

# Faktor Virulensi *AvrBs3/PthA* pada Ras III, Ras IV, Ras VIII, dan IXO93-068 Patogen Hawar Daun Bakteri (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)

Dwinita W. Utami<sup>1\*</sup>, Triny S. Kadir<sup>2</sup>, dan Siti Yuriyah<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111  
Telp. (0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820; \*E-mail: dnitawu@windowslive.com

<sup>2</sup>Balai Besar Penelitian Tanaman Padi, Jl. Raya 9, Sukamandi-Subang 41256  
Telp. (0260) 520157; Faks. (0260) 520128

Diajukan: 6 Agustus 2010; Diterima: 25 Januari 2011

## ABSTRACT

***AvrBs3/PthA* Virulence Factor of Bacterial Leaf Blight Race III, Race IV, Race VIII, and IXO93-068.** Dwinita W. Utami, Triny S. Kadir, and Siti Yuriyah. Bacterial leaf blight (BLB) is an important disease of rice and present throughout many of the rice-growing regions in the world, also in Indonesia. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) is the causal agent and a member of the *Proteobacteria* and like many other this phylum have a type III secretion system for protein virulence effector (PVE) released on their pathogenicity system. Commonly, PVE in *Xanthomonas* sp., is coded by *AvrBs3/PthA* family gene. This research was conducted to identify the virulence factor of *AvrBs3/PthA* on dominant Indonesian BLB isolates (Race III, Race IV, Ras VIII, and IXO93-068). This objective was obtained by sequence analysis through designed markers for members of the virulence factor *AvrBs3/PthA* gene family (*PthXo4*, *avrXa7#38*, *PthXoS* and *avrXa7sacB50*). Results gave information that Race III is a dependent elicitor race due to no PVE transcript formed and intracellular protein target with RLL type on NLS (nuclear localization signal). Race IV and Race VIII are the virulent race which PVE active formed with intracellular protein target and have the RLL and RLLP type for the NLS signal. While isolate IXO93-068 is a virulent isolate that active formed a PVE but the extracellular protein target is due to no type of NLS. Based on cluster analysis, Race VIII has a genetic distance closely to *PthXoS* and *avrXa7sacB50*.

**Keywords:** Bacterial leaf blight, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *AvrBs3/PthA* virulence factor.

## ABSTRAK

**Faktor Virulensi *AvrBs3/PthA* pada Ras III, Ras IV, Ras VIII, dan IXO93-068 Patogen Hawar Daun Bakteri (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*).** Dwinita W. Utami, Triny S. Kadir, dan Siti Yuriyah. Hawar daun bakteri (HDB) merupakan penyakit penting pada padi sawah di semua wilayah di dunia, termasuk juga di Indonesia. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) adalah bakteri patogen penyebabnya, termasuk anggota filum *Proteobacteria* dan seperti banyak bakteri yang termasuk filum ini memiliki sistem

sekresi protein virulensi effector (PVE) tipe III. Pada umumnya, PVE pada bakteri *Xanthomonas* sp. dikode oleh kelompok gen *AvrBs3/PthA*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui faktor virulensi *AvrBs3/PthA* pada isolat HDB dominan di Indonesia (Ras III, Ras IV, Ras VIII, dan IXO93-068). Hasil diperoleh melalui analisis sekuen basa nukleotida berdasarkan penanda molekuler yang didisain berdasarkan sekuen basa nukleotida dari kelompok gen faktor virulensi *AvrBs3/PthA* (*PthXo4*, *avrXa7#38*, *PthXoS* dan *avrXa7sacB50*). Hasil menunjukkan bahwa elisitor Ras III bersifat dependent elicitor karena tidak ada transkrip PVE dan protein target bersifat intraseluler dengan tipe signal RLL pada bagian NLS (nuclear localization signal). Ras IV dan Ras VIII bersifat virulen karena adanya sekuen transkrip PVE dengan target protein yang bersifat intraseluler. Kedua ras memiliki signal NLS, RLL untuk Ras III dan RLLP untuk Ras VIII. Sedangkan isolat IXO93-068 bersifat virulen yang aktif membentuk PVE tetapi memiliki target protein yang bersifat ekstraseluler karena tidak terdeteksinya signal NLS. Berdasarkan analisis kelompok Ras VIII memiliki kedekatan jarak genetik dengan *PthXoS* dan *avrXa7sacB50*.

**Kata kunci:** Hawar daun bakteri, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, faktor virulensi *AvrBs3/PthA*.

## PENDAHULUAN

Penurunan produksi padi nasional setiap tahunnya mencapai 50% salah satunya disebabkan oleh serangan penyakit hawar daun bakteri (HDB). Penyakit ini disebabkan oleh bakteri *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Shen dan Ronald, 2002). Perkembangan penyakit HDB di Indonesia, pertama kali dilaporkan oleh Reitsman dan Schure pada tahun 1950 (Reitsman dan Schure, 1950). Selanjutnya Schure berhasil mengidentifikasi organisme penyebab penyakit HDB, yang pada waktu itu dikenal dengan *Xanthomonas kresek* (Schure). Namun hasil penelitian Goto (1964) menunjukkan bahwa patogen penyebab HDB di Indonesia sama seperti yang menyerang tanaman padi di Jepang, sehingga namanya diganti menjadi *Xanthomonas oryzae* (Uyeda et Ishiyama) Dowson. Pada tahun 1976, nama patogen ini menjadi *Xanthomonas campestris*

pv. *oryzae* dan sejak tahun 1992 oleh Swing *et al.* (1990) dinamakan *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.

Bakteri patogen *X. oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) membentuk strain baru di lapang sejalan dengan perkembangan penggunaan varietas padi. Perbedaan virulensi antar isolat Xoo yang berasal dari berbagai daerah merupakan manifestasi dari kedinamikan interaksi antara inang dengan patogen. Pada awalnya, pengelompokan isolat HDB di Indonesia mengikuti sistem Kozaka seperti yang digunakan di Jepang (Kozaka, 1969). Dengan sistem Kozaka tersebut, Yamamoto *et al.* (1977) berhasil mengelompokkan isolat Xoo yang ada di Indonesia menjadi tiga kelompok strain, yaitu strain III, IV, dan V. Strain III mempunyai daerah sebaran yang paling luas, meliputi Sulawesi Selatan, Kalimantan Selatan, Jawa, dan Bali. Berdasarkan sistem Kozaka menggunakan varietas diferensial Indonesia, berhasil diidentifikasi kelompok strain yang lain, yaitu strain VI, VII, dan VIII (Horino dan Hifni, 1978). Selanjutnya Horino dan Hifni (1981) juga mengidentifikasi adanya kelompok strain yang baru lagi, yaitu strain I, II, dan IX, sehingga kelompok strain yang ada di Indonesia menjadi sembilan.

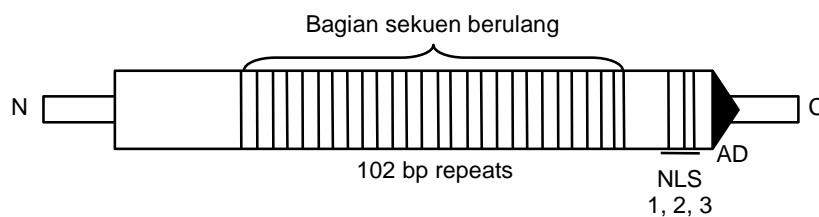
Varietas IR64 diintroduksi dan dilepas sebagai varietas unggul di Indonesia pada tahun 1986. Varietas ini sangat digemari oleh petani dan konsumen karena rasa nasi yang enak, umur genjah, dan produksi yang relatif tinggi. IR64 merupakan varietas paling luas ditanam di Indonesia (2.118.000 ha) (Direktorat Bina Perbenihan, 2000). Namun demikian varietas IR64 bersifat rentan terhadap HDB. Sebagai akibat dari luasnya penanaman varietas IR64, keragaman patogen ini bertambah, yaitu dengan munculnya kelompok strain yang lain, sehingga sampai tahun 1994 menurut sistem Kozaka telah diidentifikasi 11 kelompok strain Xoo dengan tingkat virulensi yang berbeda-beda. Di antara strain tersebut, kelompok strain IV merupakan kelompok strain yang virulensinya paling tinggi (Kardin dan Hifni, 1993). Sedangkan dilihat dari penyebarannya strain III, IV, dan VIII adalah strain HDB yang memiliki penyebaran paling luas dan bersifat dominan di beberapa lokasi endemik penyakit HDB di Indonesia (Kadir *et al.*, 2009).

Bakteri patogen *X. oryzae* pv. *oryzae* adalah bakteri yang termasuk filum *Proteobacteria*. Pada umumnya bakteri kelompok ini memiliki sistem sekresi tipe III (*Type III Secretion Systems*, TTSS) dalam mekanisme patogensitasnya (Staskawicz *et al.*, 2001). TTSS berfungsi untuk mensekresikan *protein virulence effector* (PVE) (Buttner *et al.*, 2002). Pada umumnya, bakteri patogen *Xanthomonas* sp. memiliki PVE yang dikode oleh suatu kelompok gen (*family genes*) yang dikenal dengan nama *AvrBs3/PthA*. Beberapa gen yang termasuk dalam kelompok gen *AvrBs3/PthA* adalah gen *PthXo1*, *PthXo2*, dan *PthXoS* (Salanoubat *et al.*, 2002). Yang dan White (2004) menyebutkan bahwa ketiga gen tersebut dapat berkontribusi membentuk PVE yang spesifik (*compatible*) terhadap gen ketahanan Xoo, yaitu gen *Xa7* yang terdapat pada tanaman padi. Sebagian besar gen-gen virulensi yang termasuk *AvrBs3/PthA* berukuran 4,341 pasang basa yang di antaranya terdiri atas bagian sekuen berulang (*repeat domain*) yang berukuran 102 pasang basa pada bagian *coding sequence*-nya (White *et al.*, 2000). Bagian sekuen berulang yang terdapat pada bagian C terminal dari gen *AvrBs3/PthA* berkontribusi dalam fungsi penentuan spesifisitas virulensi patogen terhadap inangnya. Secara skematik gen virulensi *AvrBs3/PthA* disajikan pada Gambar 1.

Berdasarkan karakterisasi struktur fungsional dari gen yang termasuk dalam kelompok gen *AvrBs3/PthA* diketahui bahwa pada bagian C terminal memiliki fungsi yang penting, yaitu untuk aktivasi fungsi virulensi dan proses *targetting* PVE yang dihasilkan patogen Xoo ke dalam tanaman inangnya.

Reaksi patogenitas isolat-isolat di atas terhadap gen *Xa7*, yaitu pada galur isogenik IRBB7 dan pada varietas kontrol peka, TN1, yang merupakan data hasil pengujian di rumah kaca (MH 2007) dan lapang (Cianjur, MK 2005), seperti pada Tabel 1.

Data pada Tabel 1 menunjukkan bahwa gen *Xa7* yang terdapat pada galur isogenik IRBB7 memberikan respon agak tahan terhadap tiga dari empat isolat yang diinokulasikan. Sedangkan terhadap isolat IXO93-068, galur isogenik IRBB7 menunjukkan respon peka. Hal ini menunjukkan bahwa berdasarkan gen *Xa7* bersifat



**Gambar 1.** Peta skematik gen virulensi *AvrBs3/PthA*. *Functional region* pada bagian C terminal yang: domain aktivasi *acidic* (AD), 3 motif *signal nuclear localization* (NLS) yang berfungsi untuk *targetting* protein dari gen ini (Yang dan White, 2004).

**Tabel 1.** Reaksi keempat isolat HDB pada varietas kontrol.

Varietas	Ras III		Ras IV		Ras VIII		IXO93-068	
	Int (%)	Respon	Int (%)	Respon	Int (%)	Respon	Int (%)	Respon
IRBB7	9,27	AT	7,75	AT	9,78	AT	26,7	P
TN1	21,01	P	40,53	P	29,4	P	28,8	P

T (tahan): 1-5%, AT (agak tahan): 6-25%, AP (agak peka): 26-50%, P (peka): 51-75%.

kompatibel terhadap Ras III, Ras IV, dan Ras VIII, sehingga bereaksi tahan. Namun bersifat tidak kompatibel terhadap isolat IXO93-068, sehingga menunjukkan respon peka.

Berdasarkan gambar skematik gen virulensi *AvrBs3/PthA* pada Gambar 1, Yang *et al.* (2000) menerangkan bahwa terdapat tiga domain yang memiliki fungsi penting dalam sistem patogenesis patogen HDB. Ketiga domain tersebut adalah:

1. Domain sekuen berulang (*repeat domain*) yang berfungsi untuk membentuk PVE yang spesifik terhadap gen ketahanan *Xa7*. Pada domain inilah seringkali terjadi *dual acting virulence* secara alami, yaitu perubahan aktivitas virulensi pada patogen yang meskipun tidak memiliki gen *avrXa7* namun dapat menyerang inang yang memiliki gen ketahanan *Xa7*, karena memiliki gen *avr* yang lain yang termasuk *family genes AvrBs3/PthA*.
2. Domain *acidic transcriptional activation* (AD domain) yang berfungsi dalam pembentukan PVE yang bersifat spesifik terhadap inang tanaman yang diserang. Patogen akan bersifat virulen (dapat menyerang inang) apabila domain ini aktif mentranskripsikan PVE sebagai protein *elicitor*. Selanjutnya PVE akan berinteraksi dengan gen ketahanan pada tanaman inang secara spesifik.
3. Domain *nuclear localization signal* (domain NLS) yang berfungsi dalam proses *targetting* protein virulen ke dalam inti sel tanaman inang. Patogen yang termutasi dengan dihilangkan domain NLS-nya akan kehilangan aktivitas virulensinya.

Dalam kaitannya untuk tujuan mengidentifikasi faktor virulensi *AvrBs3/PthA* pada beberapa strain Xoo yang dominan di Indonesia, yaitu Ras III, Ras IV, Ras VIII, dan isolat IXO93-068 maka penelitian ini dilakukan dengan cara mendisain beberapa marka untuk gen-gen *AvrBs3/PthA*. Marka-marka tersebut selanjutnya digunakan untuk mengkarakterisasi ciri spesifik dari masing-masing ras/isolat HDB penting tersebut di atas.

## BAHAN DAN METODE

### Materi Genetik

Biakan murni Xoo, yaitu Ras III, Ras IV, Ras VIII, dan isolat IXO93-068 yang ditumbuhkan pada media

nutrient broth (Difco Laboratories, Detroit) pada suhu 27°C. Tiga Ras dan satu isolat yang digunakan adalah koleksi BB-Biogen yang berasal dari beberapa lokasi endemik penyakit HDB di Indonesia yang dikoleksi mulai tahun 1993 sampai dengan tahun 2008 dan koleksi BB Padi yang dikoleksi pada tahun 2007, masing-masing dengan nomor koleksi sebagai berikut: Ras III (8024), Ras IV (76024), Ras VIII (T-Cjr1-08), dan isolat IXO93-068 (93-068).

### Isolasi DNA Genom Patogen Xoo

Isolasi DNA genom Xoo dilakukan dengan mengambil 5 ml biakan/kultur Xoo yang ditumbuhkan dalam media *Nutrient Broth* (Difco Laboratories, Detroit), umur 48 jam. Ekstraksi DNA dilakukan dengan CTAB-NaCl, sesuai dengan metode yang dilakukan oleh Ardales *et al.* (1996).

### Disain Primer

Beberapa marka untuk gen-gen *AvrBs3/PthA* didisain berdasarkan sekuen basa nukleotida pada bagian C terminal dari gen-gen berikut (EMBL sequence database):

1. Marka *avrXa7-1* untuk menandai gen *PthXo4* (EMBL AAS58127.2).
2. Marka *avrXa7-2* untuk menandai gen *avrXa7#38* (EMBL AAS58128.2).
3. Marka *avrXa7-3* untuk menandai gen *PthXoS* (EMBL AAS58129.3).
4. Marka *avrXa7-4* untuk menandai gen *avrXa7-sacB50* (EMBL AAS58130.3).

Sekuen marka untuk gen *AvrBs3/PthA* ditampilkan pada Tabel 2. Marka *avrXa7-1*, *avrXa7-2*, dan *avrXa7-3* didisain berdasarkan modifikasi sekuen (insersi ataupun delesi) basa nukleotida dari gen *AvrBs3/PthA* yang bersifat kompatibel terhadap gen *avrXa7*, sedangkan marka *avrXa7-4* didisain berdasarkan sekuen basa gen *avrXa7*.

### Amplifikasi PCR

Beberapa primer tersebut selanjutnya digunakan dalam analisis PCR dengan komposisi dalam total volume 20 µl, terdiri atas: 10x Bufer PCR (+Mg) 2 µl, GC rich bufer 4 µl, 2 mM dNTPs 1 µl, 10 mM primer

(F+R) 3 µl, 5 unit/µl Taq Polimerase 0,25 µl, dan 10 ng/µl DNA template 5 µl.

Sedangkan proses PCR-nya dilakukan dengan mesin *thermo cycler*, dengan program: denaturasi awal 95°C 5 menit, dilanjutkan dengan 45 siklus untuk: 94°C 1 menit, 36°C 1 menit, 72°C 2 menit, *final elongation* pada 72°C selama 5 menit.

### Analisis Pengurutan Basa Nukleotida DNA

Hasil PCR yang diperoleh selanjutnya dilakukan purifikasi dengan enzim *eksonuklease I* 0,025, *Shrimp Alkaline Phosphatase* 0,250, dan MiliQ 9,725 sehingga jumlah total volume mencapai 10,0 µl. Prosedur purifikasi produk amplifikasi ini dirujuk pada *The ExoSAP protocol from Amersham Pharmacia, Biotech*. Campuran larutan tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit kemudian 95°C selama 5 menit. Sebelum dianalisis ke tahap lebih lanjut, hasil purifikasi ini dapat disimpan pada suhu -20°C.

Produk PCR yang telah dipurifikasi, diencerkan dan dicampur dengan *Beckman DTCS quick start kit* dengan *fluorescent dyes*, kemudian dimasukkan ke dalam mesin PCR untuk reaksi pelabelan urutan, yaitu denaturasi awal pada 96°C selama 1,5 menit, diikuti dengan 30 siklus (96°C selama 20 detik, *annealing* 50°C selama 20 detik, *extension* 60°C selama 4 menit). Tahapan selanjutnya dilakukan presipitasi etanol. Sampel dimikrosentrifugasi dengan *glycogen mixture* (2,0 µL CH<sub>3</sub>COOH 3 M (pH 5,2), 2,0 µL Na<sub>2</sub>-EDTA 100 mM (pH 8,0), dan 1,0 µL glikogen 20 mg/ml), kemudian ditambahkan 60 µL etanol absolut dingin, dan disentrifugasi 14.000 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit. Mikropipet digunakan untuk membuang supernatan sedangkan pelet dibilas dua kali dengan 200 µL etanol 70%, setiap kali dibilas harus disentrifugasi terlebih dahulu pada kecepatan 14.000 rpm selama 2 menit dalam keadaan dingin. Setelah sampel selesai dipresipitasi dengan etanol, kemudian sampel dicampur dengan 40 µL larutan *Simple Loading Solution* (SLS), dan *dirunning* dalam mesin CEQ8000.

### Penentuan Aktivitas Virulensi

Dasar penentuan aktivitas virulensi dilakukan berdasarkan variasi sekuen basa nukleotida pada ketiga domain penting yang meliputi: AD domain dan NLS domain seperti yang dikemukakan oleh Yang *et al.* (2005).

### Penentuan Jarak Genetik

Jarak genetik antar isolat Ras III, Ras IV, Ras VIII, dan IXO93-068 ditentukan berdasarkan metode Neighbor-Joining/UPGMA version 3.6a2.1 dengan program BioEdit berdasarkan variasi sekuen basa nukleotida.

### Hasil dan Pembahasan

Dalam penelitian ini empat marka molekuler yang digunakan (Tabel 2) memiliki perbedaan variasi basa nukleotida pada domain-domain penting di atas. Variasi basa nukleotida dari masing-masing marka yang digunakan seperti pada Gambar 2.

Gen *PthXo4* dan *PthXoS* pada posisi pertama (basa ke-39) memiliki variasi basa TGA yang merupakan signal *stop codon*. Terdapatnya signal *stop codon* ini menyebabkan tidak adanya aktivitas transcriptional PVE sehingga patogen menjadi bersifat avirulen. Untuk gen *avrXa7#38*, pada posisi ini terjadi delesi. Sedangkan gen *avrXa7sacB50* yang merupakan sekuen spesifik untuk gen *Xa7* memiliki basa GCG yang merupakan kode untuk asam amino Alanine. Karena tidak adanya signal *stop codon* pada kedua gen tersebut menyebabkan aktivitas transkripsi PVE oleh patogen tetap aktif (Yang *et al.*, 2000). Adanya delesi pada basa posisi 69 sampai dengan 86 untuk gen *PthXo4* dan *PthXoS* menunjukkan tidak adanya proses *targetting* PVE ke dalam inti sel tanaman inang. Sedangkan untuk gen *avrXa7#38* dan *avrXa7sacB50* pada posisi basa ke-69 sampai 86 ini memiliki signal NLS, sehingga memiliki aktivitas *targetting* protein PVE secara intraseluler (White dan Yang, 2009).

Keempat marka untuk gen *avrXa7* selanjutnya digunakan untuk analisis PCR pada isolat HDB yang

**Tabel 2.** Beberapa marka molekuler yang didisain dengan teknik insersi atau delesi untuk identifikasi gen-gen yang termasuk kelompok gen *AvrBs3/PthA*.

Gen	Kode marka	Primer sequence	Keterangan
<i>PthXo4</i> (1-1881)	<i>avrXa7-1</i>	F tcagcagcagcaagagaaga R ttacagtggacacaggcca	Tipe III <i>bacterial effector protein</i> , <i>AvrBs3/PthA</i> gene family, <i>internal deletion derivative avrXa7 compatible</i>
<i>avrXa7#38</i> (1-2301)	<i>avrXa7-2</i>	F gccggaattgatcagaagaa R gcttggtacagcttttcgc	Tipe III <i>bacterial effector protein</i> , <i>AvrBs3/PthA</i> gene family, <i>internal deletion derivative avrXa7</i>
<i>PthXoS</i> (1-2388)	<i>avrXa7-3</i>	F gagagcattgtgccagtt R cggcgattgattctctgat	Tipe III <i>bacterial effector protein</i> , <i>AvrBs3/PthA</i> family gene, <i>insertion/deletion derivative avrXa7 compatible</i>
<i>avrXa7-sacB50</i>	<i>avrXa7-4</i>	F gtggttcgctgctgtggttt R acgcctgatccggtgttgag	Tipe III <i>bacterial effector protein</i> , <i>AvrBs3/PthA</i> gene family, gen <i>avrXa7</i>

digunakan dalam pengujian, yaitu Ras III, Ras IV, Ras VIII, dan isolat IXO93-068 yang masing-masing diambil pada beberapa galur inang peka yang berbeda. Hasil dari analisis PCR seperti pada Gambar 3.

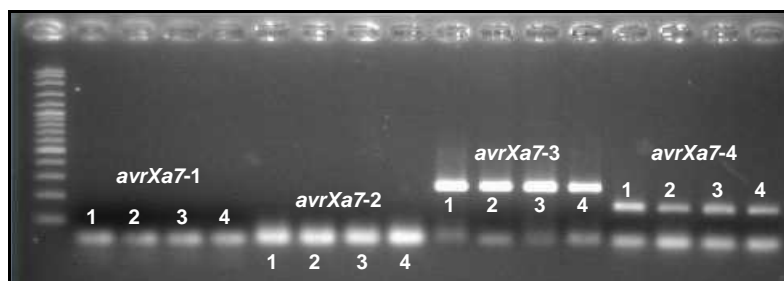
Pada Gambar 3 menunjukkan bahwa pada sampel Ras III (94-003), Ras IV (76024), Ras VIII (8024), dan isolat IXO93-068 dengan marka *avrXa7-3*, diperoleh hasil amplifikasi PCR berukuran  $\pm 300$  bp dan dengan marka *avrXa7-4* diperoleh hasil amplifikasi berukuran  $\pm 200$  bp. Hal ini menunjukkan bahwa pada tiga ras atau satu isolat HDB yang digunakan dalam pengujian ini memiliki gen *PthXoS* dan *avrXa7-sacB50*, di mana keduanya merupakan gen yang termasuk *family genes*

*AvrBs3/PthA*. Keempat sampel ras dan isolat uji HDB di atas bersifat monomorfik untuk kedua marka gen *avrXa7-3* dan *avrXa7-4*. Untuk melihat polimorfisme di antara ras dan isolat HDB yang digunakan maka analisis dilanjutkan pada tingkat basa nukleotida melalui analisis sekuensing.

Hasil analisis sekuensing yang ditampilkan pada Gambar 4 terlihat adanya variasi basa pada domain AD dan domain NLS. Di antara tiga ras dan satu isolat patogen HDB yang dianalisis hanya Ras III yang pada domain AD memiliki basa ATG yang merupakan *stop codon*, seperti halnya pada gen *PthXoS*. Sedangkan pada Ras IV dan Ras VIII memiliki signal asam amino

		L	T	P	D	Q	V	V	A	I	A	S	N	S	G	G	K	Q	A	L	E	T	V	Q	R	L	L	Q	T	D	H	G
1. <i>PthXoA</i>	1	CTG	ACC	CCG	AAC	CAG	GTG	GTG	GCC	ATC	GCC	AGC	AAT	TGA	GGC	GGC	AAG	CAG	GCG	CTG	GAG	ACG	GTG	CAG	CGG	CTG	TTG	---	---	---	---	---
2. <i>avrXa7-#38</i>		L	T	P	D	Q	V	V	A	I	A	S	N	---	G	G	K	Q	A	L	E	T	V	Q	R	L	L	P	V	---	---	---
		CTG	ACC	CCG	GAC	CAG	GTG	GTG	GCC	ATC	GCC	AGC	AAT	---	GGC	GGC	AAG	CAG	GCG	CTG	GAG	ACG	GTG	CAG	CGG	CTG	TTG	CGG	GTG	C-	---	---
		L	T	P	D	Q	V	V	A	I	A	S	N	S	G	G	L	A	L	E	T	V	V	---	R	L	L	P	V	---	---	---
3. <i>PthXoS</i>		CTG	ACC	CCG	GAC	CAA	GTG	GTG	GCC	ATC	GCC	AGT	AAT	---	GGC	GGC	AAG	CAG	GCG	CTG	GAG	ACG	GTG	C-	---	---	---	---	---	---	---	---
		L	T	N	D	T	S	S	P	T	P	V	S	V	A	N	S	C	P	G	C	V	---	R	L	L	P	V	L	---	---	
		TTG	ACC	AAC	GAC	ACC	TGG	TGG	CCT	TGG	CCT	GCC	TCG	GCC	GAC	-G	TCC	TGC	CCT	GGA	TGC	A-	GTG	---	CGG	CTG	TTG	CGG	GTG	CTG	---	---
4. <i>avrXa7sacB50</i>														CGC	GAC	-G	TCC	TGC	CCT	GGA	TGC	A-	GTG	---	CGG	CTG	TTG	CGG	GTG	CTG	---	---

**Gambar 2.** Variasi basa nukleotida (1-102) dan asam amino di antara keempat gen yang termasuk dalam *family genes AvrBs3/PthA* pada bagian sekuen berulang (*repeat domain*) yang secara berturut-turut nomor 1 sampai dengan 4 telah didisain marka *avrXa7-1*, *avrXa7-2*, *avrXa7-3*, dan *avrXa7-4*. Variasi basa nukleotida dan asam amino terlihat pada sekuen asam amino (bergaris bawah) yang tercetak warna merah dan ditandai dalam kotak. Terlihat adanya variasi basa nukleotida pada 2 lokasi (sekuen tercetak merah dan di dalam kotak), yaitu pada posisi basa ke-39 (asam amino ke-13) yang merupakan domain AD dan posisi basa ke-70 sampai dengan 87 atau posisi asam amino ke-24 sampai ke-29, yang merupakan domain NLS.



**Gambar 3.** Hasil amplifikasi PCR beberapa sampel isolat HDB yang digunakan dalam pengujian, yaitu (1) Ras III (94-003), (2) Ras IV (76024), (3) Ras VIII (8024), dan (4) isolat IXO93-068, menggunakan empat marka untuk kopi gen *avrXa7*, yaitu *avrXa7-1*, *avrXa7-2*, *avrXa7-3*, dan *avrXa7-4*.

<i>PthXoS</i>	GAC	CAA	GTG	GTG	GCC	ATC	GCC	AGT	AAT	STOP TGA	GGC	GGC	AAG	CAG	GCG	CTG	GAG	ACG	GTG	C-	---	---	---	---	---	---	---	TGT	GCC	AGG	ACC	ATG	GCC	TGA	CCC
<i>avrXa7sacB50</i>	GAC	ACC	TCG	TCG	CCT	TGG	CCT	GCC	TCG	CGC	GAC	---	TCC	TGC	CCT	GGA	TGC	A-	GTG	---	CGG	CTG	TTG	CGG	GTG	CTG	---	CGG	TCC	CAT	CGC	GTT	CCC	GAC	CTC
Ras VIII	GAG	ACC	ACC	TCG	CCA	TCG	CCA	AGT	AAT	CGC	GA-	---	GTG	CTG	GCC	TGG	TTC	AGC	GTG	---	CGG	CTG	TTG	CGC	---	---	---	ACG	TCC	CAG	CGC	GTG	CCC		
IXO93-068	---	ACT	ACC	---	CCG	TCG	CCT	TCG	TCG	GTG	GAC	---	---	-TG	GCC	TGG	ATG	CGG	GTG	---	---	---	---	---	---	---	---	TGT	GCC	AGG					
Ras III	---	ACT	ACC	GTG	CCC	CCT	TC	CTT	GTG	STOP TGA	GCC	ACG	AAG	CAG	GCG	TGG	ATG	CGG	GTG	CAG	CGG	CTG	CGC	---	---	---	---	ACG	TCC	CAT					
Ras IV	TGT	TCT	ACC	TCG	TCG	CCT	TCG	GCT	GTG	STOP GCT	GAC	---	-TC	CAG	GCC	TGG	ATG	CAG	GTG	CAG	CGG	CTG	CGC	---	---	---	AGG	TCC	AGG	CGC					

**Gambar 4.** Perbandingan variasi basa nukleotida antara gen *PthXoS* dengan *avrXa7sacB50* dengan isolat-isolat HDB (Ras III, Ras IV, Ras VIII, dan isolat IXO93-068) menggunakan marka gen *AvrBs3/PthA* (*avrXa7-1*, *avrXa7-2*, *avrXa7-3*, dan *avrXa7-4*). Variasi basa pada domain AD dan domain NLS ditunjukkan pada basa nukleotida yang tercetak merah di dalam kotak. Variasi asam amino tercetak di atas masing-masing triplet kodon pada kedua domain ini.

Alanine dan pada isolat IXO93-068 memiliki asam amino Valine.

Hasil sekuensing pada Gambar 4 juga menunjukkan bahwa terdapat beberapa tipe signal NLS yang diperoleh. Signal paling panjang terdapat gen *avrXa7sacB50*, yaitu signal asam amino RLLPV. Motif asam amino RLL merupakan motif paling banyak diperoleh, yaitu pada gen *PthXoS*, Ras III, dan Ras IV. Pada Ras VIII memiliki signal NLS: RLLP. Sedangkan pada isolat IXO93-068 tidak didapatkan adanya signal NLS karena pada posisi ini terjadi delesi basa nukleotida. Secara keseluruhan hasil analisis perbandingan variasi basa nukleotida di atas dapat ditampilkan seperti pada Tabel 3.

Seperti telah disebutkan sebelumnya bahwa pada gen *PthXoS* dan Ras III memiliki signal *stop codon* pada domain AD sehingga tidak terbentuk transkrip PVE. White dan Yang (2009) menyebutkan bahwa gen *PthXo4* adalah termasuk gen dengan aktivitas *dependent elicitor* karena berkaitan dengan hilangnya aktivitas produksi PVE. Aktivitas virulensi patogen yang bersifat *dependent elicitor* dapat dikompensasi oleh beberapa gen virulensi yang lain melalui mekanisme horizontal gen transfer (Yang *et al.*, 2005). sehingga untuk aktivasi virulensinya memerlukan protein *elicitor* lain. Protein *elicitor* ini selanjutnya dapat ditargetkan secara intraseluler ke dalam inti sel tanaman inangnya karena memiliki signal NLS yang bertipe RLL. Aktivitas virulensi seperti ini juga dimiliki oleh Ras III. Dua sampel patogen lain yang digunakan, yaitu Ras IV dan Ras VIII memiliki signal Alanine pada domain AD, sehingga terbentuk transkrip PVE yang dapat ditranslokasikan secara intraseluler karena terdapat signal NLS, yaitu RLL untuk Ras IV dan RLLP untuk Ras VIII. Kedua ras ini termasuk ras HDB yang bersifat virulen. Sedangkan pada isolat IXO93-068 memiliki signal pada domain AD, yaitu asam amino Valine (GTC) sehingga terbentuk transkrip PVE. Namun karena terjadinya delesi pada domain NLS maka PVE ditranslokasi secara ekstraseluler. Hasil analisis di atas terdapat dua

marka penanda gen avirulen yang berkaitan dengan gen ketahanan *Xa7*, yaitu marka *axrXa7-3* sebagai penanda gen *avr PthXoS* dengan aktivitas virulensi yang bersifat avirulen karena adanya *stop codon* pada AD domain dan delesi pada NLS domain. Sedangkan marka *avrXa7-4* sebagai penanda gen *avrXa7sacB50* dengan aktivitas virulensi yang bersifat virulen intraseluler karena adanya codon alanin pada AD domain dan signal lengkap *targetting* protein RLLPVL pada NLS domain.

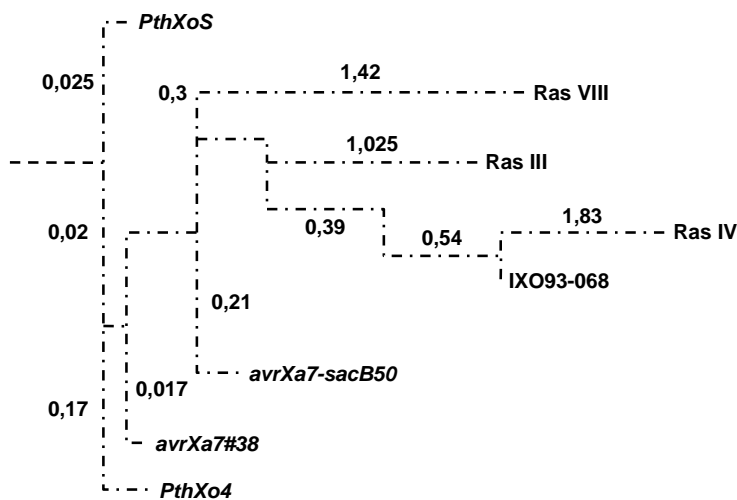
Berdasarkan analisis variasi basa nukleotida keempat sampel patogen HDB selanjutnya ditentukan jarak genetik antar masing-masing sampel terhadap dua gen *AvrBs3/PthA* yang terdeteksi, yaitu *PthXoS* dan *avrXa7sacB50* dan hasil jarak genetik antar sampel tersebut seperti ditampilkan pada Gambar 5.

Hasil pada Gambar 5 menunjukkan bahwa jarak genetik terdekat tiga ras HDB, yaitu Ras III, Ras IV, Ras VIII, dan isolat IXO93-068 dengan gen *avrXa7sacB50*, yaitu salah satu alel gen *avr* untuk gen ketahanan *Xa7*. Di antara keempat sampel HDB yang memiliki jarak genetik terdekat adalah Ras IV, dengan jarak genetik 1,50 (Tabel 4). Sedangkan jarak genetik paling jauh di antara empat sampel HDB yang dianalisis terhadap gen *avrXa7sacB50* adalah Ras III, yaitu sebesar 2,33 (Tabel 4). Hal ini menunjukkan bahwa Ras IV memiliki faktor virulensi *AvrBs3/PthA* yang paling mirip dengan aktivitas virulensi *avrXa7sacB50*. Sebaliknya dengan Ras III memiliki aktivitas virulensi paling berbeda dengan aktivitas *avrXa7sacB50*.

Matriks jarak genetik pada Tabel 4 juga menunjukkan bahwa di antara empat isolat HDB yang digunakan dalam pengujian, yaitu Ras III, Ras IV, Ras VIII, dan isolat IXO93-068, yang memiliki jarak genetik berdekatan dengan gen *PthXoS* adalah Ras III dan isolat IXO93-068, yaitu masing-masing memiliki jarak genetik sebesar 1,43 dan 1,34. Hasil ini menunjukkan bahwa kedua sampel HDB memiliki aktivitas virulensi yang mirip dengan gen *PthXoS*. Hasil analisis aktivitas virulensi pada Tabel 4, menunjukkan bahwa Ras III

**Tabel 3.** Faktor dan aktivitas virulensi beberapa gen *AvrBs3/PthA* dan empat sampel patogen HDB, yaitu Ras III, Ras IV, Ras VIII, dan isolat IXO93-068.

Sampel HDB	Faktor virulensi <i>AvrBs3/PthA</i> .		Aktivitas virulensi
	Transkrip PVE (AD Domain)	Signal <i>targetting</i> protein (NLS Domain)	
<i>PthXo4</i>	- : TGA ( <i>stop codon</i> )	RLL	<i>Dependent elicitor</i> , intraseluler
<i>avrXa7#38</i>	+ : Delesi <i>stop codon</i>	RLLPV	Virulen, intraseluler
<i>PthXoS</i>	- : TGA ( <i>stop codon</i> )	- (Delesi)	Avirulen
<i>avrXa7sacB50</i>	+ : GCG (alanin)	RLLPVL	Virulen, intraseluler
Ras III	- : TGA ( <i>stop codon</i> )	RLL	<i>Dependent elicitor</i> , intraseluler
Ras IV	+ : GCT (alanin)	RLL	Virulen, intraseluler
Ras VIII	+ : GCG (alanin)	RLLP	Virulen, intraseluler
IXO93-068	+ : GTC (valin)	- (Delesi)	Virulen, ekstraseluler



Gambar 5. Jarak genetik antara masing-masing ras/isolat uji yang digunakan dengan gen AvrBs3/PthA, yaitu PthXoS dan avrXa7sacB50.

Tabel 4. Matriks jarak kedekatan genetik<sup>1)</sup> isolat uji HDB, yaitu Ras III, Ras IV, Ras VIII, dan isolat IXO93-068 terhadap gen avrBs3/PthA.

	Ras III	Ras IV	Ras VIII	IXO93-068	avrXa7-sac50	avrXa7#38	PthXo4	PthXoS
Ras III	-	2,78	2,06	1,37	2,33	2,14	2,29	1,43
Ras IV		-	2,75	1,96	1,50	1,70	1,56	2,17
Ras VIII			-	2,65	1,97	2,08	2,25	2,13
IXO93-068				-	1,59	1,31	1,46	1,34
avrXa7-sac50					-	0,59	0,74	0,77
avrXa7#38						-	0,187	0,21
PthXo4							-	0,19
PthXoS								-

<sup>1)</sup> ditentukan berdasarkan skala DNA max Ln Likelihood (Felsenstein, 1981).

memiliki stop codon pada AD Domain yang sama dengan gen PthXoS. Sedangkan pada NLS Domain Ras III memiliki signal targeting protein RLL, di mana pada gen PthXoS tidak ada signal karena terjadi delesi pada region ini. Yang et al. (2000) menyebutkan bahwa faktor virulensi AvrBs3/PthA dengan stop codon pada AD Domain tetapi memiliki signal targeting protein pada NLS Domain akan bersifat virulen dengan induksi protein elicitor (PVE) dari patogen lain (dependent elicitor). Hal ini mengindikasikan bahwa kalau selama ini Ras III digolongkan sebagai ras yang bersifat virulen lemah, ini karena adanya stop codon pada AD Domain. Namun demikian Ras III berpotensi terinduksi oleh PVE ras HDB yang lain sehingga membentuk ras yang lebih virulen

KESIMPULAN

Faktor virulensi avrBs3/PthA pada Ras III, Ras IV, Ras VIII, dan isolat IXO93-068 menunjukkan bahwa Ras III adalah ras yang dependent elicitor karena tidak membentuk PVE dan bersifat intraseluler dengan tipe RLL sebagai signal NLSnya. Ras IV dan VIII adalah ras

yang virulen aktif membentuk PVE dan bersifat intraseluler yang berturut-turut bertipe RLL dan RLLP sebagai signal NLSnya. Isolat IXO93-068 adalah isolat virulen aktif membentuk PVE tetapi bersifat ekstraseluler karena tidak memiliki signal NLS.

Ras IV memiliki faktor virulensi AvrBs3/PthA yang paling mirip dengan aktivitas virulensi avrXa7SacB50. Jarak genetik Ras III dan isolat IXO93-068 berdekatan dengan PthXoS. Ras III bersifat dependent elicitor dan intraseluler sehingga berpotensi terinduksi oleh PVE ras HDB yang lain untuk membentuk ras yang lebih virulen.

DAFTAR PUSTAKA

Ardales, E.Y., C.M.V. Cruz, T.W. Mew, and R.J. Nelson. 1996. Hierarchical analysis of a patial variation of the rice bacterial blight pathogen across agroecosystems in the Philippines. Phytopathology 86:24-252.  
 Buttner, D. and U. Bonas. 2002. Getting across bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. EMBO J. 21:5313-5322.

- Direktorat Bina Perbenihan. 2000. Inventarisasi penyebaran varietas padi (ha) MT 2000 seluruh Indonesia. Ditjen Tanaman Pangan dan Hortikultura, Deptan. Jakarta.
- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequence: a maximum likelihood approach. *J. Molecular Evolution* 17:368-376.
- Goto, M. 1964. Kresek and peke yellow leaf systemic symptoms of bacterial leaf blight of rice caused by *Xanthomonas oryzae* (Uyeda et Ishiyama) Dawson. *Pl. Dis. Rep.* 48:858-861.
- Horino, O. and H.R. Hifni. 1978. Resistance of some varieties to bacterial leaf blight group of the causal bacterium, *Xanthomonas oryzae*. *Contr. Centr. Res. Inst. Agric.* 44:1-17.
- Horino, O. and H.R. Hifni. 1981. A survey of geographical distributions of pathogenic groups of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*. *Annu. Phytopathol. Soc. Japan* 47:50-57.
- Kadir, T.S., I. Hanarida, D.W. Utami, S. Koerniati, A.D. Ambarwati, A. Apriana, dan A. Sisharmini. 2009. Evaluasi ketahanan populasi haploid ganda silangan IR64 dan *Oryza rufipogon* terhadap hawar daun bakteri pada stadia bibit. *Bul. Plasma Nutfah* 15(1):13-19.
- Kardin, M.K. dan H.R. Hifni. 1993. Penyakit hawar daun bakteri padi di Indonesia. *Risalah Seminar Puslitbang-tan*, April 1992-Maret 1993. hlm. 85-99.
- Kozaka, T. 1969. Control of rice diseases with resistant varieties. *Agr. Hort.* 44:208-212.
- Reitsma, J. and P.S.J. Schure. 1950. Kresek a bacterial disease of rice. *Contr. Gen. Agric. Res. Sta.* 117:1-17.
- Salanoubat, M., S. Genin, F. Artiguenave, J. Gouzy, S. Mangenot, M. Arlat, A. Billault, P. Brottier, J.C. Camus, L. Cattolico, M. Chandler, N. Choisine, C. Claudel-Renard, S. Cunnac, N. Demange, P. Siguier, P. Thebault, M. Whalen, P. Wincker, M. Levy, J. Weissenbach, and C.A. Boucher. 2002. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature* 415:497-502.
- Shen, Y. and P. Ronald. 2002. Molecular determinants of disease and resistance in interaction of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and rice. *J. Microbe interaction* 4(13):1361-1367.
- Staskawicz, B.J., M.B. Mudgett, J. Dangl, and J.E. Galan. 2001. Common and contrasting themes of plant and animal diseases. *Science* 292:2285-2289.
- Swing, J., M. Van Den Mooter, L. Vayterin, B. Hoste, M. Gillis, T.W. Mew, and K. Kersters. 1990. Reclassifications of the causal agents of bacterial blight (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*) of rice as pathovars of *Xanthomonas oryzae* (ex Ishiyama 1922) sp. nov., nom. Rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40:309-311.
- White, F.F., B. Yang, and L.B. Johnson. 2000. Prospects for understanding avirulence gene function. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3:291-298.
- White, F.F. and B. Yang. 2009. Host and pathogen factors controlling the rice-*Xanthomonas oryzae* interaction. *J. Plant Physiol.* 150:1677-1686.
- Yamamoto, T., H.R. Hifni, M. Machmud, T. Nishizawa, and D.M. Tantera. 1977. Variation in pathogenicity of *Xanthomonas oryzae* (Uyeda et Ishiyama) Dawson and resistance of rice varieties to the pathogen. *Contr. Centr. Res. Inst. Agric.* 28:1-22.
- Yang, B. and F.F. White. 2004. Diverse members of the *AvrBs3/PthA* family of type III effectors are major virulence determinants in Bacterial Blight Disease of rice. *J. Molecular Plant Microbe Interactions* 17(11):1192-1200.
- Yang, B., A. Sugio, and F.F. White. 2005. Avoidance of host recognition by alterations in the repetitive and C-terminal regions of *AvrXa7*, a type III effector of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J. Molecular Plant Microbe Interaction* 18:142-149.
- Yang, B., W. Zhu, L.B. Johnson, and F.F. White. 2000. The virulence factor *AvrXa7* of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* is a type III secretion pathway-dependent, nuclear-localized, double-stranded DNA binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97:9807-9812.
-