

Evaluasi Lapang dan Identifikasi Molekuler Plasma Nutfah Padi terhadap Keracunan Fe

Dwinita W. Utami* dan Ida Hanarida

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

Diajukan: 7 Desember 2013; Diterima: 3 Maret 2014

ABSTRACT

Field Evaluation and Molecular Identification of Rice Germplasms for Fe Toxicity. *Dwinita W. Utami and Ida Hanarida.* Fe toxicity is one of the abiotic constraints that can significantly decrease rice production, especially in marginal wetlands. The use of tolerant varieties can reduce the cost of soil processing and fertilizing. Many accessions of rice germplasm have potential alleles that can be utilized to create new varieties tolerant to Fe toxicity. The objectives of this research were to evaluate the Fe toxicity tolerance of rice germplasm and to analyze the genotype diversity using SNP markers for *OsIRT*, Fe toxicity tolerant gene(s). Fe toxicity tolerant rice germplasms were screened in acid marginal wetlands of Taman Bogo Experimental Station, Indonesian Soil Research Institute, Lampung Province. Meanwhile, the genotypes performance analysis was conducted on SNP genotyping analysis using SNP markers for *OsIRT* gene(s). Based on phenotypic data of 97 accessions, which were clustered into six groups, two of them (group 2 and group 5) consisted of the tolerant accessions at both vegetative and generative stages. The results of grouping analysis of genotyping based on SNP markers were obtained that there were five genotype groups: AGT, AAT, GAT, AAC, and GAC. The AGT genotype cluster was dominated by the accessions included in group 1. Meanwhile, the GAT genotype cluster consisted of mixed tolerant and intolerant accessions to Fe toxicity. The GAC genotype cluster was dominated by the accessions included in group 2. The accessions which were included in the best tolerant group, group 5, were separated in different genotype cluster. Based on association analysis, among the three SNP markers, *OsIRT1* was the most significant SNP marker (P value = 0.01) which correlated to Fe toxicity tolerant on vegetative stage. Some of the selected accessions that were tolerant to Fe toxicity and had good agronomic performance on acid soil with high Fe content were Ketan Alay, Markuti, Arias Halus, Komasa, Lantiak, and Utri Deli. These local rice accessions have the potential alleles of *OsIRT* genes.

Keywords: Rice germplasm, phenotype, genotype, Fe toxicity, *OsIRT*.

ABSTRAK

Evaluasi Lapang dan Identifikasi Molekuler Plasma Nutfah Padi terhadap Keracunan Fe. *Dwinita W. Utami dan Ida Hanarida.* Keracunan Fe merupakan salah satu cekaman abiotik yang secara nyata dapat menurunkan produktivitas padi, terutama pada lahan basah marginal. Penggunaan varietas toleran keracunan Fe dapat mengurangi biaya pengolahan dan pemupukan yang tinggi. Sejumlah aksesi plasma nutfah padi memiliki alel potensial untuk pembentukan varietas baru toleran keracunan Fe. Tujuan penelitian ini adalah mengevaluasi keragaman sifat toleransi keracunan Fe plasma nutfah padi dan menganalisis keragaman genotipnya menggunakan marka gen *OsIRT*. Evaluasi sifat toleransi dilakukan di lahan masam Fe tinggi di Kebun Percobaan Taman Bogo, Balai Penelitian Tanah, Provinsi Lampung, sedangkan analisis genotipe dilakukan menggunakan marka SNP untuk gen *OsIRT*. Dari hasil analisis gerombol data fenotipe 97 aksesi plasma nutfah padi, terdapat enam kelompok yang dua di antaranya (gerombol 2 dan 5) merupakan gerombol terbaik yang terdiri atas aksesi-aksesi toleran pada fase vegetatif maupun generatif. Dari hasil analisis keragaman genotipe menggunakan tiga marka SNP, diperoleh lima kelompok genotipe, yaitu AGT, AAT, GAT, AAC, dan GAC. Kelompok genotipe AGT didominasi oleh aksesi yang termasuk dalam gerombol 1. Kelompok genotipe GAT merupakan kelompok campuran antara aksesi yang bersifat toleran dan peka. Kelompok genotipe GAC didominasi oleh aksesi yang termasuk dalam gerombol 2. Plasma nutfah yang termasuk dalam gerombol terbaik, yaitu gerombol 5, tersebar di beberapa kelompok genotipe yang berbeda-beda. Analisis gabungan menunjukkan marka SNP-*OsIRT1* paling signifikan berkorelasi terhadap sifat toleran keracunan Fe pada fase vegetatif (Nilai P = 0,01). Dari hasil penelitian ini, terpilih enam aksesi plasma nutfah toleran keracunan Fe, yaitu Ketan Alay, Markuti, Arias Halus, Komasa, Lantiak, dan Utri Deli. Plasma nutfah tersebut berpotensi memiliki alel gen toleran keracunan Fe, yaitu *OsIRT1* dan *OsIRT2*.

Kata kunci: Plasma nutfah padi, fenotipe, genotipe, keracunan Fe, *OsIRT*.

PENDAHULUAN

Ferrum atau besi (Fe) adalah unsur hara mikro esensial yang dibutuhkan tanaman untuk mendukung transportasi elektron dalam proses fotosintesis. Fe berfungsi sebagai akseptor elektron penting dalam reaksi redoks dan aktivator untuk beberapa enzim

penting dalam metabolisme tanaman (Immanudin, 2007). Namun demikian, pada tanah-tanah masam, unsur mikro seperti Fe dapat terlarut dan tersedia bagi tanaman dalam jumlah berlimpah dan seringkali justru menyebabkan keracunan Fe. Jutaan hektar lahan di beberapa negara Asia, Afrika, dan Amerika Latin dilaporkan mengalami keracunan Fe (Ottow *et al.*, 1989). Di Indonesia, keracunan Fe terjadi di lahan suboptimal, yaitu daerah rawa, lahan pasang surut, beberapa daerah dataran rendah dengan drainase buruk, dan daerah bukaan baru yang tersebar di kepulauan Indonesia. Pada umumnya keracunan Fe terdapat pada lahan jenis Podsolik Merah Kuning atau Oksisol, yang diperkirakan di Indonesia luasnya mencapai 14,11–45,75 juta ha (Himatan, 2009; Ismunadji, 1990).

Peningkatan kebutuhan pangan dan penyusutan lahan subur akibat konversi lahan ke non pertanian, mendorong perlunya pengembangan tanaman padi toleran keracunan Fe. Terdapat beberapa hipotesis mengenai mekanisme sifat toleran keracunan Fe (Fe^{2+}) pada tanaman padi, yaitu (1) tanaman mampu mencegah terserapnya Fe oleh akar (*uptake mechanism*), (2) tanaman mampu mendistribusikan Fe yang bersifat racun ke dalam bagian tanaman yang berbeda sehingga mengurangi efek racun dari ion ini (*partitioning mechanism*), dan (3) tanaman mempunyai kemampuan untuk bertahan dari efek racun radikal O_2 yang terbentuk setelah Fe terserap oleh akar dan ditranslokasikan ke daun (*tissue tolerant mechanism*) (Asch *et al.*, 2005; Becker *et al.*, 2005). Beberapa hasil penelitian menunjukkan telah teridentifikasinya beberapa gen yang terlibat dalam mekanisme penyerapan Fe oleh tanaman. Pada sebagian besar tanaman, baik dikotil maupun monokotil, penyerapan ion fero (Fe^{2+}) dari tanah ke dalam sel akar diperankan oleh suatu protein transporter. Penyerapan ini terjadi setelah ion feri (Fe^{3+}) direduksi menjadi ion fero (Fe^{2+}) pada membran plasma sel akar (Eide *et al.*, 1996; Robinson *et al.*, 1999). Proses reduksi ini diperankan oleh gen Fe^{3+} *chelate reductase* (*FRO2*, *FRO1*, dan *FRO3*). Akar tanaman tersebut mampu membebaskan proton untuk mereduksi ion Fe^{3+} dalam tanah menjadi ion Fe^{2+} sehingga dapat terserap tanaman. Selanjutnya, ion Fe^{2+} yang telah terserap akan ditransportasikan oleh suatu gen transporter *iron regulator transporter* (*IRT1*) (Eide *et al.*, 1996) dan *IRT2* (Vert *et al.*, 2001) ke bagian sel-sel tanaman yang lain. Gen ini berperan dalam mekanisme *partitioning* Fe^{2+} ke beberapa bagian tanaman yang berbeda sehingga tanaman dapat lebih toleran pada kondisi Fe^{2+} yang berlebihan. Gen *IRT* pada padi, telah teridentifikasi sebagai gen *OsIRT*, merupakan gen pengode protein transporter Fe^{2+} (dan Zn), yang mempunyai

delapan domain transmembran dan sebuah *variable intracellular loop* antara *transmembran region* (TM) 3 dan 4 dengan struktur *fully conserved histidine residue* (Eng *et al.*, 1998; Guerinot, 2000; MacDiarmid *et al.*, 2000; Rogers *et al.*, 2000). Ekspresi dari gen *OsIRT* terjadi pada daun dan batang (Ishimaru *et al.*, 2006). Gen *OsIRT1* dan *OsIRT2* bersifat homolog dengan protein zinc transporter (*zinc regulated transporter/ZRT*) (Zhao dan Eide, 1996). Posisi gen *OsIRT1* dalam genom padi terletak pada kromosom 7, pada posisi 47,787-52,212 Mb, memanjang pada contig AP004297, lokus MSU Osa1: LOC_Os07g01090, sedangkan gen *OsIRT2* merupakan gen homolog gen *OsIRT1* yang terletak pada kromosom 7, posisi genetik 7,309–7,312 Mb, memanjang pada contig AP005774, lokus LOC_Os07g12770 (Gross *et al.*, 2003).

Perkembangan teknologi genomik, yang meliputi pemetaan *quantitative trait locus* (QTL), penemuan gene (*gene discovery*), dan sekuen genom secara lengkap, telah memungkinkan untuk melakukan pencarian alel yang berguna dalam koleksi plasma nutfah padi yang melimpah untuk perbaikan varietas melalui suatu strategi yang disebut sebagai *allele mining* (Utami *et al.*, 2009), termasuk dimungkinkannya pencarian alel dari gen yang berperan dalam sifat toleran terhadap keracunan Fe. Tujuan penelitian adalah mengevaluasi tingkat toleransi keracunan Fe plasma nutfah padi dan menganalisis keragaman genotipenya menggunakan marka gen *OsIRT1* dan *OsIRT2*.

BAHAN DAN METODE

Percobaan lapang dilakukan di Kebun Percobaan (KP) Taman Bogo, Balai Penelitian Tanah, Provinsi Lampung, pada MH 2007/2008. Percobaan laboratorium dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (BB Biogen).

Material genetik yang digunakan adalah 97 aksesori plasma nutfah padi lokal, termasuk satu varietas introduksi sebagai kontrol toleran (Mahsuri) dan satu varietas kontrol peka (IR64), yang telah diketahui keragaman genetiknya berdasarkan tiga puluh marka SSR dan termasuk dalam kelompok *indica* dan *tropical japonica* (Utami *et al.*, 2010). Aksesori plasma nutfah yang diuji disajikan pada Tabel 1.

Evaluasi Tingkat Toleransi Plasma Nutfah Padi terhadap Keracunan Fe di Lapang

Evaluasi sifat toleransi plasma nutfah padi terhadap keracunan Fe dilaksanakan di KP Taman Bogo, Lampung, sesuai dengan standar pengujian lapang untuk pengujian sifat toleran keracunan Fe yang dilakukan oleh Balai Besar Penelitian Tanaman Padi

Tabel 1. Aksesori plasma nutfah padi yang dievaluasi sifat toleransinya terhadap keracunan Fe.

No.	Plasma nutfah	No. reg.	Kelompok	No. G	No.	Plasma nutfah	No. reg.	Kelompok	No. G
1.	Hawara Bunar*	19285	<i>indica</i>	1	50.	Sipulut Merah A*	14834A	<i>indica</i>	2
2.	P Timai*	19974	<i>indica</i>	1	51.	Pulut Namang*	21256	<i>indica</i>	2
3.	Gendjah Mada*	5856	<i>indica</i>	1	52.	Pae Gudo*	6332	<i>indica</i>	2
4.	Pudak Kuning*	6204	<i>indica</i>	1	53.	Mendalet*	5742	<i>indica</i>	2
5.	Gemas*	7072	<i>indica</i>	1	54.	Ganefo*	5648	<i>indica</i>	2
6.	Kruet Sintang*	8146	<i>indica</i>	1	55.	P Ketan Sit*	C75	<i>tropical japonica</i>	2
7.	Padi Lungkai*	14716	<i>indica</i>	1	56.	P Belanda*	C98	<i>indica</i>	2
8.	Ileuy*	14785	<i>indica</i>	1	57.	P Ba'an*	C119	<i>indica</i>	2
9.	Jerai*	14964	<i>indica</i>	1	58.	Padi Jawa*	19732	<i>tropical japonica</i>	2
10.	Batanghari***	21174	<i>indica</i>	1	59.	Pare Lambeun*	15153	<i>tropical japonica</i>	2
11.	Indragiri***	21175	<i>indica</i>	1	60.	Pandan*	21242	<i>tropical japonica</i>	2
12.	Puteh Gaca*	12992	<i>indica</i>	1	61.	Bumbuy Inih*	21244	<i>tropical japonica</i>	2
13.	Teratai*	13102	<i>indica</i>	1	62.	P Puti*	C20	<i>tropical japonica</i>	2
14.	Kuntu Ameh*	13222	<i>indica</i>	1	63.	P Timai*	C28	<i>tropical japonica</i>	2
15.	Padi Tinggi*	13253	<i>indica</i>	1	64.	P Sekrit*	C107	<i>tropical japonica</i>	2
16.	Pare Bakatokaka*	15138	<i>indica</i>	1	65.	P Krayan*	C109	<i>tropical japonica</i>	2
17.	Pare Mangata*	15148	<i>indica</i>	1	66.	P Kendanggang*	C131	<i>tropical japonica</i>	2
18.	Rumbay*	20968	<i>indica</i>	1	67.	Sirentek*	8194	<i>indica</i>	3
19.	Sampang*	5737	<i>indica</i>	1	68.	Gondok*	12571	<i>indica</i>	3
20.	P Agan*	C116	<i>indica</i>	1	69.	Buban*	13152	<i>indica</i>	3
21.	Sibau*	19780	<i>tropical japonica</i>	1	70.	Bulang*	13160	<i>indica</i>	3
22.	P Hitam*	C2	<i>tropical japonica</i>	1	71.	Kartuna*	13270	<i>indica</i>	3
23.	Pulut Saleng*	C6	<i>tropical japonica</i>	1	72.	Semirit*	19839	<i>tropical japonica</i>	3
24.	Pulut Longbanga*	C13	<i>tropical japonica</i>	1	73.	Pulut Timuru*	21248	<i>tropical japonica</i>	3
25.	P Ketan Merah*	C18	<i>tropical japonica</i>	1	74.	Nuri Bura*	14895	<i>indica</i>	4
26.	P Imban*	C37	<i>tropical japonica</i>	1	75.	Melaya*	19736	<i>tropical japonica</i>	4
27.	P Long Liyo*	C47	<i>tropical japonica</i>	1	76.	Gundil*	12348	<i>tropical japonica</i>	4
28.	P Mayun*	C50	<i>tropical japonica</i>	1	77.	Ciganjur*	21177	<i>tropical japonica</i>	4
29.	P Ubek Bala*	C68	<i>tropical japonica</i>	1	78.	Getik*	5643	<i>indica</i>	5
30.	P Kelawit*	C126	<i>tropical japonica</i>	1	79.	P Timai*	19974	<i>indica, KT</i>	5
31.	P Pui*	C135	<i>tropical japonica</i>	1	80.	IR54*	21165	<i>indica</i>	5
32.	P Seribu*	C142	<i>tropical japonica</i>	1	81.	Pulut Pagae*	13163	<i>indica</i>	5
33.	P Kley*	C146	<i>tropical japonica</i>	1	82.	Inceklabu*	13194	<i>indica</i>	5
34.	Mahsuri**		<i>indica, KT</i>	2	83.	Sirandahhitamekor*	13232	<i>indica</i>	5
35.	Padi Banten*	15195	<i>indica</i>	2	84.	Bintang Ladang*	13284	<i>indica</i>	5
36.	Menta*	5758	<i>indica</i>	2	85.	Condong*	14732	<i>indica</i>	5
37.	Djedah*	6601	<i>indica</i>	2	86.	Arias Halus*	14749	<i>indica</i>	5
38.	Tjere Bandung*	6858	<i>indica</i>	2	87.	P Ketan Alay*	C82	<i>indica</i>	5
39.	Komas a*	6877A	<i>indica</i>	2	88.	Pare Kaligolara*	1514	<i>indica</i>	6
40.	Utri Deli*	5730	<i>indica</i>	2	89.	P Manggar*	5744	<i>indica</i>	6
41.	Markuti*	5754	<i>indica</i>	2	90.	P Jata*	C159	<i>indica</i>	6
42.	Mutu*	5758	<i>indica</i>	2	91.	Dupa*		<i>tropical japonica</i>	6
43.	Rias*	8244	<i>indica</i>	2	92.	P Atok*	C41	<i>tropical japonica</i>	6
44.	Suling*	21290	<i>indica</i>	2	93.	Pulut Jangan*	C60	<i>tropical japonica</i>	6
45.	P Libang*	C182	<i>tropical japonica</i>	5	94.	P Bat Kanjat*	C122	<i>tropical japonica</i>	6
46.	Limabulan Kamang*	12399	<i>indica</i>	2	95.	P Telengusan*	C150	<i>tropical japonica</i>	6
47.	Padi Belanak K*	12674	<i>indica</i>	2	96.	P Siam*	C166	<i>tropical japonica</i>	6
48.	Lantiak*	13236	<i>indica</i>	2	97.	IR64**, ***		<i>indica, KP</i>	
49.	Ketupat*	14657	<i>indica</i>	2					

*Padi lokal. **Varietas introduksi. ***Varietas unggul. No. G = nomor gerombol (Tabel 4). KT = kontrol toleran, KP = kontrol peka.

(BB Padi). Lahan untuk pengujian keracunan Fe di KP ini mempunyai kandungan Fe tanah yang tinggi, mencapai 177–200 ppm dibanding dengan kandungan Fe tanah normal (< 120 ppm).

Total 97 aksesori plasma nutfah padi, termasuk IR54, Mahsuri, dan IR64 sebagai tanaman kontrol, diuji menggunakan Rancangan Acak Kelompok, dengan dua ulangan, ukuran plot 1 m x 3 m. Bibit berumur 21–25 hari sejak semai ditanam dengan jarak tanam 20 cm x 20 cm, tiga bibit per lubang tanam, ditanam dalam barisan memanjang petak percobaan, di antara setiap sepuluh nomor aksesori, ditanam sebaris varietas

peka IR64 dan varietas toleran Mahsuri. Demikian juga di sekeliling plot dan di antara barisan ulangan satu dengan ulangan yang lain. Tujuan dari penanaman tanaman kontrol varietas peka dan toleran ini adalah untuk memastikan tingkat keseragaman cekaman Fe pada lahan percobaan sehingga data tingkat toleransi terhadap cekaman Fe pada galur-galur uji menjadi terandal. Pupuk urea dengan dosis sebanyak 120 kg/ha diberikan tiga kali, masing-masing sepertiga dosis pada saat tanam, pada saat tanaman berumur 4 minggu setelah tanam (MST), dan umur tanaman 7 MST, sedangkan pupuk fosfat (SP36) sebanyak 60

kg/ha diberikan pada saat tanam. Pupuk KCl tidak diberikan karena dapat mengurangi keracunan besi dengan memperkuat kemampuan akar mengoksidasi ion fero berlebih (Makarim *et al.*, 1989).

Gejala keracunan Fe pada umur 4 MST dan 8 MST dengan nilai skor menggunakan metode SES (IRRI, 1996) (Tabel 2). Analisis data fenotipe dilakukan dengan analisis statistika deskriptif, pengujian nilai tengah, dan analisis sidik gerombol. Proses pembentukan gerombol berdasarkan jarak *Euclid* dengan metode pautan rata-rata (Karson, 1982). Analisis ini dilakukan untuk mendapatkan informasi dan selanjutnya digunakan untuk mengevaluasi keragaman sifat toleransi keracunan Fe, baik pada fase vegetatif maupun generatif, dari plasma nutfah yang dianalisis.

Analisis Keragaman Genotipe Plasma Nutfah Padi Lokal Terseleksi

Gen target dari penelitian ini adalah gen toleran keracunan Fe yang telah diidentifikasi terdapat pada tanaman padi, yaitu gen *OsRT* (*OsIRT1* dan *OsIRT2*) (Ishimaru *et al.*, 2006). Untuk mengidentifikasi gen target, didesain marka spesifik (marka Fe-LD) berdasarkan sekuen genom pada posisi genetiknya, yaitu Fe-LD-*OsRT1* (F: CGTCTTCTTCTTCTCCACCACGAC; R: GCAGCTGATGATCGAGTCTGACC) dan Fe-LD-*OsIRT2* (F: TCTTCCACCCTGAGCAGCTC; R: AACCTGGAGAC CAGTGCAG). Gen *OsIRT1* dan *OsIRT2* beserta marka Fe-LD dipilih karena berdasarkan penelitian pendahuluan, gen beserta marka di atas lebih bervariasi (polimorfis) pada beberapa aksesori plasma nutfah padi dibanding dengan beberapa gen lain yang juga berperan dalam membentuk sifat toleransi terhadap cekaman keracunan Fe seperti *Fe³⁺ chelate reductase* dan *nicotianamine synthase* (NAS) (Hanarida *et al.*, 2009). Marka Fe-LD selanjutnya digunakan untuk mengamplifikasi *region* gen target dari beberapa

aksesi yang bersifat terpilih, yaitu Mahsuri (*indica*), Getik (*indica*), dan P Kley (*tropical japonica*). Ketiga aksesori ini dipilih selain karena mewakili *background* genetik yang berbeda, *indica* dan *tropical japonica*, juga karena bersifat toleran terhadap keracunan Fe (Hanarida *et al.*, 2009) sehingga ampikon gen target untuk disekuon dapat diperoleh. Hasil amplifikasi yang diperoleh selanjutnya disekuon dan di-*alignment* ke *rice genome browser* (TIGR database) untuk menentukan dan mendesain marka SNP-nya, seperti pada tahapan percobaan *allele mining* oleh Utami *et al.* (2010). Untuk lokus *OsIRT1* didesain dua marka SNP (SNP-*OsIRT1-1* dan SNP-*OsIRT1-2*) dan untuk *OsIRT2* didesain satu marka SNP (SNP-*OsIRT2*). Marka Fe-SNP untuk gen target *OsIRT1* dan *OsIRT2* hasil desain yang diperoleh ditampilkan pada Tabel 3.

Marka Fe-SNP yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk analisis genotipe pada subset delapan puluh aksesori plasma nutfah terpilih, yaitu yang mewakili kelompok (gerombol) serta subspecies yang berbeda. Setelah dilakukan optimalisasi *multiplex panel* untuk marka SNP dengan mesin CEQ800, selanjutnya dilakukan analisis genotipe sampel menggunakan *Beckman SNP primer extension kit*. Data polimorfisme dari marka SNP selanjutnya diolah dengan program *TASSEL* untuk digunakan dalam studi asosiasi dengan mengorelasikan keberadaan polimorfisme SNP dengan data fenotipe yang diperoleh di lapang untuk sifat toleran Fe.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Keragaan Fenotipe Plasma Nutfah Padi Lokal Terseleksi

Hasil percobaan evaluasi tingkat toleransi 97 aksesori plasma nutfah padi, termasuk dua tanaman kontrol (Mahsuri dan IR64) di KP Taman Bogo,

Tabel 2. Skor toleransi keracunan Fe pada tanaman padi.

Skor	Gejala tanaman	Tingkat toleransi
1	Pertumbuhan dan anakan normal	Sangat toleran
3	Pertumbuhan dan anakan agak normal, daun tua merah kecokelatan, ungu atau orange kekuningan	Toleran
5	Pertumbuhan dan anakan terhambat, banyak daun berkurang	Sedang
7	Pertumbuhan dan anakan terhenti, umumnya daun <i>bronzing</i> atau mati	Peka
9	Semua tanaman hampir mati atau mati	Sangat peka

Tabel 3. Primer Fe-SNP untuk gen *OsIRT* di kromosom 7 berdasarkan hasil sekuensing Fe-LD pada tiga nomor aksesori plasma nutfah padi.

Fe-LD target	SNP target	Sumber sekuen		Sekuen primer SNP
	<i>Japonica/indica</i>	Varietas	Respon	
Fe- <i>OsIRT1-1</i>	G/A	P Kley	Toleran (skor 1)	SNP- <i>OsIRT1-1</i> : TCAAATGTTCTGATTAATTG
Fe- <i>OsIRT1-2</i>	A/G	Mahsuri	Toleran (skor 3)	SNP- <i>OsIRT1-2</i> : CAGTGCGGTAGTTCATATTT
Fe- <i>OsIRT2-1</i>	T/C	Mahsuri	Toleran (skor 3)	SNP- <i>OsIRT2</i> : GCGGCACGGCGTGCGACAGT

Lampung, menunjukkan adanya variasi dalam respon tingkat toleransi terhadap keracunan Fe. Keragaan dari pengujian ini seperti terlihat pada Gambar 1.

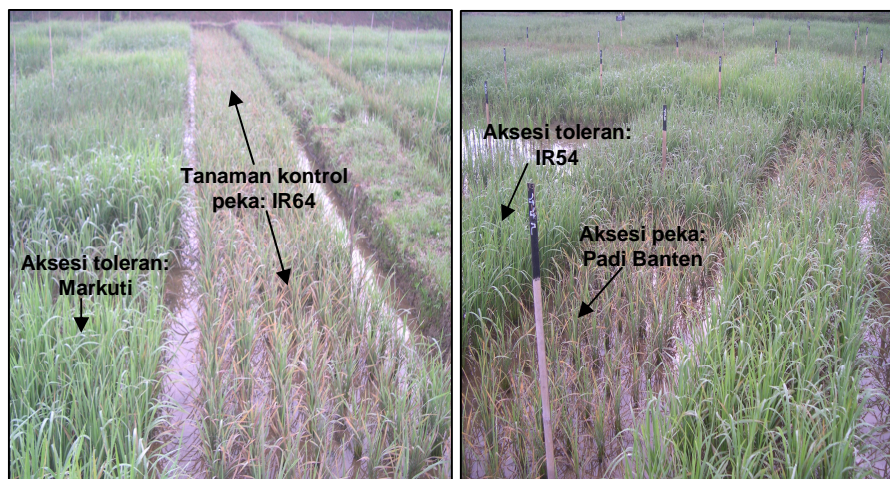
Dari 97 aksesori yang diuji, terdapat perbedaan respon toleransi pada umur tanaman yang berbeda. Pada fase vegetatif (fase anakan maksimum), jumlah aksesori yang bersifat toleran lebih banyak dibanding dengan jumlah yang toleran. Hal ini menunjukkan bahwa tanaman padi fase vegetatif lebih toleran dibanding dengan fase generatif. Hasil ini sesuai dengan hasil penelitian Zeng dan Shanon (2000) yang menunjukkan bahwa tanaman fase *seedling* lebih toleran terhadap cekaman ion tanah yang bersifat racun terhadap tanaman dibanding dengan fase reproduktif. Disebutkan juga bahwa adanya cekaman toksik dari ion Fe akan berpengaruh terhadap proses diferensiasi dalam siklus sel tanaman padi.

Untuk mengevaluasi keragaman sifat toleransi plasma nutfah yang diuji terhadap cekaman keracunan Fe, dilakukan analisis statistik yang mencakup pengujian respon toleransi pada fase yang berbeda serta analisis sidik gerombol untuk mendapatkan

kelompok aksesori terbaik, toleran terhadap cekaman keracunan Fe. Analisis sidik ragam dan pengujian nilai tengah data tingkat toleransi aksesori-aksesori plasma nutfah uji terhadap keracunan Fe pada setiap ulangan disajikan pada Tabel 4 dan Tabel 5.

Hasil analisis pada Tabel 4 menunjukkan bahwa faktor fase tanaman berpengaruh terhadap tingkat toleransi tanaman. Tanaman pada fase vegetatif lebih toleran daripada fase generatif. Hal ini ditunjukkan oleh hasil analisis sidik ragam dengan nilai F yang sangat berbeda nyata (Nilai F = 49,99). Demikian juga dengan pengujian interval nilai tengah pada selang kepercayaan 95% juga sangat berbeda. Nilai tengah populasi tanaman pada fase vegetatif 3,38, sedangkan pada fase generatif 5.

Analisis sidik gerombol pada 97 aksesori plasma nutfah ditampilkan pada Tabel 6, sedangkan dendrogram pengelompokan yang diperoleh ditampilkan pada Gambar 2. Berdasarkan hasil analisis pada tingkat kesamaan 75,3%, diperoleh enam kelompok. Gerombol 1 memiliki jumlah anggota 33 varietas, bersifat toleran (skor 3) terhadap keracunan Fe pada fase



Gambar 1. Keragaan respon toleransi plasma nutfah uji di lahan Fe tinggi pada pengujian lapang (MH 2007/2008) di KP Taman Bogo, Lampung (Hanarida *et al.*, 2009).

Tabel 4. Analisis sidik ragam skoring toleransi terhadap keracunan Fe.

Sumber	Derajat bebas	Jumlah kuadrat	Kuadrat tengah	Nilai F	Nilai P
Fase	1	122,44	122,44	49,99	0,0002
Galat	185	453,08	2,45		
Total	186	575,51			

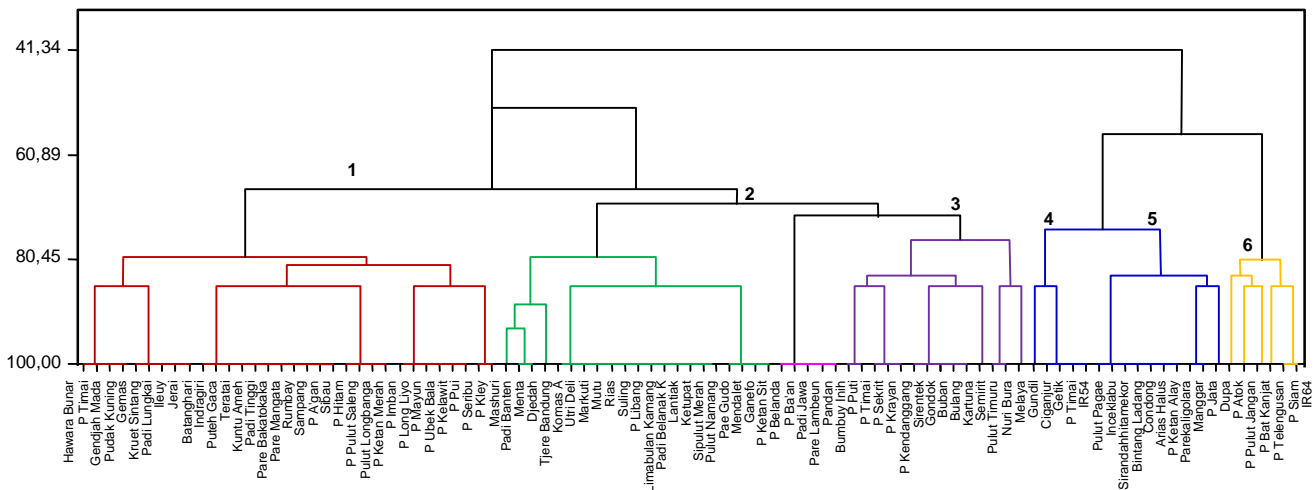
Tabel 5. Selang kepercayaan 95% untuk nilai tengah.

Fase	N	Mean	Standard deviasi	-----+-----+-----+-----+			
				3,60	4,20	4,80	5,40
Vegetatif	93	3,38	1,55	(----*---)			
Generatif	94	5	1,58	(------*-----)			

Tabel 6. Nilai rata-rata untuk masing-masing gerombol.

Gerombol	Nilai rata-rata skor ketahanan Fe		Jumlah aksesori
	Vegetatif (skor)	Generatif (skor)	
Gerombol 1	3 (T)	5 (S)	33
Gerombol 2	3 (T)	3 (T)	33
Gerombol 3	7 (P)	7 (P)	7
Gerombol 4	3 (T)	9 (SP)	4
Gerombol 5	1 (T)	3 (T)	10
Gerombol 6	2 (T)	5 (S)	10

T = toleran, P = peka, S = sedang, SP = sangat peka (IRRI, 1996).



Gambar 2. Dendrogram hasil analisis gerombol aksesori plasma nutfah padi berdasarkan sifat toleransi terhadap Fe. Nomor gerombol (No. G): 1–6, masing-masing memiliki anggota sesuai dengan Tabel 1.

vegetatif dan sedang (skor 5) saat fase generatif. Gerombol 2 terdiri atas 33 varietas yang bersifat toleran terhadap keracunan Fe pada kedua fase pertumbuhan, vegetatif ataupun generatif, dengan skor 3. Gerombol 3 terdiri atas tujuh varietas dan merupakan gerombol dengan respon peka terhadap keracunan Fe, baik pada fase vegetatif (skor 6) maupun generatif (skor 7). Varietas IR64 sebagai tanaman kontrol peka termasuk dalam gerombol ini karena bersifat peka, baik pada fase vegetatif maupun generatif. Tiga gerombol yang lain, yaitu gerombol 4, 5, dan 6, memiliki jumlah anggota berturut-turut empat, sepuluh, dan sembilan varietas. Ciri gerombol 4 adalah toleran (skor 3) pada fase vegetatif dan peka (skor 8) pada fase generatif. Gerombol 5 adalah gerombol yang terbaik dibanding dengan gerombol lainnya karena menunjukkan respon sangat toleran (skor 1) sampai dengan toleran (skor 3) terhadap keracunan Fe pada kedua fase pertumbuhan. Di antara varietas pada gerombol ini yang bersifat sangat toleran (skor 1), yaitu P Timai, Getik, P Ketan Alay, dan IR54. Gerombol yang terakhir adalah gerombol 6 yang bersifat toleran (skor 2) pada fase vegetatif, namun sedang (skor 5) pada fase generatif.

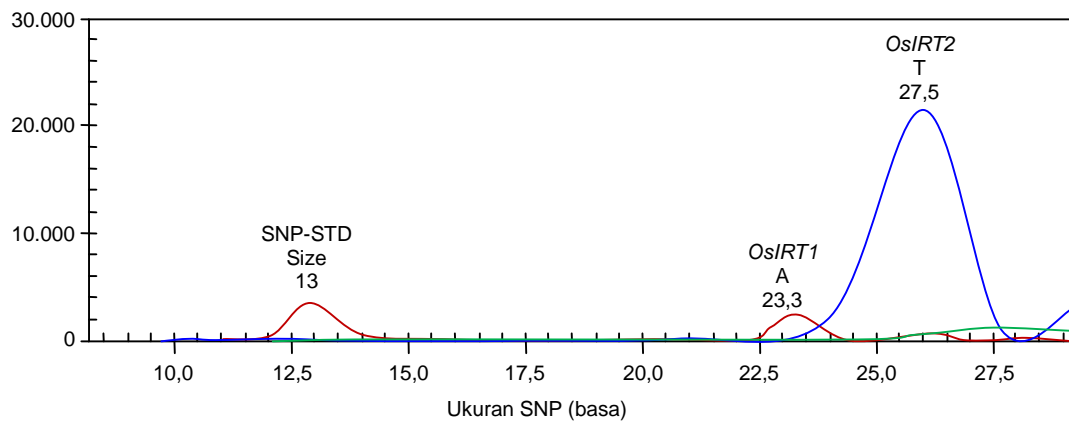
Keragaman Genotipe Plasma Nutfah Padi Terseleksi Berdasarkan Marka *OsIRT*

Kegiatan identifikasi variasi alel baru gen toleran keracunan Fe dilakukan pada delapan puluh aksesori plasma nutfah padi terpilih berdasarkan keragaman respon ketahanannya terhadap cekaman Fe di lapang, baik pada fase vegetatif maupun generatif. Di samping itu, analisis juga mempertimbangkan keragaman kelompok (*indicaljaponicaltropical japonica*) dari masing-masing aksesori plasma nutfah yang dipilih. Salah satu hasil analisis genotipe pada plasma nutfah padi lokal Lantiak menggunakan marka SNP-*OsIRT1-1* dan SNP-*OsIRT2* terlihat seperti pada Gambar 3. Hasil analisis pada Gambar 3 menunjukkan bahwa dengan marka SNP-*OsIRT1-1* dan SNP-*OsIRT2*, plasma nutfah Lantiak memiliki genotipe berturut-turut A (berukuran 23,3 basa) dan T (berukuran 27,5 basa).

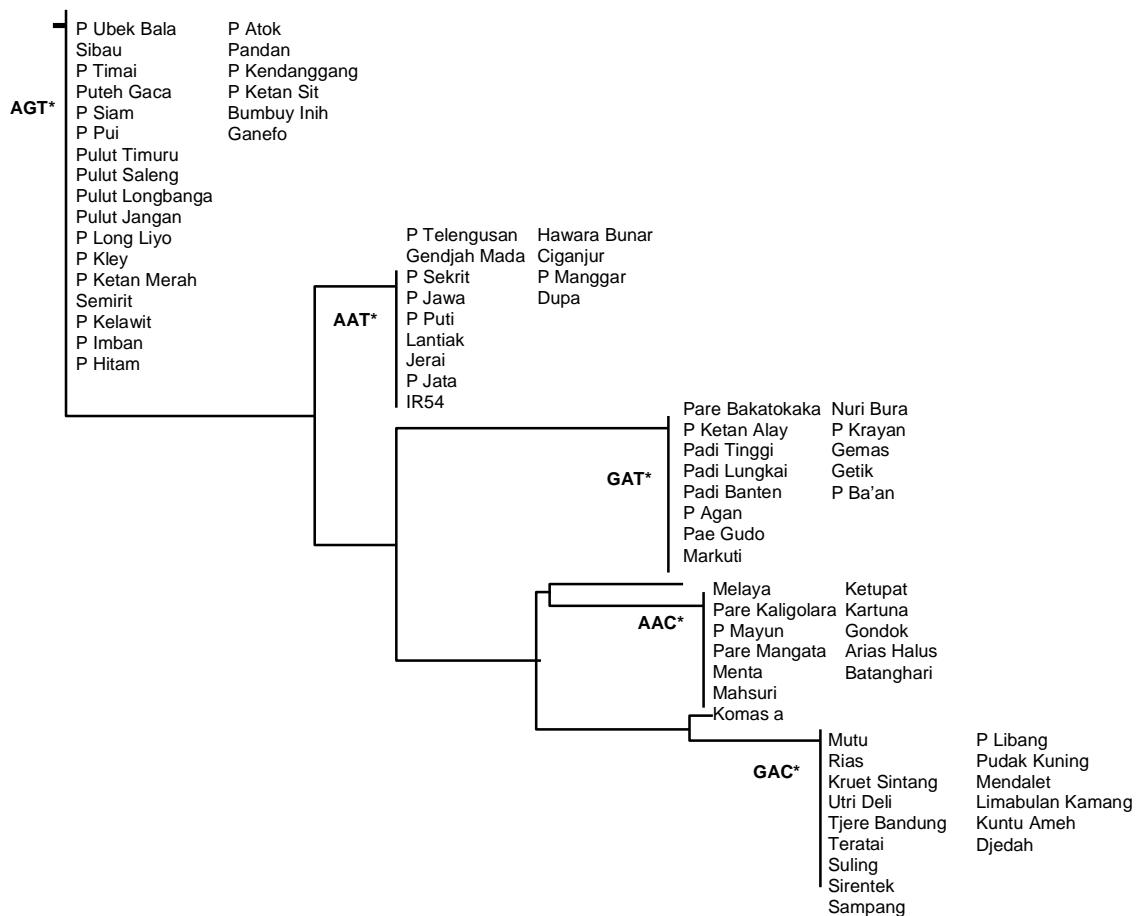
Dengan demikian, plasma nutfah Lantiak pada lokus *OsIRT1-1* memiliki genotipe A dan pada lokus *OsIRT2* memiliki genotipe T. Selanjutnya, berdasarkan data genotipe menggunakan ketiga marka Fe-SNP di atas, aksesori plasma nutfah yang dianalisis dapat dikelompokkan seperti terlihat pada Gambar 4. Hasil

tersebut menunjukkan bahwa aksesi plasma nutfah, yang dianalisis menggunakan tiga marka Fe-SNP untuk gen *OsIRT1* dan *OsIRT2*, mengelompok menjadi lima kelompok genotipe, yaitu AGT, AAT, GAT, AAC, dan GGC. Rasio (%) kelima kelompok genotipe

dari delapan puluh aksesi yang dianalisis, yaitu AGT : AAT : GAT : AAC : GAC = 33 : 16 : 17 : 15 : 18. Di antara lima kelompok genotipe tersebut kelompok genotipe AGT merupakan kelompok yang memiliki jumlah aksesi plasma nutfah paling banyak, yaitu sebanyak 26



Gambar 3. Salah satu hasil analisis aksesi plasma nutfah padi lokal Lantiak menggunakan marka SNP-*OsIRT1* dan SNP-*OsIRT2*.



Gambar 4. Pengelompokan aksesi-aksesi plasma nutfah padi berdasarkan analisis genotipe menggunakan marka Fe-SNP untuk gen *OsIRT1* dan *OsIRT2*. *Kelompok genotipe secara berurutan menunjukkan genotipe untuk marka Fe-SNP: SNP-*OsIRT1-1*, SNP-*OsIRT1-2*, dan SNP-*OsIRT2*.

Tabel 7. Hasil uji gabungan antara data genotipe dengan data fenotipe.

Trait	Lokus	F_Marker	P_Marker	Aksesi terpilih (Gerombol; kelompok genotipe)
Vegetatif	<i>OsIRT1-1</i>	1,38E-04	0,99	P Ketan Alay (5; GAT), Markuti
Vegetatif	<i>OsIRT1-2</i>	0,50	0,48	(2; GAT), Arias Halus (5; AAC),
Vegetatif	<i>OsIRT2</i>	10,02	0,01	Komas a (2; AAC), Lantiak
Generatif	<i>OsIRT1-1</i>	1,79	0,19	(2; AAT), Utri Deli (2; GAC)
Generatif	<i>OsIRT1-2</i>	3,08	0,08	

nomor atau 33% dari total aksesi yang dianalisis. Genotipe tersebut menunjukkan bahwa marka SNP-*OsIRT1* memiliki dua tipe SNP, yaitu (A) dan (G), yang keduanya merupakan tipe padi subspecies *indica*, sedangkan marka SNP-*OsIRT2* memiliki tipe SNP (T) yang merupakan tipe padi subspecies *japonica*. Apabila dilihat dari keragaman sifat toleransinya terhadap cekaman Fe, kelompok plasma nutfah dengan genotipe AGT didominasi oleh aksesi yang termasuk dalam gerombol 1 (empat belas dari total 26 aksesi), seperti ditampilkan pada Tabel 1. Jadi, kelompok aksesi dengan genotipe AGT sebagian besar bersifat toleran (skor 3) pada fase vegetatif dan agak toleran (skor 5) setelah masuk fase generatif.

Di samping kelompok genotipe AGT, terdapat kelompok genotipe yang lain yang juga didominasi oleh plasma nutfah yang termasuk gerombol 1, yaitu kelompok genotipe GAT. Pada kelompok genotipe GAT ini terdapat enam aksesi yang termasuk gerombol 1 dari total empat belas aksesi yang termasuk dalam kelompok genotipe GAT. Meskipun demikian, pada kelompok genotipe GAT ini juga terdapat beberapa aksesi yang termasuk dalam gerombol 2. Hal ini mengindikasikan bahwa kelompok genotipe GAT merupakan kelompok campuran antara aksesi yang bersifat toleran (karakter gerombol 2) dan juga yang bersifat peka (karakter gerombol 1). Di antara tiga kelompok genotipe yang lain, yaitu AAT, AAC, dan GAC, kelompok genotipe GAC didominasi oleh aksesi-aksesi plasma nutfah yang termasuk dalam gerombol 2, yaitu terdapat delapan dari lima belas aksesi yang termasuk kelompok genotipe GAC adalah aksesi yang termasuk dalam gerombol 2 dengan karakteristik toleran terhadap cekaman Fe.

Plasma nutfah yang termasuk dalam gerombol terbaik bersifat toleran keracunan Fe, yaitu gerombol 5, ternyata tersebar di beberapa kelompok genotipe yang berbeda-beda, dengan proporsi jumlah yang relatif kecil. Misalnya, IR54, P Ketan Alay, dan Arias Halus yang masing-masing termasuk dalam kelompok genotipe AAT, GAT, dan AAC.

Untuk menentukan genotipe Fe-SNP yang secara signifikan berkorelasi terhadap keragaman fenotipe yang diamati pada tanaman baik pada fase vegetatif

ataupun generatif, dilakukan uji gabungan (*association test*) antara data genotipe dengan data fenotipe melalui analisis GLM menggunakan program Tassel 2.1. Hasil analisis ini seperti ditampilkan pada Tabel 7 menunjukkan bahwa dari tiga marka Fe-SNP yang digunakan untuk analisis genotipe, marka yang paling signifikan berkorelasi terhadap keragaman fenotipe yang diamati adalah marka Fe-SNP untuk gen *OsIRT2*, yaitu signifikan terhadap tingkat toleransi tanaman terhadap keracunan Fe pada fase vegetatif (Nilai P = 0,01). Namun demikian, pemanfaatan marka ini sebagai marka penyeleksi terkait karakter toleran terhadap cekaman keracunan Fe masih perlu divalidasi, khususnya pada populasi segregasi.

Tabel 7 juga menunjukkan beberapa aksesi plasma nutfah yang terpilih bersifat toleran terhadap cekaman keracunan Fe tidak saja pada fase vegetatif tetapi juga generatif (termasuk dalam gerombol 2 dan 5) dengan genotipe yang bervariasi. Aksesi plasma nutfah tersebut adalah P Ketan Alay, Markuti, Arias Halus, Komas a, Lantiak, dan Utri Deli. Aksesi plasma nutfah tersebut merupakan aksesi plasma nutfah yang berpotensi memiliki alel gen toleran keracunan Fe, yaitu *OsIRT1* dan *OsIRT2*.

KESIMPULAN

Berdasarkan analisis gerombol data fenotipe 97 aksesi plasma nutfah padi, terdapat enam kelompok yang dua di antaranya (gerombol 2 dan 5) merupakan gerombol terbaik yang terdiri atas aksesi plasma nutfah toleran, baik pada fase vegetatif maupun generatif. Analisis keragaman genotipe menggunakan tiga marka SNP, yaitu SNP-*OsIRT1-1*, SNP-*OsIRT1-2*, dan SNP-*OsIRT2*, diperoleh lima kelompok genotipe, yaitu AGT, AAT, GAT, AAC, dan GGC. Kelompok genotipe AGT ini didominasi oleh aksesi yang termasuk dalam gerombol 1. Kelompok genotipe GAT merupakan kelompok campuran antara aksesi yang bersifat toleran dan peka. Kelompok genotipe GAC didominasi oleh aksesi plasma nutfah yang termasuk dalam gerombol 2. Plasma nutfah yang termasuk dalam gerombol terbaik, toleran keracunan Fe, yaitu gerombol 5, tersebar di beberapa kelompok genotipe yang berbeda-beda. Analisis gabungan antara menunjukkan marka SNP-

OsIRT2 paling signifikan berkorelasi terhadap sifat toleran terhadap keracunan Fe pada fase vegetatif (Nilai P = 0,01). Berdasarkan hasil penelitian, terpilih enam aksesi plasma nutfah toleran keracunan Fe, yaitu Ketan Alay, Markuti, Arias Halus, Komasa, Lantiak, dan Utri Deli. Aksesi-aksesi plasma nutfah tersebut berpotensi memiliki alel gen toleran keracunan Fe, yaitu *OsIRT1* dan *OsIRT2*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Siti Aam Amanah yang telah membantu dalam analisis statistik data-data hasil pengamatan. Penelitian ini dibiayai dari DIPA BB Biogen T.A. 2009 dengan kode DIPA BB Biogen: 04.03.04.1571.0460.524119.

DAFTAR PUSTAKA

- Asch, F., M. Becker, and D.S. Kpongkor. 2005. A quick and efficient screen for resistance to iron toxicity in lowland rice. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 168:764-773.
- Becker, M. and F. Asch. 2005. Iron toxicity in rice-conditions and management concepts. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 168:558-573.
- Eide, D., M. Broderius, J. Fett, and M.L. Guerinot. 1996. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:5624-5628.
- Eng, B.H., M.L. Guerinot, D. Eide, and M.H. Jr. Saier. 1998. Sequence analysis and phylogenetic characterization of the ZIP family of metal ion transport protein. *J. Membr. Biol.* 166:1-7.
- Gross, J., R.J. Stein, A.G. Fett-Neto, and J.P. Fett. 2003. Iron homeostasis related genes in rice. *Genet. Mol. Biol.* 26(4):477-497.
- Guerinot, M.L. 2000. The ZIP family of metal transporters. *Biochem. Biophys. Acta.* 1465:190-198.
- Hanarida, I. dan D.W. Utami. 2009. Uji toleransi plasma nutfah padi terhadap keracunan Fe di lapang dan desain primer Fe-SNP. *Warta Biogen* 5(1):8-11.
- Himatan. 2009. Pembentukan dan profil tanah. Himpunan Mahasiswa Ilmu Tanah (Himatan), Universitas Padjadjaran. <http://himatan06.wordpress.com>. [31 Januari 2011].
- Immanudin, S. 2007. Pengelolaan tanaman padi. <http://www.kabarindonesia.com/berita.php?pil=11&dn=20070415165544>. [15 April 2007].
- IRRI. 1996. Standard Evaluation System for Rice. 4th edition. International Rice Research Institute. Los Banos, Philippines. 52 p.
- Ishimaru, Y., M. Suzuki, T. Tsukamoto, K. Suzuki, M. Nakazono, T. Kobayashi, Y. Wada, S. Watanabe, S. Matsuhashi, M. Takahashi, H. Nakamishi, S. Mori, and N.K. Nishizawa. 2006. Rice plants take up iron as an Fe³⁺-phytosiderophores and as Fe²⁺. *Plant J.* 45:335-346.
- Ismunadji, M. 1990. Alleviating iron toxicity in lowland rice. *Indon. Agric. Res. Dev. J.* 12(4):67-72.
- Karson, M.J. 1982. *Multivariate Statistical Methods*. Iowa State University Press. Ames, Iowa, USA. 307 p.
- MacDiarmid, C.W., L.A. Gaither, and D. Eide. 2000. Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 19:2845-2855.
- Makarim, A.K., O. Sudarman, dan H. Supriadi. 1989. Status hara tanaman padi berkeracunan besi di daerah Batumarta, Sumatera Selatan. *Penelitian Pertanian* 9(4):166-170.
- Ottow, J.C.G., K. Prade, W. Bertenbreiter, and V.A. Jacq. 1989. Strategies to alleivate iron toxicity of wetland rice on acid sulfate soils. p. 205-211. *In* P. Deturk and F. Ponnam Peruma (eds.) *Rice Production on Acid Soil of the Tropics*. Proceeding of International Symposium. Institute of Fundamental Study. Kandy, Srilanka, 26-30 June 1989.
- Robinson, N.J., C.M. Procter, E.L. Connolly, and M.L. Guerinot. 1999. A ferric-chelate reductase for iron uptake from soil. *Nature* 397:694-697.
- Rogers, E.E., D.J. Eide, and M.L. Guerinot. 2000. Altered selectivity in an *Arabidopsis* metal transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:12356-12360.
- Utami, D.W., E.M. Septiningsih, T.S. Kadir, A. Nasution, I. Hanarida, dan T. Suhartini. 2009. Pencarian alel baru gen-gen ketahanan terhadap cekaman biotik dan abiotik. Laporan Tahun 2009. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Kementerian Pertanian. 39 hlm.
- Utami, D.W., E.M. Septiningsih, T.S. Kadir, Fatimah, dan S. Yuriyah. 2010. Pencarian alel untuk identifikasi gen ketahanan penyakit hawar daun bakteri *Xa7* pada plasma nutfah padi lokal Indonesia. *J. AgroBiogen* 6(1):1-9.
- Vert, G., J.F. Briat, and C. Curie. 2001. *Arabidopsis IRT2* gene encodes a root periphery iron transporter. *Plant J.* 26:181-189.
- Zeng, L. and M.C. Shanon. 2000. Salinity effects on seedling growth and yield components of rice. *Crop. Sci.* 40:996-1003.
- Zhao, H. and D. Eide. 1996. The *ZRT2* gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 271(38):23203-23210.