

Keragaman Genetik *Peronosclerospora maydis* Penyebab Bulai pada Jagung Berdasarkan Analisis Marka SSR

Amran Muis¹, Marcia B. Pabendon¹, Nurnina Nonci¹, dan Wahyu Purbowasito Setyo Waskito²

¹Balai Penelitian Tanaman Serealia
Jl. Dr. Ratulangi 274 Maros, Sulawesi Selatan 90514
E-mail: amran.muis@yahoo.co.id

²Pusat Penelitian Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Serpong

Naskah diterima 10 Januari 2013 dan disetujui diterbitkan 13 November 2013

ABSTRACT. Genetic Variability of Downy Mildew Pathogens based on SSR Marker Analysis. Downy mildew on maize in Indonesia had been reported infecting maize in all provinces and they are mostly caused by *Peronosclerospora maydis*, except in Sulawesi which is caused by *P. philippinensis*. The disease spreads very quickly because the conidia could be dispersed by the air movement. This study was aimed to determine the genetic diversity of the downy mildew pathogen in Indonesia using SSR markers, conducted from April to October 2012. The pathogens were sampled by collecting plants infected by downy mildew from Aceh, North Sumatra, Lampung, West Kalimantan, West Java, East Java and South Sulawesi. The SSR analysis results showed that the genetic similarity coefficient among the 67 isolates were quite high and the isolates formed three clusters, i.e. clusters A, B, and C and two sub-clusters within cluster A based on UPGMA, which were fairly obvious grouping of isolates based on conidial morphology. The sub-cluster A1, conidia shape was similar to that of *P. philippinensis* from South Sulawesi geographical area. The sub-cluster A2, conidia shape was similar to that of *P. maydis* from East Java, West Kalimantan, and Lampung. Cluster B consisted collection of pathogen DNA from specific areas, namely Aceh, Toraja and Simalungun (North Sumatra). Cluster C which formed conidia resemble to that of *P. sorghi*, derived from Langkat (North Sumatra) and Bogor (West Java).

Keywords: Downy mildew, morphological, genetic diversity, SSR.

ABSTRAK. Penyakit bulai pada jagung di Indonesia terdapat di semua provinsi dan kebanyakan penyebabnya adalah *Peronosclerospora maydis*, kecuali di Sulawesi yang disebabkan oleh *P. philippinensis*. Penyebaran penyakit bulai bisa terjadi sangat cepat karena konidia dapat menyebar melalui udara. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keragaman genetik patogen penyebab penyakit bulai di Indonesia menggunakan marka SSR. Penelitian dilaksanakan pada April hingga Oktober 2012 dengan mengambil tanaman terinfeksi bulai dari Provinsi Aceh, Sumatera Utara, Lampung, Kalimantan Barat, Jawa Barat, Jawa Timur, dan Sulawesi Selatan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa koefisien kemiripan genetik dari 67 isolat *Peronosclerospora* spp. yang dianalisis cukup tinggi dan membentuk tiga klaster, yakni klaster A, B, dan C serta dua subklaster pada klaster A berdasarkan UPGMA, yang cukup jelas mengelompokkan isolat-isolat berdasarkan morfologi konidia, yaitu subklaster A1, bentuk konidia mirip *P. philippinensis* dari Sulawesi Selatan, subklaster A2, bentuk konidia mirip *P. maydis* dari Jawa Timur, Kalimantan Barat, dan Lampung. Klaster B terdiri dari koleksi DNA patogen yang berasal dari wilayah yang berbeda yaitu Aceh, Toraja, dan Simalungun (Sumatera Utara). Klaster C yang bentuk konidianya mirip *P. Sorghi* berasal dari Langkat (Sumatera Utara) dan Bogor (Jawa Barat).

Kata kunci: Penyakit bulai, morfologi, keragaman genetik, SSR.

Salah satu masalah dalam peningkatan produksi jagung di Indonesia adalah serangan organisme pengganggu tanaman (OPT), terutama penyakit bulai. Penyakit ini menyebabkan kerusakan yang serius pada tanaman jagung di seluruh dunia, terutama di negara-negara tropis Asia (Yen *et al.* 2004). Menurut Wakman (2004). Apabila penyakit ini menginfeksi tanaman muda varietas rentan dapat mengakibatkan kerusakan tanaman sampai 100%.

Penyakit bulai disebabkan oleh cendawan *Peronosclerospora* spp. yang penularan sporanya ke tanaman jagung terbawa oleh angin pada pagi hari. Saat ini, patogen penyakit bulai pada jagung tergolong dalam tiga genera dan terdiri atas 11 spesies, yaitu *P. maydis*, *P. philippinensis*, *P. sacchari*, *P. sorghi*, *P. spontanea*, *P. miscanthi*, *Sclerospora macrospora*, *S. philippinensis*, *S. rayssiae*, *S. graminicola* dan *P. heteropogani* (CABI 2004, Yen *et al.* 2004). Telle *et al.* (2011) telah menemukan satu lagi spesies patogen bulai, yaitu *P. eriochloae* yang selama ini belum pernah dilaporkan sebagai patogen pada tanaman jagung.

Di Indonesia sudah ditemukan tiga spesies patogen bulai, yaitu *P. maydis* yang penyebarannya di Jawa dan Lampung, *P. philippinensis* di Sulawesi, dan *P. sorghi* di dataran tinggi Brastagi, Sumatera Utara (Wakman dan Hasanuddin 2003). Penyebaran penyakit bulai bisa terjadi sangat cepat, karena konidia menyebar melalui udara dan oosporanya dapat tersimpan lama di tanah serta dapat menular melalui benih, terutama pada benih yang masih segar dan berkadar air tinggi.

Menurut Perumal *et al.* (2006), di daerah tropis, gejala penyakit bulai yang disebabkan oleh *P. sorghi* tidak dapat dibedakan dengan gejala yang disebabkan oleh *P. maydis*, *P. sacchari*, dan *P. philippinensis*. Namun di Amerika hanya *P. sorghi* yang diketahui menginfeksi tanaman Graminae. Bock and Jeger (2002) mengemukakan bahwa *P. sorghi* membentuk konidia dan oospora. Jika kedua jenis spora ini menginfeksi tanaman akan menimbulkan gejala penyakit yang sistemik dan dapat mengakibatkan sterilitas.

Cara pengendalian penyakit bulai yang paling efisien adalah menggunakan varietas tahan. Namun patogen penyakit bulai memiliki variabilitas yang tinggi, sehingga penggunaan varietas tahan tidak dapat bertahan lama (Barbosa *et al.* 2006). Metode pengendalian yang paling efektif selama ini adalah perlakuan benih dengan fungisida metalaxyl (metil N-2, 6 dimethylphenyl-N-methoxyacetyl-DL-alanin). Di beberapa sentra produksi jagung di Indonesia, cara pengendalian ini sudah kurang efektif. Menurut Isakeit dan Jaster (2005), beberapa spesies patogen penyebab bulai telah memiliki daya adaptasi tinggi pada tanaman, termasuk ketahanannya terhadap fungisida. *P. sorghi* yang diisolasi dari tanaman jagung telah menjadi tahan terhadap fungisida metalaxyl yang digunakan pada perlakuan benih (*seed treatment*) yang sebelumnya efektif selama bertahun-tahun. Hasil isolasi *P. sorghi* dari inang yang sebelumnya tahan menunjukkan terjadinya evolusi patogen menjadi ras baru *P. sorghi*, sehingga perlu dilakukan pengawasan secara kontinu terhadap perkembangan populasi patogen (Perumal *et al.* 2008).

Kemajuan bioteknologi, terutama di bidang biologi molekuler, memungkinkan dilakukannya pengamatan variabilitas genetik suatu populasi patogen pada tingkat protein, isoenzim, dan DNA. Analisis DNA memiliki efisiensi dan keakuratan yang tinggi, sehingga dapat digunakan untuk mengidentifikasi dan mendeterminasi keragaman genetik *Peronosclerospora* spp. (Hikmawati 2011). Menurut George *et al.* (2004), dari semua marka molekuler, mikrosatelit atau SSRs (*Single Sequence Repeats*) adalah marka yang paling banyak digunakan untuk analisis genetik, karena tingkat polimorfismenya tinggi, dapat diulang, biaya rendah, dan kemampuannya untuk diotomatisasi. Perumal *et al.* (2006) melaporkan telah mengelompokkan isolat *P. sorghi* dan beberapa spesies lain dari genus *Peronosclerospora* menjadi lima spesies patogen bulai secara spesifik, sehingga metode SSR dinilai efektif untuk studi keragaman genetik populasi patogen bulai di tingkat spesies.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keragaman genetik isolat *Peronosclerospora* spp. yang dikoleksi dari beberapa sentra produksi jagung di Indonesia.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan pada bulan April hingga Oktober 2012. Materi penelitian berupa 76 sampel tanaman jagung bergejala penyakit bulai yang diambil dari tujuh provinsi sentra produksi jagung di Indonesia, dari Aceh (A) lima sampel, Sumatera Utara (Md) 13 sampel, Lampung dua sampel (L), Kalimantan Barat (P) enam

sampel, Jawa Barat (Bg) dua sampel, Jawa Timur (K) 15 sampel, dan Sulawesi Selatan 33 sampel. Sampel tanaman yang dikoleksi dari Sulawesi Selatan berasal dari Kabupaten Barru (B), Sidrap (S), Tana Toraja (T), Bone (Bn), dan Maros (M).

Karakterisasi Morfologi *Peronosclerospora* spp.

Pengambilan sampel cendawan dilakukan dengan cara menempelkan selotip di bawah permukaan daun tanaman jagung yang tertular bulai. Kemudian selotip ditempelkan ke gelas preparat (*glass slide*) dan diberi label lokasi dan tanggal pengambilan sampel. Pengambilan sampel dilakukan beberapa kali di setiap lokasi. Sampel-sampel yang telah dikoleksi dimasukkan ke dalam kotak preparat, selanjutnya dibawa ke Laboratorium Penyakit Tanaman Balai Penelitian Tanaman Serealia Maros, Sulawesi Selatan, untuk diamati bentuk konidianya di bawah mikroskop. Identifikasi spesies patogen penyebab bulai dilakukan mengikuti panduan yang dikemukakan oleh Quimio dan Hanlin (1999) dan CIMMYT (2012).

Koleksi Sampel *Peronosclerospora* spp. dan Isolasi DNA

Bahan untuk ekstraksi DNA *Peronosclerospora* spp. tidak diambil dari patogen yang melekat pada permukaan daun, tetapi dari daun tanaman jagung yang terinfeksi bulai. Penentuan lokasi koleksi patogen berdasarkan daerah endemik penyakit bulai pada pertanaman jagung yang cukup luas dengan tingkat penularan cukup tinggi. Peralatan yang digunakan untuk koleksi sampel adalah, *cool box*, plastik cetik ukuran 20 cm x 30 cm, gunting, alkohol 75%, selotip, dan kertas tisu.

Sampel daun jagung yang bergejala penyakit bulai dipotong menggunakan gunting yang telah didesinfeksi dengan alkohol 75%, sebanyak lima lembar pada setiap titik pengambilan sampel. Jika sampel daun masih basah, maka dikeringkan terlebih dulu dengan hati-hati menggunakan kertas tisu, bagian daun yang bergejala tidak diganggu. Setelah itu sampel daun dimasukkan ke dalam plastik cetik yang sudah disiapkan, diberi label dan dimasukkan ke dalam *cool box*. Gunting segera dicuci bersih dengan menyemprotkan alkohol 75% dan dikeringkan dengan tisu sebelum digunakan untuk mengambil sampel daun lain. Segera setelah pengambilan sampel, pada masing-masing lokasi dilakukan pencatatan informasi mengenai nama lokasi (provinsi, kabupaten, kecamatan, desa), kondisi lapangan, musim pengambilan sampel, ketinggian tempat, dan waktu pengambilan sampel. Selain itu juga dicatat informasi tambahan dari petani setempat yang meliputi lama penularan bulai di daerah tersebut,

perkiraan luas pertanaman jagung, indeks pertanaman jagung dalam setahun, dan varietas yang sering ditanam petani setempat.

Sampel daun jagung segera dibawa ke laboratorium untuk dilakukan isolasi DNA. Tabung steril ukuran 2 ml disiapkan, diisi dengan larutan bufer CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*) steril sebanyak 800 μ l per tabung. Sampel daun jagung dari lapangan dipotong kecil-kecil menggunakan gunting yang telah dicuci dengan alkohol 75%, ditimbang 0,4 g per sampel, kemudian dimasukkan ke dalam tabung berisi *buffer* CTAB. Tabung diberi label dengan kode yang sama pada plastik sampel daun. Jika ekstraksi belum akan dilakukan segera, maka sampel dalam *tube* segera disimpan di dalam *freezer* -25°C. Daun sampel yang tersisa dimasukkan kembali ke dalam plastik dan disimpan di dalam *freezer* -45°C sebagai stok. Ekstraksi DNA dilakukan mengikuti protokol dari CIMMYT yang digunakan oleh George *et al.* (2004) dengan modifikasi, yaitu mengganti nitrogen cair dengan *buffer* CTAB (Khan *et al.* 2004). Kuantitas dan kualitas DNA hasil ekstraksi dicek pada *gel agarose* 0,9% melalui prosedur elektroforesis horisontal, kemudian dilanjutkan dengan pengenceran DNA untuk digunakan dalam analisis selanjutnya.

Amplifikasi PCR

Primer SSR yang digunakan sebanyak 24 lokus SSR. Primer ini merupakan primer yang spesifik untuk *Peronosclerospora* spp. dan bersifat polimorfik. Tahapan proses PCR, pewarnaan (*staining*), dan visualisasi pola pita DNA juga mengikuti protokol George *et al.* (2004). Taq polymerase yang digunakan adalah GoTag@Green Master Mix (Promega). Amplifikasi PCR dilakukan dengan total volume 10 μ l yang mengandung 1,0 ng DNA genomik, 2,25 μ l 10x bufer PCR bufer (Promega), campuran primer (*primer mix*, *forward* dan *reverse*) 0,5 μ l, 6,25 μ l GoTag@Green Master Mix. PCR diawali dengan denaturasi awal selama 2 menit pada suhu 94°C, diikuti oleh *touch down profil*. Profil ini dimulai dengan dua siklus selama 1 menit pada 94°C, 1 menit pada 65°C, dan 2 menit pada 72°C. Kemudian suhu *annealing* diturunkan 1°C setiap dua siklus dan berakhir pada saat suhu *annealing* tercapai. Siklus berikutnya diulang 29 kali dan berakhir dengan siklus pemanjangan pada 4°C.

Produk SSR dianalisis menggunakan *Dual Triple Wide Mini-vertical Electrophoresis System*, CE, 2-place, 33 cm(w) x 10 cm(l). Setiap sampel (4 μ l) dimuat pada gel poliakrilamid 8%. *Casting gel* menggunakan *plate* berukuran 33 cm x 10 cm dengan ketebalan sisir dan *spacer* 0,5 mm. Elektroforesis dilakukan pada daya konstan 100 W dan suhu konstan 50°C selama 1 jam.

Analisis Data

Fragmen atau pita-pita mikrosatelit dari isolat *Peronosclerospora* spp. diberi skor 1 jika ada pita dan 0 jika tidak ada pita. Jika penampilan pita hasil analisis sangat meragukan, maka diberi skor 9 (*missing data*). Tingkat *PIC* dari primer yang digunakan dihitung untuk masing-masing marka SSR (Smith *et al.* 1997) dengan formula:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n f_i^2 \quad i = 1, 2, 3, \dots, n,$$

dimana f_i^2 adalah frekuensi alil ke-*i*.

Matriks biner digunakan untuk membangun matriks kemiripan genetik (*genetic similarity*, GS) menggunakan koefisien Jaccard (Tautz and Renz 1984) dengan rumus:

$$GS(ij) = a/(a + b + c)$$

- a = jumlah pita bersama oleh i dan j,
- b = jumlah alil yang ada dalam i dan yang tidak ada dalam j,
- c = jumlah pita yang ada dalam j dan tidak ada dalam i.

Matriks jarak genetik diperoleh berdasarkan hasil analisis kemiripan genetik (Lee 1998) dengan rumus:

$$S = 1 - GS$$

S = jarak genetik

GS = kemiripan genetik

Analisis kluster dilakukan dengan metode UPGMA (Sneath and Sokal 1973). Program Winboot digunakan untuk menghasilkan 2000 x *bootstrap* berulang untuk menguji keandalan dataset dan konstruksi dendrogram. Analisis kluster dan tes Mantel menggunakan program NTSYSpc (Numerical Taxonomy Systems, NTSYS) versi 2.1 (Rohlf 2000) dan Manual Power Marker V3,0 (<http://www.powermarker.net>).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakterisasi Morfologi *Peronosclerospora* spp.

Koleksi konidia berhasil diperoleh dari Kabupaten Kediri dan Kota Kediri (Jawa Timur), beberapa Kabupaten di Sulawesi Selatan, Landak dan Bengkayang (Kalimantan Barat), Langkat (Sumatera Utara), Lampung Tengah (Lampung), dan Bogor (Jawa Barat). Dari Aceh tidak diperoleh sampel konidia, karena pada saat pengambilan sampel tidak ditemukan konidia pada

daun sakit, tetapi sampel daun jagung bergejala bulai tetap diambil dan dibawa ke laboratorium untuk pengujian DNA. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa bentuk konidia *Peronosclerospora* spp. yang diperoleh dari ketiga provinsi tersebut berbeda (Gambar 1). Konidia yang berasal dari Maros, Barru, Sidrap, Tana Toraja, dan Bone (Sulawesi Selatan), Kabupaten Kediri dan Kota Kediri (Jawa Timur), Landak dan Bengkayang (Kalimantan Barat) berbentuk bulat telur, sedangkan yang berasal dari Lampung Tengah (Lampung), Langkat (Sumatera Utara), dan Bogor (Jawa Barat) berbentuk bulat.

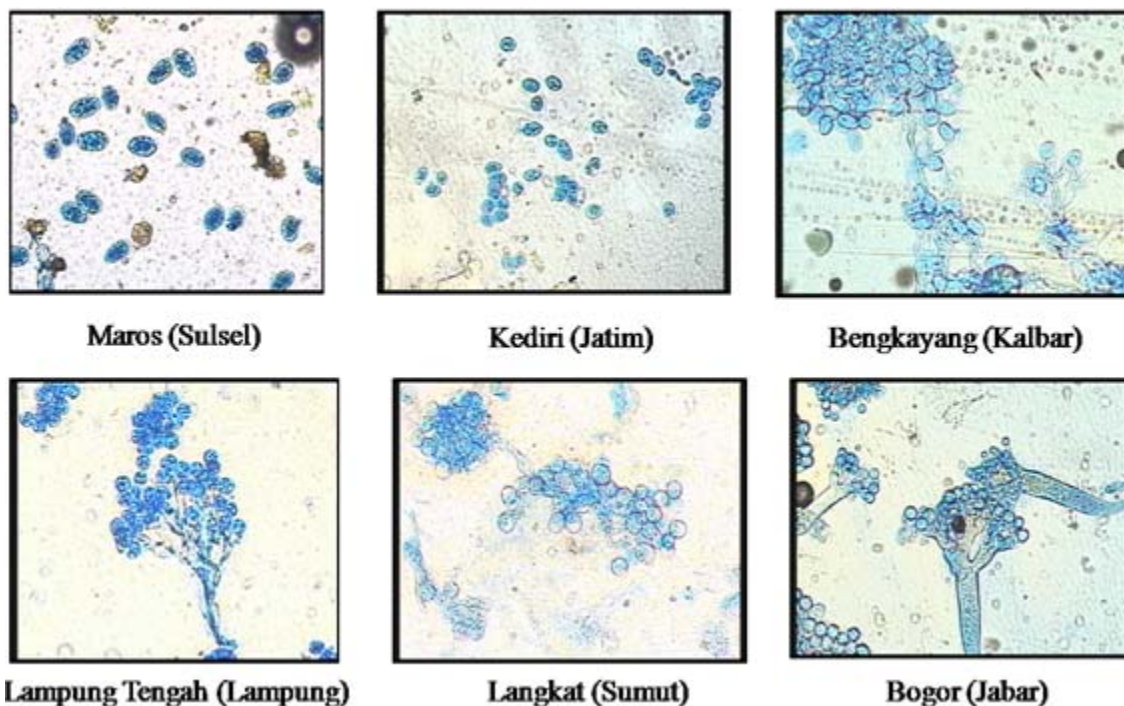
Berdasarkan karakteristik morfologi *Peronosclerospora* spp. yang dikemukakan Quimio dan Hanlin (1999) serta CIMMYT (2012) terdapat tiga spesies *Peronosclerospora* yang tersebar di berbagai lokasi pertanaman jagung di Indonesia, yakni *P. sorghi* (Sumut dan Jawa Barat), *P. maydis* (Jawa Timur, Lampung, dan Kalimantan Barat), dan *P. philippinensis* (Sulawesi Selatan). Hasil penelitian ini hampir sama dengan yang dilaporkan Wakman dan Hasanuddin (2003), kecuali spesies yang terdapat di Lampung. Hal ini mungkin terjadi karena lokasi pengambilan sampel yang berbeda atau mungkin terjadi pergeseran spesies.

Penyebaran tiga spesies *Peronosclerospora* di berbagai tempat di Indonesia dan satu spesies yang

sama pada provinsi berbeda dengan jarak yang sangat jauh satu sama lain, salah satu kemungkinan penyebabnya adalah patogen tersebut terbawa benih terinfeksi dari satu lokasi ke lokasi lain. CIMMYT (2012) mengemukakan bahwa penyebaran penyakit bulai bisa terjadi melalui udara atau ditularkan melalui benih yang terinfeksi, terutama bila didukung oleh kelembaban yang tinggi. Menurut Spencer dan Dick (2002) terdapat dua pusat penyebaran utama *Peronosclerospora* di dunia, yaitu di subbenua India (*P. dichanthiicola*, *P. heteropogoni*, dan *P. westonii*) serta Melanesia bagian Timur dan Australia (*P. globosa*, *P. maydis*, *P. miscanthii*, *P. noblei*, *P. sachari*, dan *P. spontanea*). Selanjutnya dikemukakan bahwa *P. philippinensis* dan *P. sorghi* tersebar luas dan tidak diketahui asalnya.

Keragaman Genetik Berbasis Marka SSR

Dari 76 sampel DNA *Peronosclerospora* spp. yang diperoleh, terdapat 15 sampel yang memiliki *missing data* e"10%, sehingga dikeluarkan dari pengujian, karena akan berpengaruh terhadap validitas data. Sebanyak 61 sampel DNA yang terdiri atas 15 sampel dari Kabupaten Kediri dan Kota Kediri (Jawa Timur), lima sampel dari Pidie dan Aceh Besar (Nangro Aceh Darussalam: A1, A2, A3, A4, A5), dua sampel dari Lampung (L1 dan L2), enam sampel dari Landak dan Bengkayang (Kalimantan Barat:



Gambar 1. Bentuk konidia *Peronosclerospora* spp. dari Maros (Sulawesi Selatan), Kediri (Jawa Timur), Bengkayang (Kalimantan Barat), Lampung Tengah (Lampung), Langkat (Sumatera Utara), dan Bogor (Jawa Barat).

P1, P2, P3, P4, P5, P6), delapan sampel dari Langkat (Sumatera Utara: Md1, Md2, Md10, Md11, Md12, Md14, Md15, Md16), satu sampel dari Bogor (Jawa Barat; Bg1), dan 26 sampel dari Sulawesi Selatan yang terdiri atas dua sampel dari Kabupaten Maros (M1 dan M2), empat sampel dari Barru (B1, B2, B3, B4), 7 sampel dari Sidrap (S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7), sembilan sampel dari Toraja (T12, T13, T14, T15, T16, T17, T18, T19, T20), dan delapan sampel dari Bone (Bn2, Bn3, Bn4, Bn5, Bn6, Bn7, Bn8, Bn9).

Skoring matriks data biner, yaitu skor 1 jika ada pita dan 0 jika tidak ada pita, dari 67 isolat menggunakan 24 primer SSR menghasilkan 79 alil yang digunakan dalam analisis kemiripan genetik. Profil data menunjukkan bahwa tingkat polimorfisme berkisar antara 0,39-0,92 dengan rata-rata 0,65, tergolong cukup tinggi. Jumlah alil adalah 2-6 per lokus SSR dengan rata-rata 3,0 alil. Alil atau fragmen yang terdeteksi sebanyak 79 alil dengan kisaran basa antara 86–318 bp. Walaupun diasumsikan sebagian besar varian (berukuran 86-318 bp) terjadi karena variasi dalam jumlah motif berulang, namun belum diverifikasi melalui sekuensing. Menurut Peakall *et al.* (1998), terjadinya insersi, delesi, dan substitusi dasar pada daerah pengapit kemungkinan juga berpengaruh terhadap variasi panjang fragmen, terutama jika membandingkan alil dari spesies yang berbeda. Profil data SSR menunjukkan bahwa tingkat polimorfisme yang cukup tinggi serta jumlah alil maksimum per lokus yang cukup tinggi mengindikasikan adanya variabilitas genetik yang cukup tinggi pada koleksi *Peronosclerospora* yang berasal dari berbagai lokasi endemik penyakit bulai di Indonesia. Hal ini sekaligus menginformasikan bahwa spesies *Peronosclerospora* yang terdapat di Indonesia lebih dari satu (Tabel 1).

Hasil konstruksi berdasarkan UPGMA menghasilkan dendrogram yang menggambarkan keterkaitan antar 67 isolat *Peronosclerospora* spp. yang dikoleksi dari berbagai lokasi geografis yang berbeda. Koefisien kemiripan genetik *Peronosclerospora* spp. berbasis SSR yang dikoleksi dari tujuh provinsi, yaitu Aceh, Sumatera Utara, Lampung, Jawa Barat, Jawa Timur, Kalimantan Barat, dan Sulawesi Selatan berkisar antara 0,64-1,00 yang menunjukkan jarak genetik yang relatif sempit antarisolat (Gambar 2). Koefisien korelasi kofenetik 0,83 tergolong baik terhadap matriks kemiripan genetik. Lukman *et al.* (2013) yang juga melakukan hal yang sama pada lima provinsi (Jawa Timur, Jawa Tengah, Jawa Barat, Lampung, dan Gorontalo) menghasilkan tingkat kemiripan genetik 0,66-0,98 berbasis SSR dan ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*).

Berdasarkan koefisien kemiripan genetik $>0,65$, maka 67 isolat yang diuji dapat dikelompokkan ke dalam tiga klaster yang berbeda, yaitu klaster A dengan tingkat

kepercayaan 18,5%, klaster B dengan tingkat kepercayaan 11,8%, dan klaster C dengan tingkat kepercayaan 17,4%. Ketiga klaster tersebut mempunyai tingkat kepercayaan yang rendah. Namun demikian, tingkat kepercayaan pengelompokan antarisolat di masing-masing klaster lebih tinggi (19,8-98,6%) dibanding antarklaster utama A, B, dan C (Gambar 2). Jika dilakukan penambahan jumlah primer yang digunakan, maka ada peluang berpindahannya beberapa isolat dari satu klaster ke klaster lain dengan tingkat kepercayaan pengelompokan yang masih rendah. Selain itu, penggunaan primer yang lebih banyak akan menaikkan tingkat kepercayaan pengelompokan, karena semakin banyak primer yang di gunakan merepresentasikan jumlah karakter yang dianalisis, sehingga dapat meningkatkan kemiripan atau ketidakmiripan antarisolat atau antarklaster.

Isolat *Peronosclerospora* spp. yang termasuk klaster A berjumlah 47 isolat (Gambar 2, Tabel 2). Pada koefisien kemiripan $>0,80$, klaster A membentuk dua subklaster, yaitu sub-klaster A1 yang terdiri atas 21 isolat, semuanya berasal dari Sulawesi Selatan (Maros dua isolat, Toraja

Tabel 1. Profil data 24 lokus SSR hasil karakterisasi 61 koleksi patogen bulai pada beberapa daerah endemik bulai di Indonesia, MT 2012.

Primer	Polimorfisme	Jumlah alil per lokus	Kisaran basa (bp)
DM1	0,78	5	148-163
DM3	0,78	4	138-160
DM4	0,51	2	86-100
DM6	0,82	4	140-194
DM7	0,82	4	132-149
DM9	0,81	5	151-161
DM10	0,46	4	141-163
DM13	0,50	2	124-144
DM14	0,74	5	140-153
DM16	0,76	5	135-143
DM18	0,79	3	124-128
DM19	0,57	3	161-178
DM24	0,81	6	154-168
DM29	0,53	2	142-149
DM31	0,51	2	228-247
DM33	0,58	3	155-162
DM36	0,92	2	123-126
DM39	0,47	2	105-107
DM43	0,68	2	146-174
DM46	0,61	3	128-155
DM47	0,39	2	173-181
DM51	0,57	3	244-318
DM52	0,76	4	161-199
DM54	0,41	2	130-140
Total		79	
Rata-rata	0,65	3	86-318

Primer (marka SSR) yang digunakan untuk analisis adalah primer spesifik terhadap *Peronosclerospora* spp.

Tabel 2. Pengelompokan kluster 67 isolat *Peronosclerospora* spp. yang dikoleksi dari tujuh provinsi di Indonesia berdasarkan hubungan kemiripan genetik.

Kluster	Isolat	Asal koleksi
A1	M1	Maros
A1	M2	Maros
A1	T17	Toraja
A1	S3	Sidrap
A1	Bn3	Bone
A1	T13	Toraja
A1	T14	Toraja
A1	T15	Toraja
A1	T16	Toraja
A1	Bn5	Bone
A1	S4	Sidrap
A1	S6	Sidrap
A1	S7	Sidrap
A1	T12	Toraja
A1	Bn2	Bone
A1	Bn4	Bone
A1	B4	Barru
A1	S1	Sidrap
A1	B1	Barru
A1	S2	Sidrap
A1	S5	Sidrap
A2	K1	Kediri
A2	K3	Kediri
A2	K11	Kediri
A2	K4	Kediri
A2	K12	Kediri
A2	K13	Kediri
A2	K6	Kediri
A2	K7	Kediri
A2	K8	Kediri
A2	K9	Kediri
A2	K10	Kediri
A2	K2	Kediri
A2	K5	Kediri

Tabel 2. Lanjutan

Kluster	Isolat	Asal koleksi
A2	L1	Lampung Tengah
A2	L2	Lampung Tengah
A2	K14	Kediri
A2	K15	Kediri
A2	P2	Landak
A2	P3	Bengkayang
A2	P5	Bengkayang
A2	B2	Barru
A2	B3	Barru
A2	Bn6	Bone
A2	P1	Landak
A2	P4	Bengkayang
A	P6	Bengkayang
B	A1	Aceh
B	A2	Aceh
B	A3	Aceh
B	A4	Aceh
B	A5	Aceh
B	T18	Toraja
B	T19	Toraja
B	T20	Toraja
B	Bn7	Bone
B	Bn8	Bone
B	Bn9	Bone
B	Md1	Simalungun
B	Md2	Simalungun
C	Md10	Langkat
C	Md11	Langkat
C	Md14	Langkat
C	Md15	Langkat
C	Md12	Langkat
C	Md16	Langkat
C	Bg1	Bogor

A, B, dan C = kluster dari isolat patogen; A1 dan A2 = sub kluster dari kluster A.

enam isolat, Sidrap tujuh isolat, Bone empat isolat, dan Barru dua isolat). Berdasarkan morfologi konidianya, subkluster A1 didominasi oleh *P. philippinensis*. Subkluster A2 terdiri atas 25 isolat yang terdiri atas 15 isolat dari Kediri, dua isolat dari Lampung, enam isolat dari Bengkayang, dan dua isolat dari Barru. Satu isolat *Peronosclerospora* (P6) yang berasal dari Bengkayang tidak termasuk ke dalam kedua subkluster tersebut. Kluster B terdiri atas 13 isolat yang berasal dari Aceh, Sumatera Utara, dan Sulawesi Selatan (Aceh lima isolat, Medan dua isolat, Toraja tiga isolat, dan Bone tiga isolat). Kluster C terdiri atas tujuh isolat yang berasal dari Langkat enam isolat dan Bogor satu isolat. Dengan demikian, program pemuliaan varietas jagung tahan penyakit bulai harus disesuaikan dengan pola penyebaran spesies *Peronosclerospora* di daerah endemik bulai.

Berdasarkan kluster yang terbentuk, pada umumnya dalam satu kluster terdapat isolat-isolat berasal dari wilayah atau daerah berbeda yang mengindikasikan

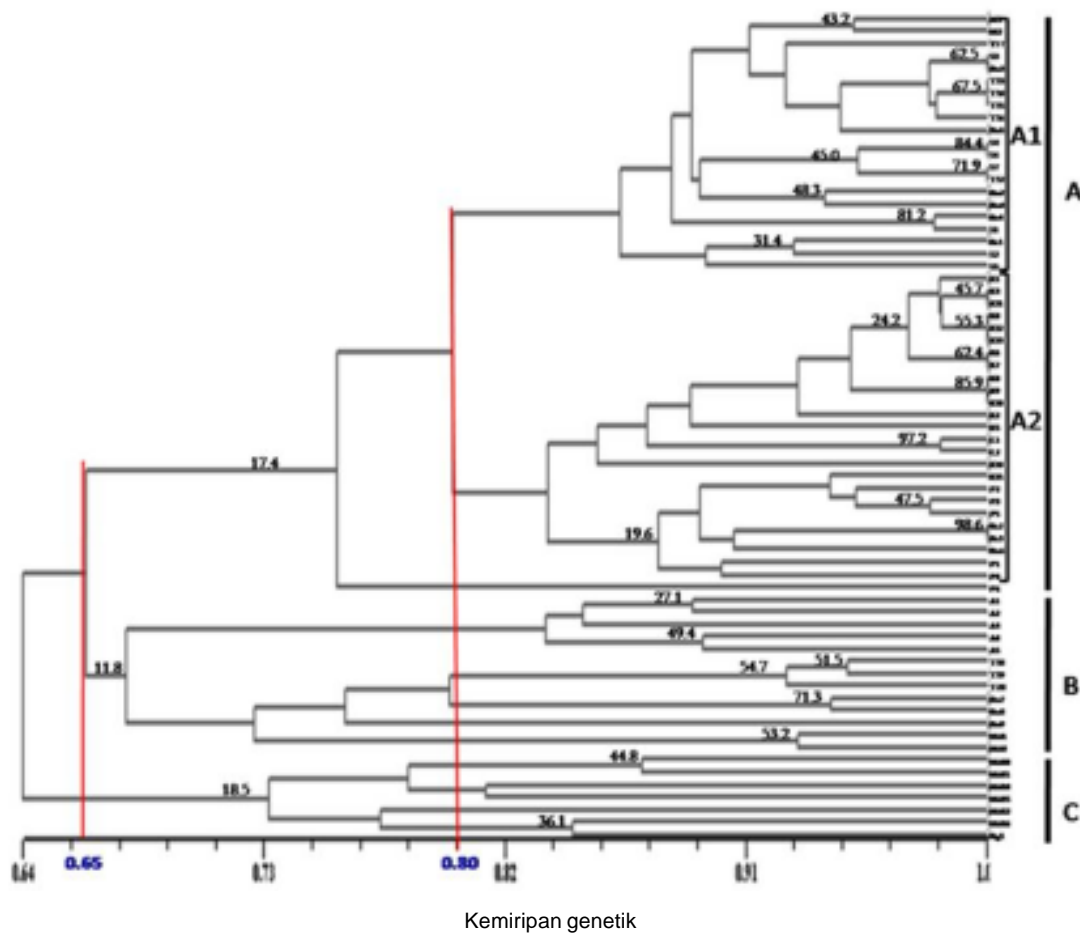
bahwa pada lokasi geografis yang sama terdapat lebih dari satu jenis *Peronosclerospora*. Hal ini dapat terjadi karena adanya perpindahan benih jagung yang sangat intensif dari satu lokasi atau daerah ke daerah lain. Keadaan ini erat kaitannya dengan pola penyebaran penyakit bulai. Penyebaran penyakit bulai terutama melalui bahan tanam yang terinfeksi atau konidia yang terbawa angin. Penyebaran melalui konidia hanya sejauh beberapa ratus meter, karena konidia yang telah rapuh dan terlepas hanya dapat bertahan beberapa jam setelah jatuh ke tanah. Penyebaran jarak jauh secara meluas terjadi melalui bibit yang terinfeksi patogen bulai (CABI 2004). Menurut CIMMYT (2012), beberapa spesies patogen penyebab bulai juga bisa ditularkan melalui biji, walaupun hanya sebatas pada benih yang masih segar dan kandungan kadar airnya tinggi.

Karena tingkat kepercayaan pengelompokan kluster A, B, dan C rendah, maka dilakukan analisis kluster menggunakan program *Manual Power Marker V3.0*.

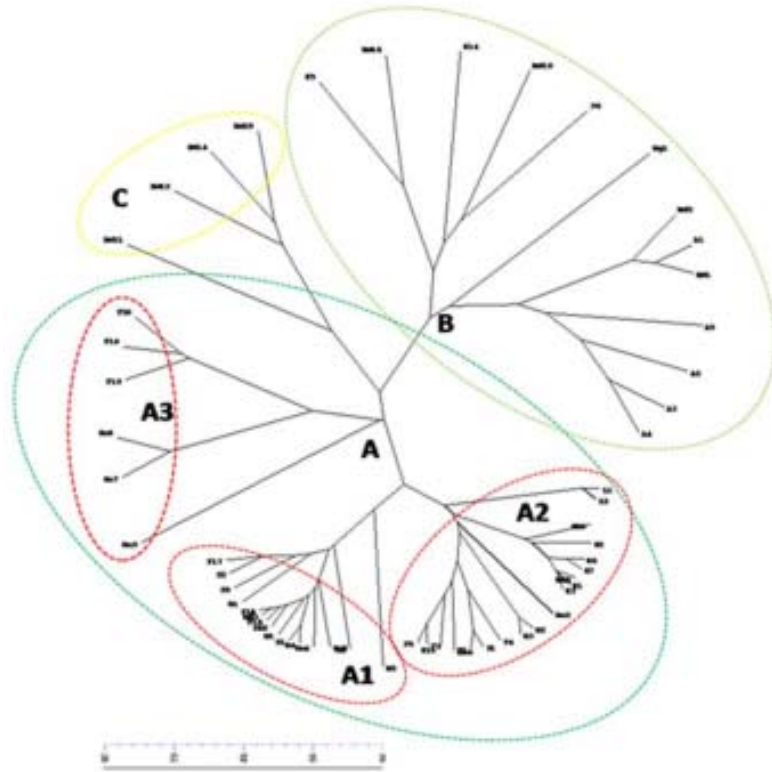
Hasil konstruksi membentuk tiga kluster utama, yaitu kluster A, B, dan C. Pada kluster A terbentuk tiga subkluster, yaitu subkluster A1, A2, dan A3. Subkluster A1 terdiri atas 20 isolat, jumlah dan jenis isolat hampir sama dengan konstruksi kluster sebelumnya, kecuali isolat Bn2 yang tidak termasuk kluster A1, karena berada di kluster A2. Subkluster A2 terdiri atas 24 isolat. Isolat K5 dan K14 yang sebelumnya ada pada subkluster A2 (Gambar 2), keduanya berada pada kluster B. Subkluster A3 terdiri atas enam isolat, semuanya diperoleh dari Sulawesi Selatan, yaitu tiga isolat dari Bone (Bn9, Bn7, dan Bn8) dan tiga isolat dari Toraja (T19, T18, dan T20). Kluster B terdiri atas 13 isolat, yaitu dari Aceh lima isolat (A1, A2, A3, A4, dan A5), dari Sumatera Utara empat isolat (Md1, Md2, Md10, Md16), dari Kediri dua isolat (K5 dan K14), dari Bogor satu isolat (Bg1), dan dari Bengkulu satu isolat (P6). Hanya isolat *Peronosclerospora* dari Aceh

yang memiliki konstruksi yang sama dengan konstruksi dendrogram sebelumnya.

Kluster C terdiri atas lima isolat, semuanya berasal dari Sumatera Utara (Md11, Md12, Md14, dan Md5). Pada konstruksi sebelumnya, kelima isolat tersebut terdapat dalam kluster C. Konstruksi kluster menggunakan dua program yang berbeda menunjukkan bahwa sejumlah besar isolat yang sama tetap berada pada kluster yang sama. Hal ini mengindikasikan ketiga kluster yang terbentuk cukup konsisten (*fix*). Sedangkan isolat-isolat yang sama-sama dimiliki oleh kedua konstruksi pada kluster yang sama menunjukkan bahwa isolat tersebut diperkirakan cukup stabil. Informasi tersebut dapat dipastikan dengan menambah jumlah primer yang digunakan untuk pengujian guna meningkatkan tingkat kepercayaan pengelompokan, dan juga untuk membuktikan bahwa isolat-isolat yang sama pada kedua kluster sudah stabil.



Gambar 2. Konstruksi dendrogram 67 isolat *Peronosclerospora* spp. pada jagung yang dikoleksi dari tujuh provinsi di Indonesia menggunakan 24 marka SSR berdasarkan analisis UPGMA. Angka di atas garis menunjukkan tingkat kepercayaan pengelompokan berdasarkan analisis *Bootstrap* 2000x. A, B, dan C = kluster dari isolat patogen; A1 dan A2 = subkluster dari kluster A.



Gambar 3. Pengelompokan 67 isolat *Peronosclerospora* yang dikoleksi dari tujuh provinsi di Indonesia dan dikonstruksi menggunakan program *Manual Power Marker V3.0*. A, B, dan C = kelompok isolat; A1 dan A2 = sub kelompok dari Kelompok A.

Walaupun penampilan masing-masing isolat *Peronosclerospora* secara morfologis relatif sama dengan pengelompokan isolat berbasis marka SSR, namun ada beberapa isolat yang morfologi konidianya serupa, tetapi secara molekuler berada pada klaster yang berbeda. Hal tersebut ditemukan pada isolat *Peronosclerospora* dari Lampung (L1 dan L2) yang memiliki konidia berbentuk bulat, sama dengan bentuk konidia isolat dari Langkat (Md12) dan Bogor (Bg). Berdasarkan analisis fragmen DNA, isolat *Peronosclerospora* dari Lampung berada pada klaster A2, sedangkan dari Langkat dan Bogor berada pada klaster C pada konstruksi pertama (Gambar 2). Pada konstruksi kedua, isolat dari Bogor (Bg) berada pada klaster B (Gambar 3).

Hasil analisis tersebut menunjukkan bahwa data yang dihasilkan dengan menggunakan marka SSR dapat digunakan untuk membantu mengetahui keragaman genetik *Peronosclerospora* spp. pada jagung. Dalam program pemuliaan, pembentukan varietas jagung yang tahan terhadap penyakit bulai harus disesuaikan dengan pola sebaran spesies *Peronosclerospora* spp. di daerah endemik penyakit bulai yang mengarah pada spesifik lokasi. Patogenitas masing-masing isolat

Peronosclerospora spp. pada klaster yang berbeda perlu diuji. Oleh karena kondisi lingkungan di Indonesia relatif berbeda dengan negara lain yang memiliki penyakit bulai pada jagung, maka sekuensing ulang dilakukan terhadap isolat-isolat *Peronosclerospora* spp. Indonesia.

KESIMPULAN DAN SARAN

1. Berdasarkan karakteristik morfologi konidia 76 isolat *Peronosclerospora* spp. yang dikoleksi dari tujuh provinsi sentra produksi jagung di Indonesia, diperoleh tiga spesies, yaitu *P. maydis*, *P. philippinensis*, dan *P. sorghi*, *P. maydis* dijumpai di Jawa Timur, Lampung, dan Kalimantan Barat; *P. philippinensis* dijumpai di Sulawesi Selatan, sedangkan *P. sorghi* di Sumatera Utara dan Jawa Barat.
2. Analisis profil fragmen DNA mikrosatelit dari 61 sampel DNA menunjukkan terdapat tingkat kemiripan genetik yang cukup tinggi antarisolat *Peronosclerospora* spp. yang berasal dari tujuh provinsi sentra produksi jagung di Indonesia dengan nilai koefisien kemiripan genetik 0,64-1,0.

3. Berdasarkan pengelompokan 61 isolat *Peronosclerospora* spp. menggunakan UPGMA diperoleh tiga klaster (A, B, dan C) dan dua sub-klaster (A1 dan A2) pada klaster A.

Program pemuliaan jagung tahan penyakit bulai di Indonesia sebaiknya dilakukan spesifik lokasi sesuai dengan keberadaan populasi spesies *Peronosclerospora* spp. yang dominan di wilayah tertentu, seperti di Sumatera Utara dan Jawa Barat untuk ketahanan terhadap *P. sorghi*, di Kalimantan Barat, Lampung, dan Jawa Timur untuk ketahanan terhadap *P. maydis*, dan di Sulawesi untuk ketahanan terhadap *P. philippinensis*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Kementerian Riset dan Teknologi Republik Indonesia yang telah memberikan dana penelitian melalui Program Insentif Riset SINas 2012.

DAFTAR PUSTAKA

- Barbosa, R. F.C., L.H. Pfenning, and C.R. Casela. 2006. *Peronosclerospora sorghi*, the causal agent of sorghum downy mildew. *Fitopatologia Brasileira* 31(2):119-132.
- Bock, C.H. and M.J. Jeger. 2002. The distribution and spread of sorghum downy mildew in sorghum and maize fields in Nigeria and Zimbabwe. *Euro. J. Plant Pathology* 108:745-753.
- CABI. 2004. Crop protection compendium. 2004 edition.
- CIMMYT. 2012. Maize Doctor. <http://maizedoctor.cimmyt.org/index.php> [1 Mei 2012].
- George, M.L., E. Regalado, M. Warburton, S. Vasal, and D. Hoisington. 2004. Genetic diversity of maize inbred lines in relation to downy mildew. *Euphytica* 135: 145-155.
- Hikmawati. 2011. Karakterisasi morfologi dan studi keragaman genetik isolat-isolat penyebab bulai *Peronosclerospora* spp. pada tanaman jagung berbasis *simple sequence repeat* (SSR). Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin. Program Studi Sistem-Sistem Pertanian. (Tesis). 100 p.
- Isakeit, T. and J. Jaster. 2005. Texas has a new pathotype of *Peronosclerospora sorghi*, the cause of sorghum downy mildew. *Plant Disease* 89:529.
- Khan, I.A., F.S. Awan, A. Ahmad, and A.A. Khan. 2004. A modified mini-prep method for economical and rapid extraction of genomic DNA in plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 22: 89a-89e.
- Lee, M. 1998. DNA markers for detecting genetic relationship among germplasm revealed for establishing heterotic groups. Presented at the Maize Training Course, CIMMYT, Texcoco, Mexico, August 25, 1998.
- Lukman, R., A. Afifuddin, and T. Lubberstedt. 2013. Unraveling the genetic diversity of maize downy mildew in Indonesia. *J. Plant Pathol. and Microbiol.* 4:162.
- Peakall, R., S. Gilmore, W. Keys, M. Morgante, and A. Rafalski. 1998. Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: implications for the transferability of SSRs in plants. *Mol. Biol. Evol.* 15(10): 1275-1287.
- Perumal, R., T. Isakeit, M. Menz, S. No, E.G. Katile, and C.W. Magill. 2006. Characterization and genetic distance analysis of isolates of *Peronosclerospora sorghi* using AFLP fingerprinting. *Mycological Research*, 110(4): 471-478.
- Perumal, R., P. Nimmakalaya, S.R. Erattaimuthu, Eun-Gyu No, U.K. Reddy, L.K. Prom, G.O. Odvody, D.G. Luster, and C.W. Magill. 2008. Simple sequence repeat markers useful for sorghum downy mildew (*Peronosclerospora sorghi*) and related species. *Research Article. BMC Genetics* 9(77): 1-14.
- Quimio, T.H. and R.T. Hanlin, 1999. Illustrated genera and species of plant pathogenic fungi in the tropics. College of Agriculture, University of the Philippines Los Banos, College, Laguna, Philippines. 259 pp.
- Rohlf, F.J. 2000. NTSYSpc numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.1. Applied Biostatistics Inc.
- Smith, J.S.C., E.E.L. Chin, H. Shu, O.S. Smith, S.J. Wall, M.L. Senior, S.E. Mitchell, S. Kresovich, J. Ziegler. 1997. An Evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparisons with data from RFLPS and pedigree. *Theor. Appl. Genet.* 95:163-173.
- Sneath, P.H.A. and R.R. Sokal. 1973. Numerical Taxonomy. The Principles and Practices of Classification. San Francisco: W.H. Freeman and Co.
- Spencer, M.A. and M.W. Dick. 2002. Aspects of graminicolous downy mildew biology: perspectives for tropical plant pathology and *Peronosporomycetes* phylogeny, pp. 63081. *In: R. Watling, J.C. Frankland, A.M. Ainsworth, S. Isaac, and C.H. Robinson (eds.). Tropical Mycology Vol. 2. Micromycetes. CABI Publ., Wallingford, UK.*
- Tautz, D. and M. Renz. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res.* 12(10): 4127-4138.
- Telle, S., R.G. Shivas, M.J. Ryley, and M. Thines. 2011. Molecular phylogenetic analysis of *Peronosclerospora* (Oomycetes) reveals cryptic species and genetically distinct species parasitic to maize. *Eur. J. Plant Pathol.* 130:521-528.
- Wakman, W. dan A. Hasanuddin. 2003. Penyakit bulai (*Peronosclerospora sorghi*) pada jagung di dataran tinggi Karo Sumatera Utara. Makalah disajikan pada Seminar Nasional Perhimpunan Fitopatologi Indonesia (PFI) di Bandung.
- Wakman, W. 2004. Penyakit bulai pada tanaman jagung di Indonesia: masalah, penelitian dan cara mengatasinya. Prosiding Seminar Tahunan PFI Komda Sulsel.
- Yen, T.T.O., B.M. Prasanna, T.A.S. Setty, and R.S. Rathore. 2004. Genetic variability for resistance to sorghum downy mildew (*Peronosclerospora sorghi*) and Rajasthan downy mildew (*P. heteropogoni*) in the tropical/sub-tropical Asian maize germplasm. *Euphytica* 138:23-31.