

# Keterpautan 23 Marka Mikrosatelit pada Kromosom 6 dan 7 dengan Karakter Ketahanan Populasi Jagung terhadap Penyakit Bulai (*Peronosclerospora maydis*)

Roberdi<sup>1</sup>, Hajrial Aswidinnoor<sup>2</sup>, Asep Setiawan<sup>2</sup>, Sutrisno<sup>3</sup>, Marcia B. Pabendon<sup>4</sup>, dan M. Azrai<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Biotechnology Department, Plant Production Division, PT Sinar Mas Agro Resources Technology Tbk, Jl. Pajajaran No. 78F-G, Bogor

<sup>2</sup>Fakultas Pertanian Institut Pertanian Bogor, Kampus Dramaga, Bogor 16680

<sup>3</sup>Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111

<sup>4</sup>Balai Penelitian Serealia, Jl. Dr. Ratulangi No. 274 Maros 90514, Kotak Pos 1173 Makassar

## ABSTRACT

**Linkage of 23 Microsatellite Marker on Chromosome 6 and 7 to Downy Mildew Resistance on Maize. Roberdi, Hajrial Aswidinnoor, Asep Setiawan, Sutrisno, Marcia B. Pabendon, and M. Azrai.** Downy mildew caused by *Peronosclerospora* is one of most important maize disease in several countries, including Indonesia. Parental and progenies selection based on conventional breeding is time consuming and laborious. Development of molecular biology produces many DNA markers used for selection, one of them is microsatellite. The aim of this research to identify microsatellite markers associated with downy mildew resistance on maize progeny MR-4 X AMATLCOHS-9-1-1-1-1-1-2-B, on chromosome 6 and 7. This research was consisted of two activities, phenotypic and genotypic analysis. Phenotypic analysis used 175 progenies BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub> and both of parents. This analysis included planting of spreading row, inoculums preparation, inoculation of spreader rows, test material planting, inoculation of test material and observation. Genotypic analysis used 175 progenies BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> and both of parents. This analysis included DNA genome isolation, PCR analysis, electrophoresis, gel staining and data scoring. Percentage of downy mildew infections on MR-4 was 76%, while these on AMATLCOHS-9-1-1-1-1-1-2-B was 16%, and on 175 progenies had range from 10.1-100%. Out of 23 SSR, 12 markers could be mapped in chromosome 6 and 11 markers in chromosome 7. QTL analyses showed that chromosome 7 contain one QTL in position between *phi082* and *phil161* marker as far as 18.6 cM with 2.6 LOD value.

**Key words:** Quantitative Trait Loci, microsatellite marker, downy mildew-disease, *Peronosclerospora maydis*, *Zea mays*.

## PENDAHULUAN

Penyakit bulai pada jagung di Indonesia banyak disebabkan oleh *Peronosclerospora philippinensis* (Triharso *et al.* 1976). Penyakit ini dapat mengakibatkan kehilangan hasil hingga 90% (Mikoshiha 1983), bahkan 100% pada kultivar rentan (Sudjono dan Subandi 1988). Untuk mempercepat proses perakitan kultivar tahan bulai, pemuliaan konvensional perlu di-

bantu dengan pemuliaan molekuler. Hal ini perlu dilakukan, karena karakter ketahanan terhadap penyakit bulai bersifat poligenik (Brown 1980, Mejaya *et al.* 1997). Penanda molekuler dapat digunakan sebagai alat bantu seleksi pada generasi awal dengan tingkat ketelitian yang lebih tinggi. Langkah awal yang sangat penting dalam pemanfaatan penanda molekuler ini adalah menentukan penanda yang terpaut dengan suatu sifat yang diinginkan. Hal ini dapat dicapai dengan analisis dan pemetaan *Quantitative Trait Loci* (QTL).

Beberapa peneliti telah melakukan pemetaan QTL yang berasosiasi dengan gen ketahanan jagung terhadap penyakit bulai (Agrama *et al.* 1999, Ruswandi *et al.* 2002, Azrai *et al.* 2002). *Asian Biotechnology Network* (AMBIONET) telah melakukan pemetaan QTL di India, Indonesia, Filipina, dan Thailand pada progeni CML139 x Ki3 menggunakan penanda *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) yang digabung dengan penanda mikrosatelit. Dari penelitian ini telah diidentifikasi lokus karakter tahan bulai pada kromosom 6, pada empat negara tersebut. Selain itu, juga telah diidentifikasi lokus gen tahan bulai berada pada kromosom 7, berdasarkan hasil fenotipik di Indonesia dan India, kromosom 2 di India dan kromosom 10 di Thailand (George 2003).

Mikrosatelit atau *Simple Sequence Repeat* (SSR) merupakan salah satu penanda yang banyak digunakan untuk analisis keragaman genetik, pemetaan genetik, dan studi evolusi (Temnykh 2000). Hal ini disebabkan teknik SSR mudah dilakukan dengan tingkat polimorfisme yang tinggi. Di samping itu, profil SSR dapat langsung diinterpretasikan sesuai dengan alel-alel yang terdapat pada lokus gen (Smith *et al.* 1997).

MR-4 merupakan galur jagung yang dibentuk di Balai Penelitian Serealia, Maros, Sulawesi Selatan. Hasil pengujian di beberapa lokasi pada tahun 2000 menunjukkan bahwa galur ini terserang bulai dengan intensitas penyakit rata-rata 81,91%. AMATLCOHS-9-1-1-1-1-1-2-B merupakan galur jagung yang berasal dari *International Maize and Wheat Improvement Center*

(CIMMYT) Asia yang sejak awal pembentukannya tahan terhadap penyakit bulai dan toleran pada tanah masam. Hasil penyaringan ketahanan terhadap penyakit bulai pada dua musim di Lanrang, Maros; Lampung; dan Bogor galur ini terserang dengan kategori ringan, intensitas penyakit rata-rata 12,58% (Kasim *et al.* 2002).

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan analisis dan pemetaan QTL terhadap lokus kuantitatif penyakit bulai pada progeni MR-4 x AMATLCOHS-9-1-1-1-1-2-B menggunakan penanda SSR yang terkonsentrasi pada kromosom 6 dan 7.

## BAHAN DAN METODE

### Materi Tanaman, Penyakit Bulai, dan Primer SSR

Bahan tanaman yang digunakan adalah 175 genotipe tanaman jagung BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> untuk analisis genotipik. Selanjutnya tanaman tersebut diselfing, sehingga didapatkan 175 populasi BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub> yang digunakan untuk analisis fenotipik. Uji lapang menggunakan kedua tetua, 175 BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub>, tanaman baris penyebar, dan tanaman kontrol rentan. Sumber spora penyakit bulai berasal dari tanaman yang terserang bulai di sekitar area penelitian.

Sebanyak 59 primer yang berasal dari Research Genetic Inc. digunakan untuk survei polimorfisme tetua. Primer yang polimorfis digunakan dalam analisis segregasi genotipik (Tabel 1).

### Uji Fenotipik

Uji fenotipik dilakukan menurut prosedur Azrai *et al.* (2003) dengan tahapan sebagai berikut: (1) penanaman tanaman baris penyebar yang dilakukan 3 minggu sebelum penanaman genotipe uji, sebanyak 3 baris pada tiap-tiap pinggir dan di antara tiap 10 baris genotipe uji, (2) penyiapan inokulum, (3) penyemprotan inokulum ke tanaman baris penyebar, inokulum disemprotkan pada tanaman umur 2 dan 3 minggu, dan (4) penanaman genotipe uji. Setiap nomor dipelihara sebanyak 20 tanaman dalam satu baris, menggunakan rancangan Alpha Lattice dengan 2 ulangan. Genotipe uji disemprot dengan spora bulai sebanyak 3 kali, inokulasi pertama dilakukan pada tanaman umur 1 minggu, inokulasi kedua dilakukan 3 hari berikutnya, dan inokulasi ketiga dilakukan 3 hari setelah inokulasi kedua. Setiap tanaman diamati reaksinya terhadap penyakit bulai di lapang. Parameter yang diamati adalah persentase serangan. Pengamatan penyakit bulai dilakukan pada minggu pertama sampai minggu kelima setelah inokulasi pertama. Persentase serangan penyakit bulai dihitung menggunakan rumus:

$$PS = \frac{\sum Ts}{\sum T} \times 100\%$$

PS = persentase serangan

$\sum Ts$  = jumlah tanaman terserang bulai per plot

$\sum T$  = jumlah tanaman per plot

## Uji Genotipik

### Isolasi DNA

Ekstraksi total DNA dari tanaman uji dilakukan menggunakan metode CTAB (*cetyl-trimethyl ammonium bromide*) yang telah dimodifikasi dan direkomendasi CIMMYT untuk tanaman jagung (Warburton dan Hoisington 2001). Daun tanaman seberat 2 g digerus dengan nitrogen cair sampai halus. Gerusan daun dimasukkan ke tabung *polypropylene*, dan ditambahkan 8 ml bufer ekstraksi (1 M Tris pH 8,5 M NaCl dan 0,5 M EDTA, CTAB 2%,  $\beta$ -merkaptotanol 0,2% (v/v), diinkubasi selama 60 menit pada suhu 65°C sambil dibolak-balik setiap 10 menit agar homogen.

Pemurnian total DNA dilakukan dengan kloroform : isoamilalkohol (24 : 1 v/v) sebanyak 6 ml, dicampur sampai merata dan disentrifugasi pada 3.500 rpm selama 20 menit. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung *polypropylene* 50 ml. Selanjutnya ditambahkan isopropanol 1 x volume, pelet DNA diendapkan dengan mensentrifugasi pada 12.000 rpm selama 20 menit, pelet diambil menggunakan pipet Pasteur dan dipindahkan ke Eppendorf lain, selanjutnya pelet dicuci dengan etanol 70% kemudian dikeringkan dan dilarutkan dalam TE 1x.

Kualitas dan kuantitas DNA ditetapkan dengan mengelektroforesis DNA pada gel agarose 0,8%. Setelah konsentrasi DNA diketahui maka disiapkan DNA dengan konsentrasi 10 ng/ $\mu$ L melalui pengenceran sebagai *working solution*.

### Amplifikasi DNA dengan teknik PCR

Amplifikasi DNA dengan teknik PCR dilakukan dengan total reaksi 10  $\mu$ l yang mengandung 10 ng DNA genom sebagai *template*, masing-masing dNTP 0,1  $\mu$ M (dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP), primer campuran *forward* dan *reverse* 0,25  $\mu$ M enzim *Taq* DNA polimerase 1 unit dalam larutan bufer 1x dan MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM. Reaksi PCR dilakukan berdasarkan hasil optimasi di laboratorium servis Ambionet Filipina menggunakan mesin PCR MJ Research PCT-100. Program PCR terdiri dari denaturasi awal pada suhu 94°C selama 2 menit, dilanjutkan dengan 30 siklus, tahapan denaturasi 94°C selama 30 detik, *annealing* 56°C selama 1 menit, dan ekstensi 72°C selama 1 menit. Reaksi PCR diakhiri

dengan ekstensi akhir 72°C selama 5 menit dan tahap-an soak 4°C.

Fragmen DNA hasil amplifikasi dipisahkan dengan elektroforesis menggunakan gel poliakrilamid

4,5% dalam bufer TBE 1 x. Sebelum hasil PCR dielektroforesis dilakukan *pre-run* untuk mendapatkan suhu yang sesuai agar tidak terjadi *smiling band*. Hasil PCR di-*loading* sebanyak 2,5 µL selama 60 menit pada 60

**Tabel 1.** Primer SSR yang digunakan dalam survei polimorfisme tetua.

No.	Primer	Bins	Forward	Reverse	Hasil
1.	Umc1143	6.00	<u>GACACTAGCAATGTTCAAACCCC</u>	<u>CGTGGTGGGATGCTATCCTTT</u>	OK
2.	Bnlg161	6.00	<u>GCTTTCGTCATACACACATTCA</u>	<u>ATGGAGCATGAGCTTGATATTT</u>	-
3.	phi126	6.00	<u>TCCTGCTTATTGCTTTCGTCAI</u>	<u>GAGCTTGATATTTCTTGTTGACA</u>	?
4.	Bnlg1043	6.00	<u>TTTGCTCTAAGGTCCCATG</u>	<u>CATACCCACATCCCGGATAA</u>	?
5.	Bnlg1600	6.00	<u>CGATCAGTGCCTGGAGAGTA</u>	<u>TAGGCATGCATTGTCCATTG</u>	OK
6.	Bnlg391	6.01	<u>CAGATATCACAGCATCAGAAGATCA</u>	<u>AAAATGTAAGAACITGTTTGGGATT</u>	-
7.	phi423796	6.01	<u>CACTACTCGATCTGAACCACCA</u>	<u>CGCTCTGTGAATTTGCTAGCTC</u>	-
8.	phi077	6.01	<u>GAGAAGAGGATCAGGTTCTGTTCCA</u>	<u>CGCGTTGTACATCTTGCCTGCTT</u>	?
9.	Bnlg1867	6.01	<u>CCACCACCATCGTAGGAGTT</u>	<u>CAGTACACAGCAGGCAGCTC</u>	OK
10.	Bnlg1139	6.01	<u>GGGGGGTTGAGAGAGAAA</u>	<u>ACGGCGATGATGAATTAAGC</u>	OK
11.	Bnlg0391	6.01	<u>CAGATATCACAGCATCAGAAGATCA</u>	<u>AAAATGTAAGAACITGTTTGGGATT</u>	OK
12.	Bnlg0107	6.01	<u>GCAACTAGAAGTAGATGGCTTGTATGG</u>	<u>CAACAACAAGTGGCTGGCTAGGGTGAA</u>	?
13.	Bnlg1165	6.01	<u>CGTTGCATCATCTCAAGAA</u>	<u>TTCAAGTTTAGCCACCACC</u>	?
14.	Bnlg1538	6.01	<u>CAGCCGAAGACGAAGCC</u>	<u>GTGGTGAACGAACGAGCAA</u>	-
15.	Bnlg1753	6.01	<u>GTAGGGTTACAAGCGTTGC</u>	<u>GTGGACAGATGTTACGTTGG</u>	-
16.	Umc1023	6.02			-
17.	Bnlg1371	6.02	<u>TTGCCGATAAGAACCAACA</u>	<u>ACGACCGGTGTGGTTACATT</u>	?
18.	Y1ssr+J34	6.02	<u>CAAGAAGAGGAGAGGCCGGA</u>	<u>TTGAGCAGGGTGGAGCACTG</u>	OK
19.	Bnlg2151	6.02			?
20.	Umc1083	6.03	<u>CTTTCCTCTCTGGAGCGTGTATTG</u>	<u>ATATGTTGCAGAACCATCCAGGTC</u>	OK
21.	nc010	6.04	<u>TGAGCTGACGACGAGCAG</u>	<u>CATTATCTGTTTCGGCCCG</u>	OK
22.	nc009	6.04	<u>CGAAAGTCGATCGAGAGACC</u>	<u>CCTCTCTCACCCCTTCTT</u>	?
23.	Bnlg1014	6.04			-
24.	Mmc0241	6.05	<u>TATATCCGTGCATTACGTTT</u>	<u>CATCGCTTGTCTGTCTGA</u>	-
25.	Bnlg1154	6.05	<u>GGGTGATCACATGGGTTAGG</u>	<u>AAATCAATGCTCCAATCGC</u>	OK
26.	phi078	6.05	<u>CAGCACCAGACTACATGACGTGTAA</u>	<u>GGGCCGCGAGTGATGTGAT</u>	?
27.	Bnlg2249	6.05	<u>AGGATCCCTAGCAAAAGGA</u>	<u>CCCCCTAGTTCGTTGCATAA</u>	?
28.	nc012	6.05	<u>TAATTTAAACACCACACCACC</u>	<u>ACACACGCCAAAGAAAACC</u>	OK
29.	phi081	6.05	<u>AAGGAACCTGGTGAGAGGGTCTT</u>	<u>AGCCCGATGCTCGCCATCTC</u>	-
30.	Umc1020	6.05	<u>CCTGGAGAGCCACTACAAGGAA</u>	<u>TCAGCCTGAGCTCACATCATCT</u>	OK
31.	phi129	6.05	<u>GTGCGCATACAAGCAGAAGTCCA</u>	<u>TCAGGATGGGTGTCTCATAAACTC</u>	?
32.	phi025	6.05	<u>GCAACATCCTGGAGAGCCACTACAAGG</u>	<u>ACAGCCTGTTTCTGGACAGTGAACTC</u>	?
33.	Bnlg1732	6.05	<u>AACTTTTGGCATTGCACTGG</u>	<u>CGTAAGTGCACACGGCATA</u>	-
34.	Bnlg1443	6.05	<u>TACCGGAATCCTCTTTGGTG</u>	<u>TTTGACAACCTTCCAGGG</u>	OK
35.	Bnlg1087	6.05			-
36.	Bnlg1922	6.05	<u>GTCTTGGCAGTAATCAGGC</u>	<u>TCGATCAAAGACGTTTATGC</u>	OK
37.	Bnlg1617	6.05	<u>CGTGACCGGTACAGAAAGAA</u>	<u>AGAAAGCCACGTACCCCTTT</u>	OK
38.	Bnlg1702	6.05	<u>TTATCATCAAATGGAGGACAGC</u>	<u>AAAGACACACGCTAATGGGC</u>	-
39.	phi452693	6.06	<u>CAAGTGTCCGAGATCTTCCA</u>	<u>CGCGAACATATTCAGAAGTTTG</u>	OK
40.	dupssr15	6.06	<u>GAAGTCGATCCATCCACC</u>	<u>GGGGTAGTGGAGATAACTAGTG</u>	-
41.	Bnlg1740	6.07	<u>TTTTCTCCTTGAGTTCGTTCC</u>	<u>ACAGGCAGAGCTCTCACACA</u>	?
42.	Bnlg1063	6.07			?
43.	Bnlg1759	6.07	<u>AGACGGAGTCTCGTTTGC</u>	<u>ACCGGTTGCTACCACTCACT</u>	?
44.	phi089	6.08	<u>GAATTGGGAACCAGACCACCCAA</u>	<u>ATTTCCATGGACCATGCCTCGTG</u>	-
45.	phi299852	6.08	<u>GATGTGGGTGCTACGAGCC</u>	<u>AGATCTCGGAGCTCGGCTA</u>	OK
46.	Umc1545	7.00	<u>GAAAACCTGCATCAACAACAAGCTG</u>	<u>ATTGGTTGGTCTTGCTTCCATTA</u>	OK
47.	Bnlg1200	7.01	<u>CGTCCTCGTTGTTATTCCGT</u>	<u>GTTCCCTCTCCTCCCTCCTC</u>	OK
48.	phi057	7.01	<u>CTCATCAGTGCCGTCTCCAT</u>	<u>CAGTCGCAAGAAACCGTTGCC</u>	-
49.	phi034	7.02	<u>TAGCGACAGGATGGCCTCTTCT</u>	<u>GGGGAGCACGCCTTCTGTTCT</u>	OK
50.	Bnlg657	7.02	<u>TCTGAGGATGCCAATCATGCGC</u>	<u>CGTTTCCGTTTCGTCACCAGCTCG</u>	OK
51.	Bnlg0398	7.02	<u>CGTCGGCCAACAGGGTATC</u>	<u>CTCGCACGGGTCTTCTTC</u>	?
52.	phi114	7.03	<u>CGGAGACCGTCAAGACCATCAA</u>	<u>AGCTCAAACAGATTCTGAACCTCGC</u>	-
53.	Bnlg572	7.03	<u>ACTGGACTGTCTCTGTCCTA</u>	<u>CAAAAAAAGATTCGTTCCGAGTAA</u>	OK
54.	Bnlg155	7.03	<u>ACCGAGTAGCCGAGACAGC</u>	<u>AGAGTCTGGAGCCACATGAG</u>	OK
55.	Bnlg1070	7.03	<u>TTCCAGTAAGGAGGTGCTG</u>	<u>TAAGCAACATATAGCCGGGC</u>	?
56.	phi328175	7.04	<u>GGGAAGTGCTCCTTGACAG</u>	<u>CGGTAGGTGAACCGGTA</u>	?
57.	Bnlg1161	7.04	<u>GAACGGACGACGTCGAT</u>	<u>ACCTCCACACGTCCCCAC</u>	OK
58.	phi051	7.05	<u>GGCGAAAGCGAAGCACAACATCTT</u>	<u>CGACATCGTCAGATTATATTCAGACCA</u>	OK
59.	phi082	7.05	<u>CACAGCACAGGCAGTTCC</u>	<u>CGCGCAAAAGATCTTGAACACT</u>	-

OK = polimorfik dan digunakan dalam uji genotipik.

watt. Pewarnaan DNA dilakukan dengan larutan pewarna 1 g  $\text{AgNO}_3$  + 1,5 ml formaldehid 37%. Pewarnaan pita-pita DNA dilakukan dengan memasukkan gel ke dalam larutan developer 30,0 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  + 1,5 formaldehid 37% dan 200  $\mu\text{L}$  sodium tiosulfat dan digoyang pelan sampai muncul pita-pita DNA. Gel kemudian difiksasi, dicuci dengan air *nanopure*, dan dikeringkan untuk membuat angka (skoring).

Data profil DNA yang muncul dinilai berdasarkan data biner, yaitu dinilai A jika muncul pita mengikuti tetua target (MR-4) dan diskor H jika heterozigot.

### Analisis Data

Parameter yang dianalisis adalah (1) proporsi genotipe untuk mengetahui frekuensi alel masing-masing tetua. Uji  $X^2$  pada taraf 5% digunakan untuk menguji proporsi genotipe masing-masing lokus apakah mengikuti perilaku hukum Mendell, (2) pembuatan peta pautan, berdasarkan data genotipik menggunakan program MapMaker versi 3,0, dan (3) analisis QTL. menggunakan *composite interval mapping*, yaitu kombinasi antara metode analisis *simple interval mapping* dengan *multiple linear*, menggunakan *software* Win QTL Cartographer versi 2,0.

Marka SSR yang berasosiasi dengan karakter tahan bulai ditentukan berdasarkan pada nilai *threshold* pada LOD 2,5, yaitu nilai batas berdasarkan pada tingkat kepercayaan pada nilai  $\alpha = 0,0032$  dalam suatu distribusi  $X^2$ , dengan  $df = 1$  untuk analisis individu.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Evaluasi Ketahanan Tetua terhadap Penyakit Bulai

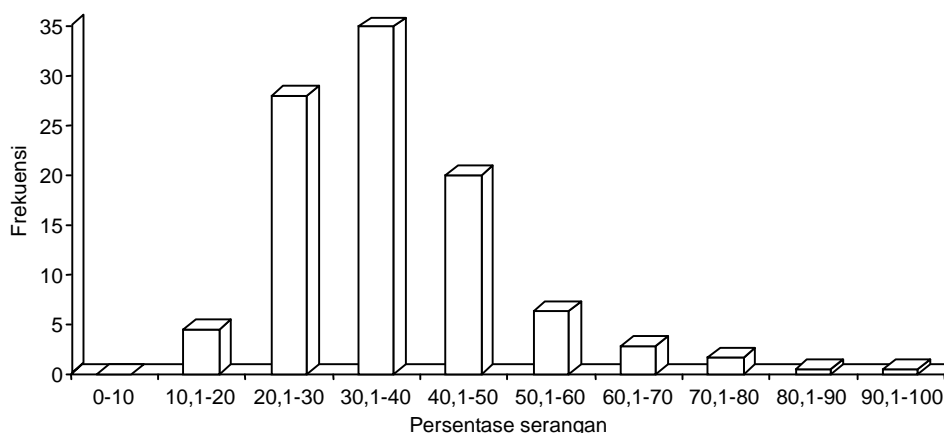
Reaksi tetua terhadap penyakit bulai di lapang menunjukkan bahwa AMATLCOHS-9-1-1-1-1-2-B sebagai tetua tahan terserang sebesar 16%, sedangkan

MR-4 sebagai tetua rentan terserang bulai sebesar 76%. Sementara varietas Antasena sebagai kontrol tanaman rentan terserang sebesar 78%. Hal ini menunjukkan bahwa kedua tetua yang digunakan dalam persilangan ini mempunyai reaksi ketahanan yang sangat berbeda terhadap penyakit bulai. Hal ini sesuai dengan pendapat McCouch dan Tanksley (1991) yang menyatakan bahwa faktor yang turut menentukan keberhasilan dalam kegiatan pemetaan antara lain materi tetua yang digunakan harus beragam secara genetik.

Tetua yang digunakan harus mempunyai variasi yang tinggi untuk karakter yang diinginkan baik pada tingkat DNA maupun pada tingkat fenotipik. Variasi pada tingkat DNA penting untuk mendapatkan kejadian rekombinasi. Selain itu adanya variasi sekuen DNA akan memudahkan pencarian penanda yang polimorfik yang terdistribusi di seluruh genom (Singh dan Kumar 2002, Prasanna 2002). Perbedaan reaksi fenotipik yang besar dari tetua persilangan terhadap suatu karakter, menunjukkan adanya variasi genetik yang tinggi di antara keduanya, walaupun pengaruh lingkungan yang tidak terkontrol dapat menyebabkan variasi fenotipik yang besar dibandingkan dengan pengaruh faktor genetik

### Uji Ketahanan Progeni terhadap Penyakit Bulai

Hasil pengamatan menunjukkan reaksi progeni terhadap penyakit bulai sangat beragam (Gambar 1), terdapat 8 genotipe (4,57%) terserang pada kisaran yang sama dengan tetua tahan (10,1-20,0%), dan 5 genotipe (2,86%) terserang lebih berat dari tetua rentan. Sedangkan progeni lain berada pada kisaran serangan di antara kedua tetuanya, yang cenderung menunjukkan reaksi tahan. Beragamnya respon progeni terhadap penyakit bulai menunjukkan bahwa telah terjadi introgresi sifat ketahanan dari tetua donor terhadap sebagian progeninya, namun untuk memastikan hal



Gambar 1. Distribusi persentase serangan penyakit terhadap genotipe uji di lapang.

tersebut perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pada generasi populasi yang sudah relatif homogen.

Beragamnya tingkat serangan penyakit terhadap genotipe uji sangat tergantung pada tingkat viabilitas genetik, variabilitas fenotipik dan interaksi antara genetik dengan lingkungan. Pengetahuan mengenai keragaman tersebut sangat penting terutama dalam penerapan program seleksi yang akan digunakan untuk karakter yang diinginkan. Interaksi antara genetik dengan lingkungan untuk suatu karakter semakin besar apabila karakter tersebut dikendalikan oleh gen-gen minor atau poligenik. Beberapa peneliti menyimpulkan bahwa ketahanan jagung terhadap penyakit bulai dikendalikan secara poligenik (Hakim dan Dahlan 1972, Kaneko dan Aday 1980). Sementara itu, Ruswandi *et al.* (2002) melaporkan bahwa efek gen aditif dominan dengan epistasis berperan penting terhadap semua komponen resisten terhadap bulai Filipina.

#### Survei Polimorfisme Tetua

Survei polimorfisme dilakukan untuk mendapatkan primer yang dapat membedakan pola pita kedua tetua. Di antara 59 primer SSR yang disurvei pada kromosom 6 dan 7 diperoleh 27 primer (45,76%) polimorfis, 16 primer (27,12%) monomorfis, 16 primer (27,12%) tidak menghasilkan pita atau memunculkan banyak pita DNA. Pemilihan primer pada kedua kromosom ini dilakukan berdasarkan acuan terhadap hasil penelitian George *et al.* (2003) yang menemukan adanya lokasi QTL di Indonesia pada populasi hasil silangan Ki3 x CML 139.

Tingkat polimorfisme primer yang diperoleh tergolong tinggi, hal ini disebabkan jagung merupakan salah satu tanaman menyerbuk silang yang mempunyai keragaman genetik yang besar. Dengan demikian peluang mendapatkan primer yang polimorfis akan sangat tinggi. Berdasarkan jumlah unit pengulangan SSR yang digunakan diketahui bahwa jumlah primer polimorfis diperoleh pada motif pengulangan dua unit sebanyak 11 primer (47,83%), pengulangan tiga unit 3 primer (13,04%), pengulangan empat unit 3 primer (13,04%), dan lainnya 6 primer (26,09%). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Smith *et al.* (1997) yang melakukan penelitian pada 58 galur inbrida menggunakan primer SSR yang berbeda dan didapatkan bahwa rata-rata lokus SSR memiliki unit pengulangan pendek, yaitu pengulangan dua 45% dan pengulangan tiga 27%.

#### Analisis Segregasi Populasi BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> Progeni MR-4 x AMATLCOHS-9-1-1-1-1-2-B

Analisis segregasi populasi BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> menggunakan 24 penanda SSR polimorfis dua puluh tiga primer

menghasilkan pita yang dapat diskoring dan satu primer pada kromosom 7 (*phi*328175) tidak dapat diskoring. Frekuensi alel yang diperoleh dari 23 penanda SSR yang diuji adalah 53,36% mengikuti pola alel MR-4 dan 46,64% mengikuti pola kedua tetua (heterozigot).

Penghitungan frekuensi alel diperlukan untuk mengetahui apakah alel yang didapatkan sesuai dengan yang diharapkan. Proporsi alel yang diharapkan adalah 50% mengikuti MR-4 dan 50% heterozigot. Selain itu perhitungan frekuensi alel diperlukan untuk mengetahui seberapa besar penyimpangan segregasi populasi yang digunakan. Hasil perhitungan menunjukkan adanya penyimpangan frekuensi alel sebesar 3,36% cenderung ke MR-4. Jika penyimpangan yang terjadi besar, maka harus dilakukan pengulangan pemilihan sampel populasi yang digunakan. Hal ini disebabkan penggunaan populasi yang menunjukkan penyimpangan segregasi akan mempengaruhi tingkat kepercayaan uji keterpautan yang dilakukan.

Berdasarkan hasil uji X<sup>2</sup> diperoleh 18 penanda (78,26%) bersegregasi mengikuti hukum Mendell, sedangkan 5 penanda (21,74%) masing-masing 4 pada kromosom 6 dan satu 1 pada kromosom 7 menyimpang dari hukum Mendell. Dari lima 5 penanda yang menyimpang 80% cenderung ke MR-4 dan 20% heterozigot. Hal ini menunjukkan bahwa alel-alel pada 5 lokus dalam kromosom tidak bersegregasi secara bebas tetapi masih cenderung didominasi oleh tetua rentan.

#### Pembuatan Peta Pautan

Dari 23 penanda SSR yang dapat diskor diperoleh dua kelompok pautan, yaitu 12 penanda SSR pada kromosom 6 dan 11 penanda SSR pada kromosom 7. Jarak antar penanda masih agak jauh yang berkisar antara 14,4-37,5 cM. Hal ini terjadi karena masih kurangnya jumlah primer yang digunakan. Oleh sebab itu masih diperlukan penambahan primer lain yang dapat mengisi posisi di antara primer yang digunakan. Sehingga dapat dihasilkan peta pautan dengan kerapatan yang tinggi dan meliputi seluruh kromosom.

Liu (1999) menyatakan bahwa beberapa faktor yang mempengaruhi pencakupan penanda dan kerapatan peta genomik antara lain adalah panjang genom, jumlah penanda, distribusi penanda yang polimorfik, distribusi penanda dalam genom, distribusi pindah silang dalam genom, ukuran dan tipe populasi pemetaan serta strategi pemetaan. Panjang genom dan jumlah penanda akan mempengaruhi pencakupan kromosom dan kerapatan peta melalui bentuk kelompok keterpautan yang lengkap. Biasanya ketika jumlah penanda pada beberapa segmen genom dikurangi, penanda tersebut akan gagal secara bersama-

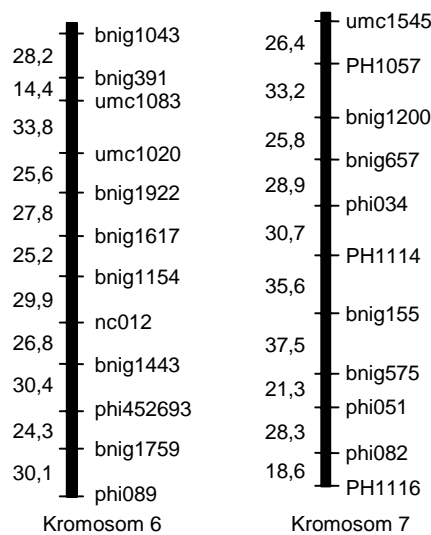
sama membentuk kelompok pautan yang lengkap. Tipe dan ukuran populasi mempengaruhi melalui isi informasi keterpautan.

Panjang kromosom 6 dan 7 yang terpetakan dalam penelitian ini berturut-turut ialah 296,5 cM dan 286,3 cM. Jarak antar penanda berkisar antara 14,4-37,5 cM dengan rata-rata jarak antar penanda sebesar 25,34 cM (Gambar 2). Jarak antar penanda yang diperoleh ini lebih besar apabila dibandingkan dengan hasil yang didapatkan oleh peneliti sebelumnya. Ruswandi *et al* (2002) mendapatkan jarak rata-rata antar penanda 18,22 cM pada hasil silangan 345 x Pi 23. Cao *et al*. (2000), mendapatkan jarak antar penanda sebesar 24,4 cM menggunakan penanda RFLP untuk karakter kekerdilan pada jagung hasil silangan 7922 x 5003. Agrama *et al*. (1999) mendapatkan jarak antar penanda yang lebih dekat, yaitu 15,55 cM pada populasi hasil silangan G62 x G58 menggunakan penanda RFLP.

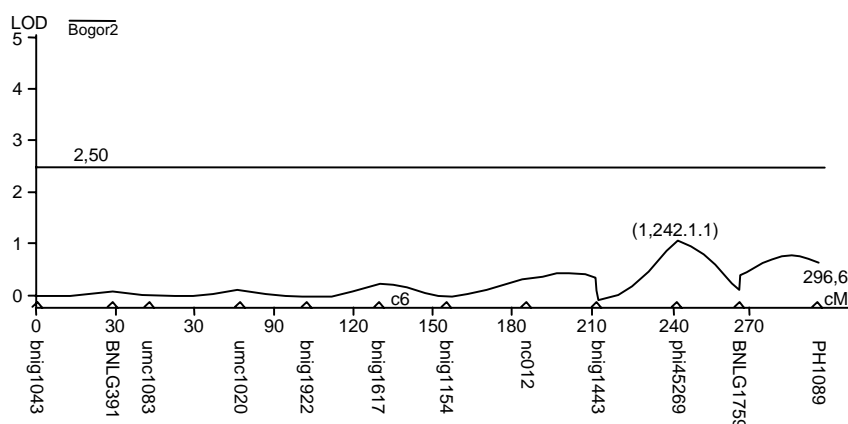
Oleh karena itu pada penelitian selanjutnya perlu dilakukan penambahan primer yang berada di antara primer-primer yang telah digunakan pada penelitian ini sehingga diharapkan akan diperoleh peta pautan SSR yang berkerapatan tinggi.

### Analisis QTL

Dari analisis QTL yang dilakukan pada kromosom 6 diketahui bahwa puncak (*peak*) yang terbentuk tidak ada yang mencapai *threshold* pada level LOD yang telah ditentukan, yaitu 2,5. Hal ini menunjukkan bahwa tidak ditemukan adanya penanda SSR yang berasosiasi dengan sifat ketahanan terhadap penyakit bulai pada kromosom ini. Walaupun dari analisis belum mampu mendeteksi adanya QTL tetapi posisi dari *peak* di antara penanda *bnlg1443* dan *phi452693* menunjukkan adanya kecenderungan putatif QTL dengan LOD 1,1 (Gambar 3). Hasil yang didapat ini berbeda



**Gambar 2.** Peta pautan 12 penanda SSR pada kromosom 6 dan 11 penanda SSR pada kromosom 7.



**Gambar 3.** Hasil analisis QTL menggunakan program WinQTL Carthographer pada kromosom 6.

dengan hasil yang dilaporkan oleh Ruswandi *et al.* (2002) dan George *et al.* (2003) bahwa mereka menemukan adanya QTL tahan bulai pada kromosom 6 berturut-turut pada posisi 112 cM dan 89 cM. Hal ini antara lain disebabkan oleh adanya perbedaan tetua yang digunakan, perbedaan penanda, dan perbedaan *strain* penyebab penyakit bulai sehingga menyebabkan perbedaan reaksi populasi terhadap spora bulai.

Ruswandi *et al.* (2002) menemukan penanda RFLP *umc65* dan *umc59* berasosiasi dengan QTL tahan bulai menggunakan tipe populasi yang sama dari silangan P 345 sebagai tetua tahan dan P 23 sebagai tetua rentan yang diamati pada bulai Filipina. Sementara George *et al.* (2003) menemukan penanda SSR *mmc0241* yang berasosiasi dengan QTL tahan bulai pada populasi K13 x CML139.

Hasil analisis QTL yang dilakukan pada kromosom 7 ditemukan 1 QTL pada posisi 276 cM yang berada di antara penanda *phi082* (267,75 cM) dan penanda *phi116* (286,39 cM) dengan nilai LOD 2,6 (Gambar 4). Posisi QTL yang ditemukan tersebut berada di antara dua penanda yang mempunyai jarak sebesar 18,6 cM. Jarak kedua penanda ini masih jauh sehingga peluang untuk terjadinya pindah silang juga masih besar. Oleh sebab itu, masih perlu dilakukan penjenjuran peta pautan melalui penggunaan penanda molekuler yang berada di antara primer tersebut. Selain itu juga perlu digunakan ukuran populasi yang besar sehingga diperoleh penanda yang berada tepat pada posisi QTL tersebut.

Presisi dalam analisis pemetaan dapat ditingkatkan dengan pembuatan populasi yang mempunyai rekombinan dengan target region QTL yang lebih banyak. Populasi ini dapat dibuat dengan memperbanyak jumlah individu dalam populasi dengan cara menanam individual tanaman dari beberapa galur (Jansen 2001). Selain itu, Frisch *et al.* (1999) menyata-

kan bahwa untuk mendapatkan posisi QTL yang optimal, selain diperlukan populasi tertentu dalam ukuran dan seleksi juga diperlukan penambahan penanda molekuler untuk mendapatkan peta pautan yang rapat. Hal ini penting terutama untuk tujuan mengisolasi gen ketahanan terhadap penyakit bulai yang dapat digunakan dalam merakit tanaman transgenik.

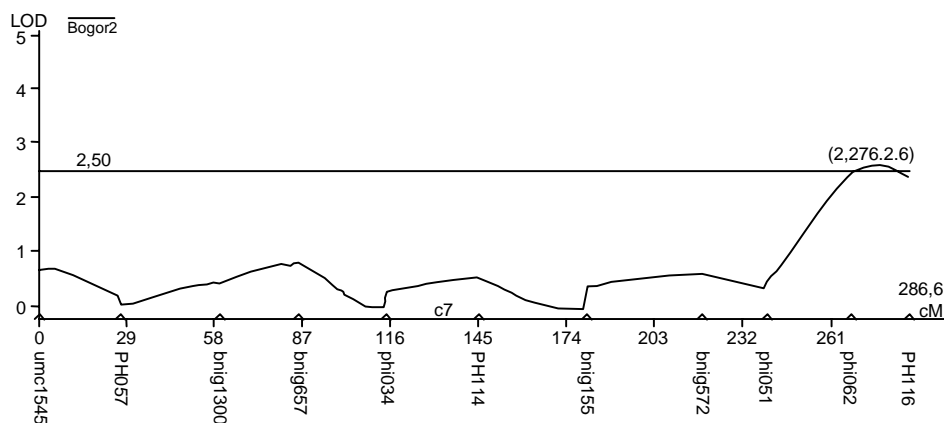
Efek QTL yang terdeteksi berdasarkan analisis adalah efek aditif dengan nilai -8,642. Nilai negatif dari efek aditif menurut Brito *et al.* (2001) menunjukkan besarnya kontribusi alel-alel tetua donor terhadap progeninya dalam mengurangi tingkat kepekaan terhadap patogen penyakit bulai. Efek aditif sangat penting artinya dalam pewarisan suatu karakter tanaman ke progeninya. Kontribusi efek aditif terhadap pewarisan gen resistensi terhadap bulai dikendalikan secara poligenik (Borges 1987).

Nilai R<sup>2</sup> untuk lokus ini sebesar 0,09 dengan varian yang ditimbulkan sebesar 8,87%, dengan demikian keragaman yang ditimbulkan oleh lokus ini masih tergolong rendah. Hal ini diduga karena masih ada lokasi QTL lain yang belum terdeteksi mengingat masih banyak kromosom lain yang belum dianalisis. Diharapkan kromosom-kromosom lain akan selesai dianalisis sehingga dugaan ini dapat dibuktikan.

**KESIMPULAN**

Dari 23 penanda SSR, 12 penanda dapat dipetakan pada kromosom 6 dengan jarak berkisar antara 14,4-30,4 cM dan 11 penanda pada kromosom 7 dengan jarak berkisar antara 18,6-37,5 cM

Persentase serangan penyakit bulai pada AMATLCOHS-9-1-1-1-1-2-B dan MR-4 serta Antasena berturut-turut 16, 76, dan 78%. Persentase serangan penyakit bulai pada BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub> (MR-4 X AMATLCOHS-9-1-1-1-1-2-B) berkisar antara 10,1-100%.



**Gambar 4.** Hasil analisis QTL menggunakan program WinQTL Carthographer pada kromosom 7.

Analisis QTL terhadap data genotipe dan fenotipe menunjukkan bahwa pada kromosom 7 didapatkan satu QTL yang berada antara penanda *phi* 082 dan *phi* 116 yang berjarak 18,6 cM dengan nilai LOD 2,6. Pada kromosom 6 tidak didapatkan QTL.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Agrama, H.A., M.E. Moussa, M.E. Naser, M.A. Tarek, and A.H. Ibrahim. 1999.** Mapping of QTL for downy mildew resistance in maize. *Theor. Appl. Genet.* 99:519-523.
- Azrai, M., H.K. Murdaningsih, N. Rostini, S. Moeljopawiro, dan D. Ruswandi. 2002.** Pemetaan QTL resistensi tanaman jagung terhadap penyakit bulai di Bogor. *Zuriat* 13:113-120.
- Azrai, M., F. Kasim, dan A. Jabbar. 2003.** Teknik penyarangan galur jagung terhadap penyakit bulai dengan menggunakan tanaman baris penyebar. *Prosiding Simposium Nasional Pengelolaan, Pemuliaan dan Plasma Nutfah.* hlm. 239-245.
- Brito-Perez, D., D. Jeffers, D. González-de-León, M. Khairallah, M. Cortés-Cruz, G. Velázquez-Cardelas, S. Azpiroz-Rivero, and G. Srinivasan. 2001.** QTL Mapping of *Fusarium moniliforme* Ear Rot Resistance in Highland Maize, Mexico. *Agrociencia* 35:181-196.
- Borges, O.L. 1987.** Diallel analysis of maize resistance to sorghum downy mildew. *Crop Sci.* 27:178-181.
- Brown, J.F. 1980.** The genetics of resistance in plants to infection by pathogens. *A Course Manual in Plant Protection.* AAUCS. p. 267-275.
- Cao, Y., G. Wang, S. Wang, Y. Wei, J. Lu, Y. Xie, and J. Dai. 2000.** Construction of a genetic map and location of quantitative trait loci for dwarf trait in maize by RFLP markers. *Chinese Science Bulletin.* p. 247-250.
- Frisch, M., M. Bohn, and A.A. Melchinger. 1999.** Minimum sample size and optimal positioning of flanking marker in marker assisted backcrossing for transfer of a target gene. *Crop. Sci.* 39:967-975.
- George, M.L.C., B.M. Prasanna, R.S. Rathore, T.A.S. Setty, F. Kasim, M. Azrai, S. Vasal, O. Balla, D. Hautea, A. Canama, E. Regalado, M. Vargas, M. Khairallah, D. Jeffers, and D. Hoisington. 2003.** Identification of QTLs conferring resistance to downy mildews of maize in Asia. *Theor. Appl. Genet.* 107:544-551.
- Hakim, R. dan M. Dahlan. 1972.** Segregating behaviour of *Sclerospora maydis* resistance on corn. *Bogor. Contr. Cent. Res. Int. Agric.* No. 9. 7 p.
- Jansen, R.C. 2001.** Quantitative trait loci in inbred lines. *In* Balding, D.J., M. Bishop, and C. Channings (*Editors*). *Handbook of Statistical Genetics.* Wiley. New York. p. 567-597.
- Kaneko, K. and B.A. Aday. 1980.** Inheritance of resistance to Philippine downy mildew of maize. *Peronosclerospora philippinensis.* *Crop Sci.* 20:590-594.
- Kasim, F., M. Azrai, Sutrisno, and D. Ruswandi. 2002.** Preliminary marker assisted selection breeding program for downy mildew resistance in Indonesia. Presented in 8<sup>th</sup> Asian Regional Maize Conference. Bangkok. Thailand.
- Liu, B.H. 1999.** Statistical genomics: Linkage, mapping and analysis. CRC Press. Boca Raton. New York. 611 p.
- McCouch, S.R. dan S.D. Tanksley. 1991.** Development and use of Restriction Fragment Length Polymorphism in rice breeding and genetics. *In* Kush, G.S. and G.H. Toenissen (*Eds.*). *Rice Biotechnology.* Biotechnology in Agriculture 8:109-133.
- Mejaya, M.J., Moedjiono, dan Koesnang. 1997.** Peningkatan ketahanan populasi jagung terhadap penyakit. *Hasil Panelitian Hama dan Penyakit.* hlm. 31-36.
- Mikoshiba, H. 1983.** Studies on the control of downy mildew disease of maize in tropical countries of Asia. *Tech. Bull. Trop. Agric. Res. Cent.* No.16. 62 p.
- Prasanna, B.M. 2002.** QTL mapping in crop plants: Principle and methodology. *In* ICAR Short Term Training Course Molecular Marker Applications in Plant Breeding. Division of Genetics. Indian Agricultural Research Institute. New Delhi. p. 71-78.
- Ruswandi, D., D.M. Hautea, A.L. Carpena, R.M. Lantikan, A.M. Salazar, and A.D. Raymundo. 2002.** Pemetaan quantitative trait locus gen resisten terhadap bulai Filipina pada jagung (*Zea mays* L.). *Zuriat* 13:27-34.
- Singh, A.K. and N.N. Kumar. 2002.** Development and characterization of mapping populations and linkage mapping in plant using molecular markers. *In* ICAR Short Term Training Course Molecular Marker Applications in Plant Breeding. Division of Genetics. Indian Agricultural Research Institute. New Delhi. p. 51-57.
- Smith, J.S.C., E.C.L. Chin, H. Shu, O.S. Smith, S.J. Wall, M.L. Senior, S.E. Mitchell, S. Kresovich, and J. Ziegler. 1997.** An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparisons with data from RFLP and pedigree. *Theor. Appl. Genet.* 95:163-173.
- Sudjono, M.S. dan Y. Subandi. 1988.** Pendugaan penurunan hasil jagung oleh penyakit bulai (*P. maydis* Rac. Shaw). *Seminar Baliitan Bogor* 1986.
- Temnykh, S. 2000.** Mapping and Genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 100:697-712.
- Triharso, T. Moertaredjo, dan L. Kusdiarti. 1976.** Recent problems and studies on downy mildew of maize in Indonesia. *Kasetsar J.* 10:101-105.
- Warburton, M.L. and D. Hoisington. 2001.** Applications of molecular markers technique to the use of International germplasm collection. *In* Plant Genotyping: The DNA Fingerprinting of Plants (*Edited*). Henry, R.J. CABI. Publishing, Wallingford. U.K. p. 89-93.