

IDENTIFIKASI MARKA GEN KETAHANAN HAWAR DAUN BAKTERI PADA GALUR PADI INTRODUKSI DAN GALUR DIHAPLOID

Ovi Prasetya Winandari¹, Aris Tjahjoleksono², & Dwinita Wikan Utami³

¹Program Studi Biologi Tumbuhan, Departemen Biologi, Institut Pertanian Bogor

²Departemen Biologi, Institut Pertanian Bogor, Dramaga Bogor 16680, Indonesia

³Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB-BIOGEN), Bogor 16111, Indonesia

E-mail: dnitawu@windowslive.com/081388019811

ABSTRACT

Identification marker of bacterial leaf blight (BLB) gene resistance on introduced and dihaploid rice germplasm. Bacterial leaf blight (BLB), caused by bacterial pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo), is one of the most devastating diseases in rice. The use of BLB-resistant rice varieties is one of the most efficient ways to protect rice from this disease. BLB-resistant varieties can be produced through the breeding program by using the diverse rice germplasm. The objective of this research was to identify BLB resistance gene on 37 introduced and dihaploid rice lines derived from wide genetic background double crossing from local rice : IR54/Parekaligolara and Bio110/Markuti, by using the molekular markers. As control plant used 23 differential varieties (monogenic lines/IRBB) and TN1 (susceptible). All plants tested were inoculated by 3 selected dominant BLB races (Race III, IV dan VIII). The selected of 19 polymorphism molekular markers used to identify the BLB resistance genes on rice lines tested. The result of this research showed that 4 rice lines were resistance to all BLB races tested. Three molekular markers were specific associated with resistant gene to Race III (Xa7-STS40, Xa1-STS14 and Xa4-STS50); Race IV (Xa1-STS5, Xa4-STS50 and Xa26-STS1), and Race VIII (Xa21-STS6, Xa7-RM20590 and Xa7-STS40). These markers could be utilized for the selection process the developmen of BLB resistance rice lines breeding program.

Key words: double crossing, markers associated, molekular markers

ABSTRAK

Identifikasi marka gen ketahanan hawar daun bakteri pada galur padi introduksi dan galur dihaploid. Hawar Daun Bakteri (HDB), merupakan salah satu penyakit utama pada padi yang disebabkan oleh bakteri patogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo). Penggunaan varietas tahan HDB dipandang sebagai cara efisien untuk melindungi tanaman padi dari penyakit HDB. Perakitan varietas padi tahan HDB dapat dilakukan dengan persilangan beberapa sumber plasma nutfah padi. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi gen tahan penyakit HDB pada 37 galur padi introduksi dan galur dihaploid yang diperoleh dari hasil persilangan ganda beberapa aksesori plasma nutfah padi lokal, IR54/Parekaligolara dan Bio110/Markuti, menggunakan marka molekuler. Sebagai tanaman kontrol digunakan 22 varietas diferensial (*monogenic lines/IRBB*) dan TN1, sebagai tanaman kontrol peka. Tanaman-tanaman uji di inokulasi dengan 3 Ras HDB dominan (Ras III, IV dan VIII). Berdasarkan survei polimorfisme antara tanaman tahan dan peka, terdapat 19 marka polimorfis yang selanjutnya digunakan untuk menyeleksi galur-galur uji. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 37 galur yang diuji terdapat 4 galur bersifat tahan terhadap ketiga ras uji. Galur-galur ini sebagai calon galur harapan setelah diuji potensi daya hasilnya. Tiga marka terdeteksi spesifik menandai sifat ketahanan terhadap: Ras III (Xa7-STS40, Xa1-STS14 dan Xa4-STS50), Ras IV (Xa1-STS5, Xa4-STS50, Xa26-STS1) dan Ras VIII (Xa21-STS6, Xa7-RM20590 dan Xa7-STS40). Marka-marka ini dapat digunakan untuk membantu proses seleksi dalam program pembentukan galur tahan HDB.

Kata kunci: asosiasi marka, marka molekuler, persilangan ganda

PENDAHULUAN

Padi (*Oryza sativa* L.) merupakan salah satu tanaman pangan utama di dunia (Mudingotto *et al.*, 2010). Di Indonesia, padi merupakan bahan makanan pokok sehingga kebutuhan padi semakin meningkat

setiap tahunnya (Siregar, 2007) seiring dengan peningkatan jumlah penduduk. Peningkatan kebutuhan terhadap padi tidak berbanding lurus dengan peningkatan produksi padi. Berdasarkan data dari BPS (2011), produktivitas padi mengalami penurunan sebanyak 1,08 juta ton (1,63%) per tahun sedangkan laju pertumbuhan

penduduk meningkat 1,49% per tahun. Oleh karena itu, sejalan dengan peningkatan jumlah penduduk, maka peningkatan produksi padi harus senantiasa diupayakan. Upaya peningkatan produksi padi tidak terlepas dari kendala-kendala cekaman biotik dan abiotik. Cekaman biotik antara lain serangan hama seperti wereng coklat, penggerek batang dan ganjur, serta penyakit seperti Hawar Daun Bakteri (HDB) dan Blas. Cekaman abiotik meliputi kekeringan, keracunan besi (Fe) dan Al (aluminium) (Abdullah *et al.*, 2001).

Penyakit hawar daun bakteri menyebabkan penurunan produksi padi yang cukup tinggi. Di Indonesia, HDB menyebabkan penurunan hasil panen yang signifikan dan dalam keadaan tertentu dapat menurunkan produksi sampai 60% (Triny *et al.*, 2011). Penyakit HDB merupakan penyakit yang disebabkan oleh bakteri patogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) (Wahyudi *et al.*, 2011).

Indonesia dikenal memiliki keanekaragaman spesies padi yang tinggi dan memiliki sekitar 17.000 aksesori plasma nutfah (Fitriyanti, 2008). Keragaman genetik plasma nutfah padi merupakan pondasi program pemuliaan tanaman padi. Di antara koleksi plasma nutfah padi yang memiliki keragaman genetik yang luas adalah aksesori padi lokal (*landraces*) dan aksesori galur-galur introduksi dari luar negeri (Utami *et al.*, 2011).

Ketersediaan aksesori plasma nutfah yang beragam telah dimanfaatkan oleh Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik (BB-Biogen) sebagai sumber genetik untuk melakukan pembentukan galur-galur padi baru yang diantaranya ditargetkan sebagai galur padi tahan penyakit HDB. Galur-galur padi yang digunakan pada penelitian ini meliputi varietas diferensial dan galur-galur yang diantaranya merupakan galur hasil persilangan ganda antara padi Parekaligolara/IR54 dengan padi BIO 110/Markuti. Padi Parekaligolara memiliki gen ketahanan terhadap patogen HDB, IR54 memiliki gen ketahanan terhadap patogen Blas dan gen toleran terhadap kahat P, BIO 110 memiliki gen ketahanan HDB dan Blas, dan Markuti memiliki gen toleran terhadap keracunan Fe (Utami *et al.*, 2009). Di samping itu juga telah diintroduksi galur-galur yang berasal dari IRRI yang berpotensi memiliki sifat-sifat unggul yang tahan penyakit HDB. Berdasarkan ketersediaan galur-galur padi di atas, maka perlu dilakukan identifikasi adanya gen ketahanan terhadap penyakit HDB baik secara fenotipe dengan inokulasi buatan maupun secara genotipe dengan menggunakan marka molekuler. Tujuan dari penelitian ini adalah mengidentifikasi gen ketahanan penyakit Hawar Daun Bakteri pada galur-galur padi introduksi

dan galur-galur dihaploid baik secara fenotipe ataupun genotipe.

METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari sampai Desember 2013 di Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (BB-Biogen), Bogor.

Bahan Penelitian. Populasi tanaman yang diuji berjumlah 37 galur yang terdiri atas galur-galur introduksi dan galur-galur dihaploid dari hasil persilangan beberapa padi terpilih, yaitu IR54/Parekaligolara//Bio110/Markuti. Sebanyak 22 varietas padi diferensial yang telah diketahui memiliki gen ketahanan HDB juga digunakan sebagai pembanding sifat ketahanan padi yang diuji. Varietas IRBB7 digunakan sebagai kontrol tahan dan TN1 sebagai kontrol peka. Evaluasi fenotipe, setiap tanaman diuji ketahanannya terhadap Ras III, IV dan VIII. Evaluasi genotipe, DNA diekstrak dari daun masing-masing galur untuk mengamplifikasi gen ketahanan HDB. Sebanyak 208 primer yang digunakan terdiri atas primer untuk marka *Simple Sequence Repeat* (SSR) gen *Xa7* dan primer untuk marka *Sequence Tag Site* (STS) gen *Xa1*, *Xa4*, *Xa7*, *Xa13*, *Xa21*, *Xa22*, dan *Xa26*. Uji polimorfisme dilakukan terhadap varietas IRBB7 dan TN1. Kemudian marka yang bersifat polimorfisme digunakan dalam uji genotipe sifat ketahanan galur-galur uji dan galur diferensial terhadap penyakit HDB.

Penyiapan Inokulum Bakteri. Inokulum bakteri *Xanthomonas oryzae* disiapkan dengan cara meremajakan isolat yang telah tersedia yaitu Ras III, IV dan VIII pada cawan Petri dengan media agar (20 g sukrose, 5 g peptone, 0,5 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1,8 g $\text{Na}_2 \cdot 4\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 18 g Bacto Agar dalam 1 liter dH_2O). Bakteri diinkubasikan di dalam inkubator bersuhu 37°C selama 3 hari.

Penyiapan Tanaman. Benih padi varietas diferensial maupun galur uji dikecambahkan dengan cara direndam air dalam cawan Petri selama 1 minggu sebelum penanaman. Selanjutnya, kecambah ditanam dalam pot plastik (40x30x12 cm) yang telah diisi dengan media tanah. Enam benih per galur ditanam dalam setiap baris.

Inokulasi Bakteri. Bakteri yang telah tumbuh pada cawan Petri kemudian diresuspensikan dengan ddH_2O sebanyak 25 ml menggunakan spatula. Selanjutnya

suspensi bakteri dipindahkan ke dalam labu Erlenmeyer 50 ml dan digunakan sebagai inokulum. Inokulasi pada tanaman dilakukan dengan cara memotong ujung daun ke-3 dan ke-4 dari setiap tanaman menggunakan gunting yang sebelumnya dicelupkan ke dalam suspensi bakteri. Inokulasi dilakukan ketika tanaman berumur 1 bulan.

Pengamatan Fenotipe dan Evaluasi Ketahanan.

Pengamatan terhadap penyakit HDB dilakukan pada hari ke-14 setelah proses inokulasi. Intensitas serangan bakteri dihitung dengan membagi panjang serangan dengan panjang daun yang diinokulasi. Hasil pengamatan terhadap tingkat keparahan serangan *Xoo*, diklasifikasikan berdasarkan kriteria ketahanan menurut *Standard Evaluation System* (IRRI, 1996).

Isolasi DNA. Isolasi DNA dilakukan berdasarkan metode Doyle & Doyle (1990). Daun tanaman direndam di dalam nitrogen cair kemudian dimasukkan ke dalam mesin *TissueLyserII* Qiagen untuk proses perusakan dinding sel. Sampel ditambah dengan 750 µl larutan penyangga *cetyltrimethyl ammonium bromide* (CTAB) dan diinkubasi pada suhu 60°C selama 30 menit. Sampel ditambah dengan 750 µl kloroform:isoamil-alkohol (24:1) dan disentrifugasi dengan *Legend Micro 17 R centrifuge* selama 5 menit pada suhu 4°C dengan kecepatan 12.000 rpm. Supernatan diambil sebanyak 500 µL dan dipindahkan ke dalam tabung baru, kemudian ditambah 100 µl natrium asetat 3 M pH 5,2 dan 1000 µl etanol absolut. Sampel didiamkan di dalam lemari es

selama 60 menit. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi kembali pada 12.000 rpm dengan suhu 4°C selama 10 menit. Selanjutnya supernatan dibuang kemudian endapan ditambah dengan 200 µl etanol 70% untuk membilas. Endapan tersebut kemudian dikeringkan dan dilarutkan dalam 100 µL TE (Tris-HCl 40 mM pH 8,3, EDTA 1 mM) sebagai larutan stok DNA dan ditambahkan RNase (SIGMA) 100 µg/µl sebanyak 1,5 µl agar diperoleh DNA yang tidak terkontaminasi oleh RNA.

Amplifikasi DNA. PCR dilakukan dalam dua tahap, tahap pertama adalah PCR untuk uji survei polimorfisme, dimana marka yang menghasilkan pita polimorfisme digunakan untuk tahap PCR yang kedua yaitu PCR untuk uji genotipe semua galur padi. Dari 208 primer yang digunakan, ada 19 primer yang menunjukkan pita polimorfisme (Tabel 1). Reaksi PCR dilakukan dengan menggunakan volume 10 µL terdiri atas 4,5 µl *master mix* PCR KAPA®BIOSYSTEMS US (larutan penyangga, dNTP, enzim *Taq polymerase*), 1,5 µl primer 10 µM (*forward* dan *reverse*), dan 4 µl DNA 10 ng/µl. Tahap-tahap PCR untuk marka STS meliputi proses denaturasi awal 4 menit pada suhu 95°C, dilanjutkan denaturasi selama 45 detik pada suhu 95°C, annealing selama 45 detik pada suhu 55°C, ekstensi primer selama 30 detik pada suhu 72°C. Tahap denaturasi, *annealing* dan ekstensi primer diulang sebanyak 27 kali, dengan program penurunan suhu annealing secara teratur dengan perbedaan sebanyak 0,5°C setiap siklusnya agar

Tabel 1. Primer hasil survei polimorfisme

Nama primer	Jenis Marka	Sekuen primer forward (5' → 3')	Sekuen primer reverse (5' → 3')
Xa1-ST5	STS	TTTCTGGCGCTTTTCTTGT	CGACCAACAGCATGTACCAC
Xa1-ST7	STS	TCATTC AATCAAATCTCAACTGAAG	CATGTTTTGGACGCTTCCTC
Xa1-ST13	STS	ACGGCCCTACTGATCAATGC	TCGAGTTATGATGCGGATACAC
Xa1-ST14	STS	CTAGCTTTTGAGGCGGTGAC	GGATGCACGAATACTACTGCT
Xa1-ST15	STS	CATGGAATCTTGCCCTAGA	CGCTATCGACCTGAGGAGAC
Xa1-ST31	STS	CCTCTCTTGCTTCCTTGTTGG	GCTCAAGCACTCACCAACA
Xa4-ST28	STS	TTTCTTTCATGCTGGTGCTG	CAAGTCTTTTGCCGCTTTTC
Xa4-ST44	STS	GGGGCTCTAGGTTTTCCATC	GTAGGGAACCATGGATGTGG
Xa4-ST50	STS	TTCGGGTATGCCTTGTTTTTC	GGCCGAATTACGTGTGAAGT
Xa7-ST40	STS	CTACACACGCGAGGAAGACA	ATGGCAGTAGCGTAGCGAGT
Xa7-ST51	STS	GAATTGGCCCAACTTTGAGA	TGGGATTTGGGATTTGGATA
Xa7-ST54	STS	GGCAAGTGTTGACCGTTAT	AGGCCTAAGAAAGGCGAAAG
Xa13-ST51	STS	ACGTGTCCAATCAAAGCACA	GTCAAACGTTGCAAGCAAAA
Xa21-ST6	STS	AGCTAGCTGCTCGCAATCTC	CTAGCCTCGCCTTCTACGAC
Xa21-ST27	STS	ATGAATCCCTGCCGTCGTA	GATTCAGTACCTGACGAG
Xa22-ST17	STS	TGCACACTTGGTTTCAGCTC	TCTCCTTTGCTACGGCAGAT
Xa26-ST1	STS	TGACCTCACTGCACTTCTGG	TGGAGAGGTTCCCTATGGTG
Xa26-ST2	STS	GTAAAGCGTACGGAAGAGC	TTCTTCAACGTCACAACAACATC
Xa7-RM20590	SSR	TTCGATGAGCACCTTTCCTTGTC	GCCTCGCCGATTCACTTATGC

diperoleh suhu optimum untuk penempelan primer, kemudian diikuti dengan proses ekstensi primer akhir selama 5 menit pada suhu 72°C. Tahap terakhir adalah inkubasi pada suhu 10°C selama 30 menit (Utami *et al.*, 2011). Sedangkan proses PCR untuk marka SSR meliputi proses denaturasi awal 3 menit pada suhu 95°C, dilanjutkan denaturasi selama 1 menit pada suhu 94°C, *annealing* selama 1 menit pada suhu 50°C, ekstensi primer selama 2 menit pada suhu 72°C. Tahap denaturasi, *annealing* dan ekstensi primer diulang sebanyak 35 kali, kemudian diikuti dengan proses ekstensi primer akhir selama 5 menit pada suhu 72°C. Tahap terakhir adalah inkubasi pada suhu 10°C selama 30 menit (Utami *et al.*, 2009).

Produk PCR dipisahkan pada elektroforesis gel agarosa 2% dalam *Tris-acetic acid-EDTA* (TAE) 1x pada tegangan 100 V selama 30 menit, kemudian divisualisasi dengan sinar UV setelah direndam dalam etidium bromida (2µg/µl).

Analisis Data. Hasil uji genotipe diasosiasikan dengan hasil uji fenotipe. Analisis dilakukan menggunakan program Tassel 3.0 GLM (Bradbury *et al.*, 2007). Marka yang berasosiasi dengan respon fenotipe (*P-value* kurang dari 0,05) menunjukkan bahwa marka tersebut berasosiasi dengan respon ketahanan tanaman terhadap Ras penyakit HDB yang diinokulasikan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Fenotipe terhadap Respon Ketahanan Varietas Diferensial (IRBB). Hasil uji fenotipe varietas diferensial menunjukkan adanya respon yang berbeda terhadap Ras III, Ras IV dan Ras VIII (Tabel 2). Di antara varietas-varietas diferensial yang memiliki satu gen ketahanan (monogenik), respon paling tahan ditunjukkan oleh varietas padi IRBB7 yang mengandung gen ketahanan *Xa7*, dimana varietas IRBB7 ini mampu bertahan terhadap serangan patogen Ras III, Ras IV dan ras VIII. Selanjutnya diikuti oleh varietas diferensial

Tabel 2. Respon ketahanan padi varietas diferensial terhadap HDB

Varietas /Galur	Gen	Respon Ketahanan terhadap HDB					
		Ras-III		Ras-IV		Ras-VIII	
		IS (%)	Respon	IS (%)	Respon	IS (%)	Respon
IRBB1	<i>Xa1</i>	10,20	T	36,00	AT	51,53	P
IRBB2	<i>Xa2</i>	10,10	T	37,08	AT	50,43	P
IRBB3	<i>Xa3</i>	9,70	T	49,75	P	56,35	P
IRBB4	<i>Xa4</i>	9,70	T	47,90	P	49,33	P
IRBB5	<i>Xa5</i>	7,60	T	12,08	T	23,57	AT
IRBB7	<i>Xa7</i>	0,00	T	0,00	T	0,00	T
IRBB8	<i>Xa8</i>	11,10	T	46,83	P	32,05	AT
IRBB10	<i>Xa10</i>	11,20	T	53,00	P	46,67	P
IRBB11	<i>Xa11</i>	10,80	T	52,38	P	50,22	P
IRBB13	<i>Xa13</i>	9,00	T	44,32	P	46,22	P
IRBB14	<i>Xa14</i>	12,20	T	53,25	P	43,22	P
IRBB21	<i>Xa21</i>	5,60	T	21,28	AT	15,88	T
IRBB50	<i>Xa4+Xa5</i>	5,40	T	5,05	T	11,82	T
IRBB51	<i>Xa4+Xa13</i>	10,10	T	46,08	P	46,22	P
IRBB52	<i>Xa4+Xa21</i>	4,20	T	12,92	T	9,45	T
IRBB53	<i>Xa5+Xa13</i>	3,40	T	4,70	T	6,25	T
IRBB54	<i>Xa5+Xa21</i>	3,80	T	5,47	T	5,62	T
IRBB56	<i>Xa4+Xa5+Xa13</i>	5,80	T	5,63	T	11,37	T
IRBB57	<i>Xa4+Xa5+Xa21</i>	10,00	T	40,00	AT	30,35	AT
IRBB58	<i>Xa4+Xa13+Xa21</i>	8,10	T	8,82	T	17,50	T
IRBB64	<i>Xa4+Xa5+Xa7+Xa21</i>	1,10	T	0,22	T	3,03	T
IRBB66	<i>Xa4+Xa5+Xa7+Xa13+Xa21</i>	1,20	T	1,48	T	3,22	T
TN1		43,70	P	79,93	P	63,65	P

IS: Intensitas Serangan, T: Tahan, AT: Agak Tahan, P: Peka.

Tabel 3. Respon ketahanan padi galur uji terhadap HDB

Galur/Varietas	Respon ketahanan terhadap HDB					
	Ras III		Ras IV		Ras VIII	
	IS (%)	Respon	IS (%)	Respon	IS (%)	Respon
IR 83821-95-3-2-3	50,26	P	61,32	P	65,52	P
IR 83860-503-1-1-2	37,88	AT	58,96	P	66,60	P
IR 83860-513-3-3-2	73,69	P	43,36	P	58,33	P
IR 84047-24-3-3-3	11,09	T	20,68	AT	16,71	T
IR 84941-12-1-2	39,79	AT	59,41	P	52,82	P
IR 83650-59-2-5-2-2	8,47	T	3,21	T	20,21	AT
IR 3822-512-3-2-2	8,47	T	2,95	T	15,08	T
IR 83689 -14-1-2-1-3	25,97	AT	17,93	T	42,49	P
IR 84744-94-3-3-2	83,71	P	22,80	AT	58,75	P
IR 84790-73-2-2-2	41,84	P	20,67	AT	62,39	P
IR 85627-46-1-2-3	45,77	P	23,20	AT	52,06	P
IR 82571-581-1-2-3	8,70	T	10,04	T	11,80	T
IR 82571-602-3-2-2	8,89	T	7,20	T	13,94	T
IR 82480-104-2-2-3-2	66,13	P	44,33	P	50,43	P
IR 10L 369	40,54	P	21,08	AT	52,45	P
IR 10L 440	54,38	P	71,87	P	64,49	P
IR 74371-70-1-1	51,15	P	64,32	P	71,09	P
IR 74371-54-1-1	52,98	P	73,25	P	75,99	P
IR 80311-10-B-B-2-B	79,36	P	65,21	P	53,92	P
IR 77408-40-3-2-1-B	49,88	P	36,00	AT	59,77	P
IR 54741-1-244-15-2-3-B	31,13	AT	7,60	T	51,05	P
BERAS MERAHD1	5,56	T	6,04	T	12,26	T
BM1P-46-4-1	23,50	AT	7,65	T	29,92	AT
IPBM-32-1-3-3	27,31	AT	7,37	T	32,11	AT
BMIP-18-4-4-1	30,58	AT	7,74	T	37,39	AT
BMIP-18-4-4-2	40,00	AT	38,90	AT	45,90	P
BMIP-24-4-3-1	33,96	AT	38,34	AT	45,22	P
BMIP-204-3-2	30,79	AT	30,82	AT	43,18	P
BMIP-24-1-2-1	30,20	AT	31,21	AT	35,67	AT
BMIP-44-4-3-1	25,65	AT	22,87	AT	28,68	AT
BMIP-44-4-3-2	24,02	AT	21,63	AT	32,05	AT
BMIP-20-2-1-1	26,99	AT	27,96	AT	37,36	AT
IRHS-12-4-1	47,38	P	56,86	P	67,79	P
Ciherang	25,71	AT	13,78	T	54,00	P
Inpari 13	21,53	AT	6,03	T	36,61	AT
Code	15,89	T	1,71	T	28,53	AT
IR64	63,79	P	64,92	P	54,10	P
IRBB7	14,46	T	1,57	T	11,48	T
TN1	55,33	P	73,04	P	75,07	P

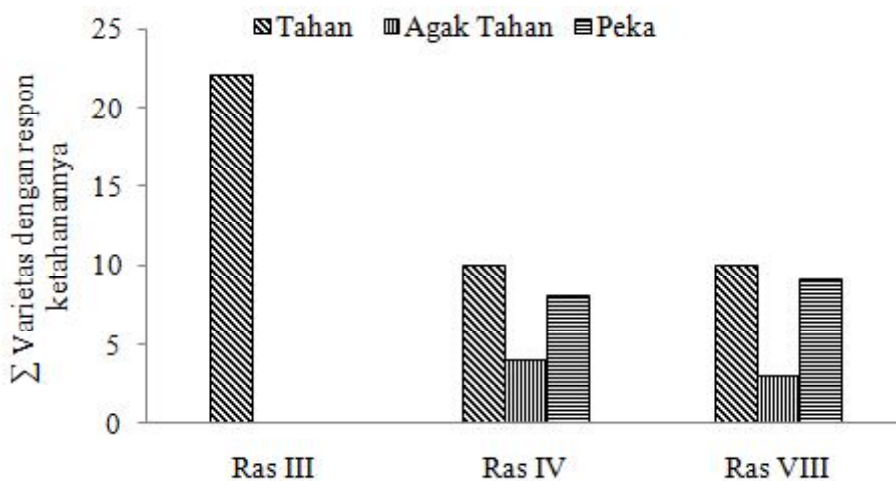
IS: Intensitas Serangan, T: Tahan, AT: Agak Tahan, P: Peka.

IRBB5 yang mengandung gen ketahanan *Xa5* dan IRBB21 yang mengandung gen ketahanan *Xa21*.

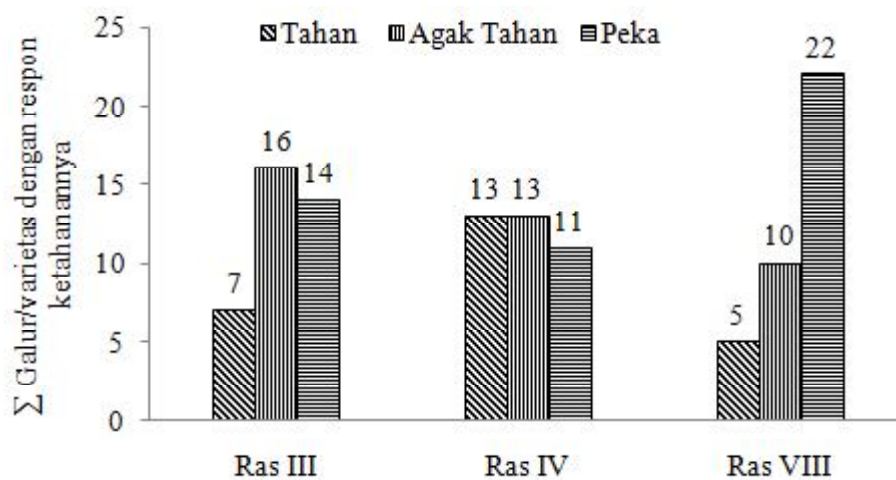
Varietas diferensial yang memiliki dua gen ketahanan (digenik) dan varietas diferensial yang memiliki lebih dari dua gen ketahanan (multigenik) ternyata memiliki respon yang berbeda dari varietas yang memiliki satu gen ketahanan (monogenik). Hal ini biasa disebut dengan efek *pyramiding gene*. Efek ini dapat menimbulkan respon positif (tahan), tetapi ada juga yang tidak menunjukkan respon (sama dengan sifat monogenik). Efek *pyramiding gene* yang positif memberikan respon tahan pada penelitian ini antara lain varietas IRBB50 (*Xa4+Xa5*), IRBB52 (*Xa4+Xa21*), IRBB53 (*Xa5+Xa13*), IRBB54 (*Xa5+Xa21*), IRBB56 (*Xa4+Xa5+Xa13*), IRBB57 (*Xa4+Xa5+Xa21*), IRBB58 (*Xa4+Xa13+Xa21*), IRBB64 (*Xa5+Xa7+Xa21*), dan IRBB66 (*Xa4+Xa5+Xa7+Xa13+Xa21*). Efek *pyramiding*

gene yang tidak memberikan respon terhadap patogen Ras tertentu ditunjukkan pada varietas IRBB51 (*Xa4+Xa13*), dimana efek tersebut menunjukkan ekspresi yang sama dengan sifat monogenik *Xa4* dan *Xa13* terhadap patogen Ras IV dan Ras VIII.

Uji Fenotipe terhadap Respon Ketahanan pada Galur-Galur Uji. Padi galur uji menunjukkan respon ketahanan yang bervariasi terhadap Ras III, IV, dan VIII (Tabel 3). Pada Gambar 2 dapat dilihat bahwa untuk ketahanan terhadap Ras III, terdapat 7 galur uji yang tahan, 16 galur uji bersifat agak tahan dan 14 galur uji bersifat peka. Respon ketahanan terhadap Ras IV menunjukkan 18 galur bersifat tahan, 13 galur uji bersifat agak tahan dan 6 galur uji bersifat peka. Sedangkan respon ketahanan terhadap Ras VIII menunjukkan 6 galur uji bersifat tahan, 10 galur uji bersifat agak tahan dan 21 galur uji bersifat peka (Gambar 1 & 2).



Gambar 1. Ketahanan padi varietas diferensial terhadap Ras III, Ras IV, dan Ras VIII



Gambar 2. Ketahanan padi galur uji terhadap Ras III, Ras IV, dan Ras VIII

Dari 37 galur uji, diperoleh 4 galur yang bersifat tahan terhadap semua Ras uji. Pendugaan adanya gen ketahanan pada galur uji tersebut didasarkan pada respon ketahanannya yang sama dengan varietas diferensial yang memiliki gen monogenik (Tabel 4).

Uji Genotipe untuk Survei Polimorfisme. Uji ini bertujuan untuk menyeleksi 208 primer untuk marka terkait gen ketahanan HDB (*Xa*) tertentu yang bersifat polimorfis pada tanaman kontrol peka TN1 dan tanaman kontrol tahan IRBB7. Jika pada survei polimorfisme ini memperlihatkan pita yang berbeda ukuran pada padi kontrol peka dan padi kontrol tahan, maka marka tersebut bersifat polimorfis. Hal ini mengindikasikan bahwa marka yang digunakan tersebut dapat digunakan dalam seleksi populasi galur uji.

Uji Genotipe pada Populasi Uji. Berdasarkan hasil uji polimorfisme, diperoleh 19 marka bersifat polimorfis

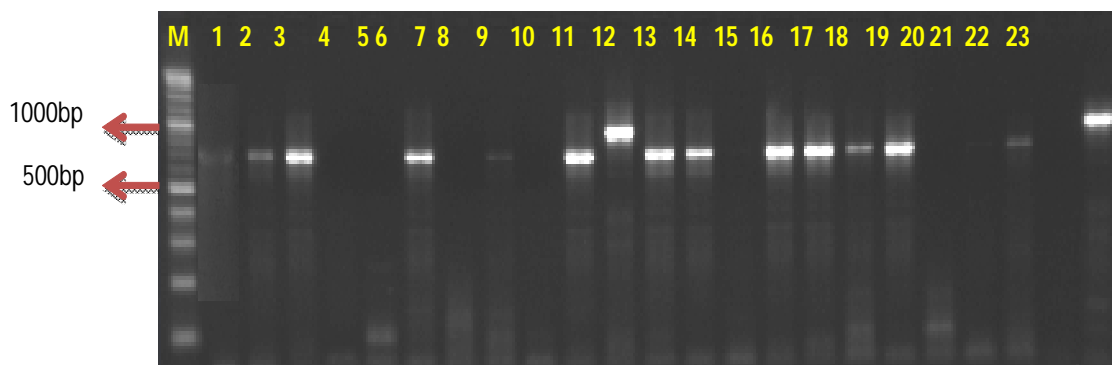
dan selanjutnya digunakan untuk analisis genotipe populasi uji terkait dengan sifat ketahanan penyakit HDB. Hasil uji genotipe pada populasi uji salah satunya dapat ditunjukkan pada Gambar 3.

Analisis Asosiasi Fenotipe dan Genotipe pada Galur Uji. Berdasarkan analisis fenotipe dan genotipe, diperoleh asosiasi dari keduanya. Asosiasi fenotipe dan genotipe ditunjukkan pada Tabel 5. Hasil analisis asosiasi menunjukkan bahwa Ras III berasosiasi dengan 3 marka spesifik yang mengenali sifat ketahanan pada galur uji yaitu Xa7-STS40, Xa1-STS14 dan Xa4-STS50. Ras IV berasosiasi dengan 3 marka spesifik yang mengenali sifat ketahanan yaitu Xa1-STS5, Xa4-STS50 dan Xa26-STS1. Ras VIII juga berasosiasi dengan 3 marka yang menandai sifat ketahanan pada galur uji, yaitu Xa21-STS6, Xa7-RM20590 dan Xa7-STS40. Semua Ras berasosiasi marka spesifik dengan nilai *P-value* di bawah 0,05 (Tabel 5).

Tabel 4. Pendugaan gen galur uji

Varietas diferensial	Ras III	Ras IV	Ras VIII	Galur Uji
IRBB7 (Xa7)	T	T	T	IR 3822-512-3-2-2
				IR 82571-581-1-2-3
				IR 82571-602-3-2-2
				BERAS MERAHD1
IRBB5 (Xa5)	T	T	AT	IR 83650-59-2-5-2-2
IRBB21 (Xa21)	T	AT	T	IR 84047-24-3-3-3

T: tahan dan AT: agak tahan.



Gambar 3. Salah satu hasil PCR menggunakan primer Xa1-STS5 pada varietas diferensial. Keterangan: M:100bp; 1:IRBB1; 2:IRBB2; 3:IRBB3; 4:IRBB4; 5:IRBB5; 6:IRBB7; 7:IRBB8; 8:IRBB10; 9:IRBB11; 10:IRBB13; 11:IRBB14; 12:IRBB21; 13:IRBB50; 14:IRBB51; 15:IRBB52; 16:IRBB53; 17:IRBB54; 18:IRBB56; 19:IRBB57; 20:IRBB58; 21:IRBB64; 22:IRBB66 dan 23:TN1

Tabel 5. Hasil analisis asosiasi fenotipe dan genotipe pada galur uji

Ras	Marka	P-Value	Galur Uji
Ras III	Xa7-OP40	0,0001**	Beras Merah D1 IR 83822-512-3-2-2 IR 82571-581-1-2-3 IR 82571-602-3-2-2 IR 83650-59-2-5-2-2
Ras III	Xa1-OP14	0,0008**	IR 83822-512-3-2-2
Ras III	Xa4-OP50	0,0013**	IR 85627-46-1-2-3 IR 83822-512-3-2-2
Ras IV	Xa1-OP5	0,039**	Beras Merah D1 BMIP-18-4-4-1 IPBM-32-1-3-3
Ras IV	Xa4-OP50	0,036*	IR 82571-581-1-2-3 IR 82571-602-3-2-2
Ras IV	Xa26-OP1	0,032*	IR 83650-59-2-5-2-2 IR 83689-14-1-2-1-3
Ras VIII	Xa21-OP6	0,005*	IR 3822-512-3-2-2
Ras VIII	Xa7-RM20590	0,013*	IR 82571-581-1-2-3
Ras VIII	Xa7-OP40	0,010*	IR 82571-602-3-2-2

** P -value $\leq 0,05$ pada P -permutasi; * P -value $\leq 0,05$ pada P -marker.

SIMPULAN

Hasil evaluasi ketahanan HDB pada 37 galur uji terdapat 4 galur tahan terhadap ketiga ras HDB yang diujikan yaitu galur : IR 3822-512-3-2-2, IR 82571-581-1-2-3, IR 82571-602-3-2-2 dan Beras MerahD1. Hasil dari analisis asosiasi terdeteksi 3 set marka spesifik yang masing-masing set menandai sifat ketahanan terhadap Ras III yaitu Xa7-STS40, Xa1-STS14 dan Xa4-STS50; terhadap Ras IV yaitu Xa1-STS5, Xa4-STS50, Xa26-STS1; dan terhadap Ras VIII yaitu Xa21-STS6, Xa7-RM20590 dan Xa7-STS40. Marka-marka ini dapat dimanfaatkan untuk membantu proses seleksi galur-galur tahan HDB hasil dari program pemuliaan.

SANWACANA

Terima kasih disampaikan kepada Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB-BIOGEN) yang telah membantu dalam hal pendanaan melalui proyek penelitian Peningkatan Kemampuan Peneliti dan Perekayasa (PKPP) No.X.110, Tahun 2012.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah B, Brar DS, & Carpena AL. 2001. Introgression of bacterial leaf blight resistance gene from *Oryza minuta* J.B. Presl. Ex C. B. Presl. into new rice type (*Oryza sativa* L.). *Bul Agron.* 29(2): 50–58.
- [BPS] Badan Pusat Statistik. 2011. *Berita Resmi Statistik*. No.69/11/Th.XIV. Jakarta. BPS.
- Bradbury PJ, Zhang Z, Kroon DE, Casstevens TM, Ramdoss Y, & Buckler ES. 2007. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics.* 23(19): 2633–2635.
- Doyle JJ & Doyle JJ. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus.* 12(1): 13–15.
- Fitriyanti. 2008. Keragaman genetik plasma nutfah beberapa genotip padi asal Sumatra Barat berdasarkan analisis penanda RAPD [Tesis]. Padang: Universitas Andalas.
- [IRRI] International Rice Research Institute. 1996. *Standard Evaluation System for Rice*. 4th Ed. IRRI Philippines. 52p.

- Mudingotto PJ, Tusiime G, Asea G, Rubaihayo PR, Gibson P, Tumutegyereize J, & Lamo J. 2010. Genetics of resistance to bacterial leaf blight in rice germplasm in Uganda. *Second RUFORUM Biennial Meeting 20 - 24 September 2010*. Kampala (UG): Makerere University.
- Siregar AZ. 2007. Hama-hama tanaman padi [Disertasi]. Medan: Universitas Sumatra Utara.
- Triny SK, Suryadi Y, Sudir, & Machmud M. 2011. *Penyakit Bakteri Padi dan Cara Pengendaliannya*. Bogor: Balai Besar Penelitian Tanaman Padi.
- Utami DW, Septiningsih EM, Kadir TS, Nasution A, Hanarida I, & Suhartini T. 2009. Pencarian alel baru gen-gen untuk ketahanan hawar daun bakteri. Dalam: *Buku laporan Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian*. Bogor. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian Kementrian Pertanian. Hlm 39–44.
- Utami DW, Sutoro, Nurul H, Andari R, & Ida H. 2011. Keragaman genetik 96 aksesori plasma nutfah padi berdasarkan 30 marka SSR terpaut gen pengatur waktu pembungaan (HD Genes). *J. Agro. Biogen*.7(2): 76–84.
- Wahyudi AT, Meliah S, & Nawangsih AA. 2011. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* bakteri penyebab hawar daun pada padi: isolasi, karakterisasi, dan telaah mutagenesis dengan transposon. *Makara Sains*. 15(1): 89–96.