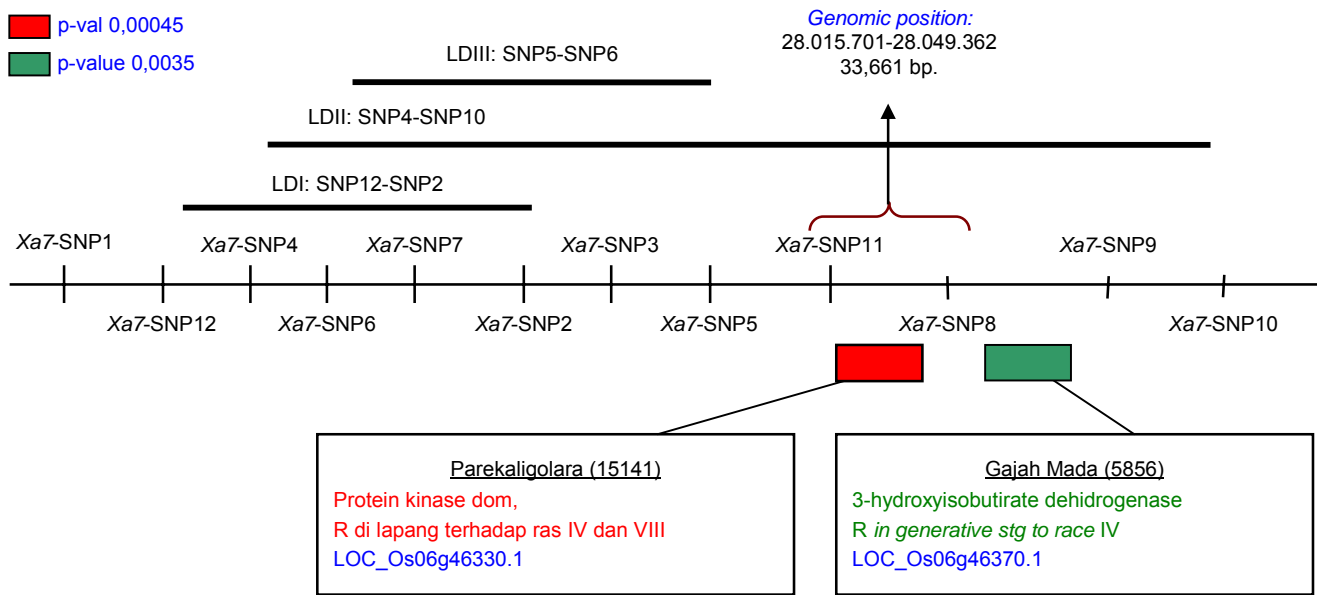
Untuk menentukan region mana yang mempunyai keterpautan dengan gen target maka dilakukan

uji gabungan (*association testing*) antara data *genotyping Xa7*-SNP dengan data fenotipe. Uji lanjutan ini diperlukan untuk menentukan alel dari region LD mana dari lokus gen *Xa7* yang berkontribusi secara nyata dalam membentuk sifat ketahanan terhadap penyakit HDB. Analisis dilakukan dengan Ujoint dan GLM test menggunakan program Tassel2_9_4i.

Hasil analisis di atas juga merupakan hasil plot LD *map* dari 12 marka *Xa7*-SNP yang menandai lokus alel yang berbeda untuk gen *Xa7*. Hasil pada Gambar 4 menunjukkan bahwa dari 12 primer *Xa7*-SNP yang didisain berdasarkan sekuen region gen *Xa7*, terdapat 2 region yang signifikan terhadap data fenotipe tingkat ketahanan terhadap penyakit HDB. Region pertama yang signifikan tersebut terdapat pada region antara marka *Xa7*-SNP11 sampai dengan *Xa7*-SNP8 (pada *contig* AP004989) dengan tingkat signifikansi P-val: 0,00045. Region ini terdiskripsi sebagai gen *protein kinase domain* dan ditandai dengan fenotipe tanaman yang bersifat tahan pada pengujian lapang terhadap ras IV dan VIII. Plasma nutfah dengan penampilan seperti ini diperoleh pada plasma nutfah Parekaligolara (No. aksesori 15141). Region yang lain ditandai antara marka *Xa7*-SNP8 sampai dengan *Xa7*-SNP9 (*contig*



Gambar 3. Genotipe salah satu sampel Parekaligolara dengan primer *Xa7*-SNP6. Pada lokus *Xa7*-SNP6, pada posisi basa ke-47 mempunyai basa nukleotida T (Timin) (warna biru). Puncak warna merah adalah DNA standard yang berukuran 13 dan 88 basa nukleotida.



Gambar 4. Analisis gabungan (association test) antara *Xa7*-SNP genotyping dengan data phenotyping tingkat ketahanan terhadap penyakit HDB, menggunakan ras III, IV, dan VIII, hasil pengujian di rumah kaca dan lapang.

AP003728) dengan tingkat signifikansi yang lebih rendah, yaitu P-val: 0,0035. Region ini terdiskripsi sebagai gen *3-hydroxyisobutirate dehidrogenase* dan ditandai dengan fenotipe tanaman yang bersifat tahan pada fase dewasa terhadap ras IV. Plasma nutfah dengan penampilan seperti ini terdapat pada plasma nutfah Gajah Mada (No. aksesori 5856). Kedua aksesori, Parekaligolara dan Gajah Mada termasuk kelompok subspecies Indica. Kedua plasma nutfah ini memiliki genotipe *Xa7*-SNP yang sama dengan galur isogenik IRBB7 sebagai kontrol alel gen *Xa7* yang juga memiliki tipe alel Indica. Namun demikian kedua aksesori plasma nutfah di atas memiliki variasi alel yang berbeda untuk gen *Xa7*. Variasi alel *Xa7* yang terdapat pada plasma nutfah Parekaligolara berkaitan dengan *protein kinase domain*, sedangkan variasi alel yang terdapat pada plasma nutfah Gajah Mada berkaitan dengan protein *3-hydroxyisobutirate dehidrogenase*. Meskipun masih perlu dikonfirmasi lebih lanjut, namun terdapat indikasi bahwa kedua aksesori plasma nutfah padi lokal di atas dapat dimanfaatkan sebagai sumber alel gen *Xa7* yang selama ini belum diketahui.

Salah satu posisi LD map yang signifikan, yaitu LD map pada posisi genomik: 28.015.701-28.049, yaitu yang terdapat pada *contig* AP004989 berdekatan dengan hasil pemetaan fisik melalui BAC klon gen *Xa7* pada tanaman Nipponbare yang dilakukan oleh Chen *et al.* (2002) dan Porter *et al.* (2003), yang menyebutkan bahwa gen *Xa7* terletak sepanjang *contig* AP005192 sampai dengan *contig* AP004989, yaitu posisi genomik: 27.735.172-28.015.701. Sedangkan hasil pe-

nelitian terbaru pemetaan gen *Xa7* oleh Chen *et al.* (2008) diketahui bahwa gen *Xa7* terdapat pada *contig* AP006056 dengan posisi genomik: 27.953543-27976.665. Di samping itu, pada posisi genomik ini juga diketahui terdapat 3 marka mikrosatelit yang ber-*co-segregation* dengan gen *Xa7*, yaitu RM20589, RM20590, dan RM20591 (Chen *et al.* 2008). Untuk pengembangan penelitian lanjutan, ketiga marka mikrosatelit tersebut dapat diaplikasikan ke aksesori Parekaligolara dan Gajah Mada untuk mendesain *Xa7*-SNP baru yang ber-*co segregation* langsung dengan gen *Xa7*. Berdasarkan hasil yang diperoleh maka marka *Xa7*-SNP8 dan *Xa7*-SNP11 adalah marka yang terdekat dengan gen *Xa7* dari 12 marka *Xa7*-SNP yang didesain yang dapat digunakan untuk membantu proses seleksi plasma nutfah ataupun hasil pemuliaan sebagai marka MAS (Marker Assisted Selection).

KESIMPULAN DAN SARAN

Telah diperoleh dua kandidat variasi alel gen *Xa7*, yaitu (1) variasi alel yang berkaitan dengan protein *kinase domain*, yaitu terdapat pada plasma nutfah Parekaligolara (Indica, 15141), dengan fenotipe tanaman yang bersifat tahan pada pengujian lapang terhadap ras IV dan VIII dan 2. Variasi alel yang berkaitan dengan protein *3-hydroxyisobutirate dehidrogenase*, yaitu terdapat pada plasma nutfah Gajah Mada (Indica, 5856), dengan fenotipe tanaman yang bersifat tahan pada fase dewasa terhadap ras IV.

Kedua variasi alel untuk gen *Xa7* terpetakan pada posisi LD *map* 28,05-28,1 Mb dari kromosom 6, yang ditandai dengan marka yang terpaut *Xa7*-SNP8 dan *Xa7*-SNP11. Kedua marka tersebut dapat digunakan untuk membantu proses seleksi plasma nutfah ataupun hasil pemuliaan sebagai marka MAS.

Sebagai penelitian lanjutan, dalam rangka mengkonfirmasi dua kandidat variasi alel gen *Xa7* yang diperoleh maka diperlukan identifikasi gen *avr* pada ras atau isolat HDB yang digunakan dalam pengujian yang secara spesifik *correspond* dengan gen *Xa7*.

DAFTAR PUSTAKA

- Chen, M., G. Presting, W.B. Barbazuk, J.L. Goicoechea, B. Blackmon, G. Fang, H. Kim, D. Frisch, Y. Yu, S. Sun, S. Hgingbottom, J. Phimphilai, Dphimphilai, S. Thurmond, B. Gaudette, P. Li, J. Liu, J. Hatfield, D. Main, K. Farar, C. Henderson, L. Barnett, R. Costa, B. Williams, S. Walser, M. Atkins, C. Hall, M.A. Budiman, J.P. Tomkins, M. Luo, I. Bancroft, J. Salse, F. Regad, T. Mohapatra, N.K. Singh, A.K. Tyagi, C. Soderlund, R.A. Dean, and R.A. wing. 2002. An integrated physical and genetic map of the rice genome. *Plant Cell* 14:537-545.
- Chen, S., Z. Huang, L. Zeng, J. Yang, Q. Liu, and X. Zhu. 2008. High resolution mapping and gene prediction of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* resistance gene *Xa7*. *Mol. Breed.* 11032-009-9187-1.
- Crowder, L.V. 1997. *Genetika Tumbuhan*. Gadjah Mada University Press.
- Feltus, A.F., J. Wan, S.R. Schulze, J.C. Estill, N. Jiang, and A.H. Paterson. 2004. An SNP resource for rice genetics and breeding based on subspecies Indica and Japonica. *J. Genome Res.* 14:1812-1819.
- Flint-Garcia, S.A., J.M. Thornsberry, and E.S. BucklerIV. 2003. Structure of linkage disequilibrium in plants. *J. Annu. Rev. Plant. Biol.* 54:357-374.
- IRRI. 1996. *Standard Evaluation System for Rice*. International Rice Research Institute. Manila, Philippines.
- Karson, M.J. 1982. *Multivariate Statistical Methods*. The Iowa State University Press.
- Latha, R., L. Rubia, J. Bennett, and M.S. Swaminathan. 2004. *Allele mining* for stress tolerance genes in *Oryza* species and related germplasm. *Mol. Biotechnol.* 27:101-108.
- Morton, N.E. 2005. Linkage disequilibrium and association pemetaan. *J. Clin. Invest.* 115:1425-1430.
- Ogawa, T., T. Yamamoto, G.S. Khush, and T.W. Mew. 1991. Breeding of near-isogenic lines of rice with single genes for resistance to bacterial blight pathogen (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*). *Japan J. Breed.* 41:523-529.
- Porter, B.W., J.M. Chittoor, M. Yano, T. Sasaki, and F.F. White. 2003. Development and mapping of markers linked to the Rice Bacterial Blight resistance gene *Xa7*. *Crop Sci.* 43(4):1484-1492.
- Rangan, L., S. Constantino, G.S. Khush, and M.S. Swaminathan. 1999. The feasibility of PCR-based *allele mining* for stress tolerance genes in rice. *Rice Genet. Newsletter* 16:43-47.
- Shidu, G.S., G.S. Khush, and T.W. Mew. 1978. Genetic analysis of bacterial blight resistance in seventy-four cultivars of rice, *Oryza sativa* L. *Theor. Appl. Genet.* 53:105-111.
- Tanskey, S.D. and S.R. McCouch. 1997. Seed banks and molecular maps; unlocking genetics potential from the wild. *Science* 277:1063-1066.
- Triny, S.K., I. Hanarida, D.W. Utami, S. Koerniati, A.D. Ambarwati, A. Apriana, dan S. Sisharmini. 2007. Evaluasi ketahanan populasi haploid ganda silangan IR64 dan *Oryza rufipogon* terhadap hawar daun bakteri pada stadia bibit. *Buletin Plasma Nutfah*.
- Silitonga, T.S., H.R. Hifni, M. Amir, K. Kardin, dan A. Nasution. 1995. Evaluasi keragaman genetik plasma nutfah padi. *Dalam Kinerja Penelitian Tanaman Pangan*. Puslitbangtan. Bogor. hlm. 20-23.
- Utami, D.W., E.M. Septiningsih, A. Nasution, Santosa, Fatimah, dan S. Yuriyah. 2006. Pencarian alel-alel baru untuk gen-gen penting toleran cekaman biotik dan abiotik pada padi. Struktur populasi keragaman genetik plasma nutfah padi dan evaluasi ketahanan terhadap penyakit blas (*Pyricularia grisea*) untuk pencarian alel-alel baru. Laporan Hasil Penelitian APBN. BB-Biogen, Badan Litbang Pertanian Departemen pertanian.
- Utami, D.W., E.M. Septiningsih, I. Hanarida, S. Yuriyah, dan I. Ridwan. 2007. Pencarian alel-alel baru untuk gen-gen penting toleran cekaman biotik dan abiotik pada padi. Pencarian alel gen ketahanan terhadap penyakit hawar daun bakteri, *Xa7* menggunakan marka molekuler SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) dan *Xa26* berdasarkan analisis sekuensing dan evaluasi tingkat toleransi plasma nutfah padi terhadap keracunan Fe di lapang dan disain primer Fe-SNP. Laporan Hasil Penelitian APBN. BB-Biogen, Badan Litbang Departemen pertanian.
- Yamamoto, T., H.R. Hifni, M. Machmud, T. Nishizawa, dan D.M. Tantera. 1977. Variation in pathogenicity of *Xanthomonas oryzae* and resistance varieties to the pathogen. *Contribution* 28. *Centr. Res. Inst. Agric. Bogor.* 22 p.