

Pencarian Alel untuk Identifikasi Gen Ketahanan Penyakit Hawar Daun Bakteri, *Xa7* pada Plasma Nutfah Padi Lokal Indonesia

Dwinita W. Utami¹, Endang M. Septiningsih², Triny S. Kadir³, Fatimah¹, dan Siti Yuriyah¹

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111

²International Rice Research Institute, DAPO Box 7777, Metro Manila, Philippines

³Balai Besar Penelitian Tanaman Padi, Jl. Raya 9, Sukamandi–Subang 41256

ABSTRACT

Allele Mining of Bacterial Blight Resistance Gene, *Xa7* on Indonesian Local Rice Germplasm. Dwinita W. Utami, Endang M. Septiningsih, Triny S. Kadir, Fatimah, and Siti Yuriyah. The abundance of novel genetic variation existing in germplasm collections is the foundation for variety improvement in plant breeding program. Nevertheless, studies on Indonesian genetic diversity rice germplasm using molecular markers are still poorly. Recent advances in utilizing of simple sequence repeat (SSR) in QTL mapping and whole rice genome sequences were positive support on genetic diversity of rice germplasm research. Based on these advance technology, we developed the research to discover new alleles at important gene loci that can be used for rice improvement. This approach is recognized as *allele mining* technology. On this study the target genes for *allele mining* research is the resistance gene for bacterial leaf blight pathogen, *Xa7*. This point was introduced by identify the genetic diversity of 96 accessions Indonesian local rice germplasm. The *Xa7* *allele mining* was done by SNP (single nucleotide polymorphism) designing primers based on DNA sequence around the gene target. The significant LD map was detected by association mapping between phenotype and SNP genotyping data of the selected germplasm which having superior performance on BLB resistance and representing on genetic diversity clustering. The results shown that *Xa7* allele variation were found in *Parekaligolara* (*Indica*, 15141), and *Gajah Mada* (*Indica*, 5856), which resistant to BLB races IV and VIII on generative stage and field condition. The significant *Xa7*-SNP8 and *Xa7*-SNP11 markers were associating with the LD map position of *Xa7* gene on 28, 05-28,1Mb of chromosome 6 in rice genome.

Key words: *Xa7*, *allele mining*, Indonesian rice local.

PENDAHULUAN

Hakekat dari kegiatan pemuliaan tanaman yang telah terjadi selama ratusan tahun yang lalu, pada dasarnya adalah memilih alel-alel yang menguntungkan pada lokus-lokus yang penting. Hal ini dilakukan secara tidak langsung, yaitu dengan memilih tanaman berpenampilan terbaik berdasarkan fenotipnya. Dasar dari kegiatan pemuliaan tanaman ini adalah me-

limpahnya keragaman genetik yang tersimpan dalam koleksi plasma nutfah di seluruh dunia. Kekayaan keragaman genetik ini merupakan bahan dasar untuk memperbaiki berbagai karakter tanaman, khususnya pada tanaman penting seperti padi. Kesulitan yang dihadapi dalam hal ini adalah bagaimana alel-alel menguntungkan yang cukup langka itu dapat ditemukan secara efisien di antara ribuan koleksi aksesori padi. Masalah ini menjadi lebih terasa ketika seleksi berdasarkan fenotipe saja sering tidak dapat digunakan untuk menemukan alel “terbaik” tersebut. Dengan pendekatan biologi molekuler, yaitu melalui teknologi pemetaan gen/*Quantitative Trait Loci* (QTL) diketahui bahwa alel-alel yang menguntungkan tersebut sering “tersembunyi” dan hanya dapat dideteksi dengan marka molekuler yang dapat secara langsung terpaut dengan alel menguntungkan yang diinginkan (Tanksley dan McCouch 1997).

Perkembangan teknologi genomik, yang meliputi: pemetaan QTL, penemuan gen (*gene discovery*), dan tersedianya sekuen genom secara lengkap telah memungkinkan untuk mencari alel-alel yang berguna dalam koleksi plasma nutfah padi untuk perbaikan varietas melalui suatu strategi yang disebut dengan *allele mining* (pencarian alel). Secara umum, istilah ini mengacu pada tujuan untuk mendapatkan alel-alel yang menguntungkan dalam koleksi plasma nutfah menggunakan teknologi molekuler terkini. Definisi yang lebih spesifik mengacu pada proses untuk mendesain primer-primer untuk *Polymerase Chain Reaction* (PCR) berdasarkan sekuen DNA untuk suatu gen kandidat pada suatu varietas dari koleksi plasma nutfah yang ada dan bahkan juga dari kerabat liarnya. Alel-alel ini disekuen dan kemudian dibandingkan untuk menentukan perbedaan polimorfismenya. Dengan proses ini, berbagai alel dari suatu lokus dapat diisolasi (Latha *et al.* 2004, Rangan *et al.* 1999). Namun apabila gen kandidat belum tersedia, pendekatan lain harus ditempuh. Salah satu alternatifnya adalah menggunakan pendekatan pemetaan LD (*linkage disequilibrium*) untuk mendapatkan daerah genom yang sempit yang mengandung alel yang diinginkan (Morton 2005). Ber-

lainan dengan pemetaan QTL, yang menggunakan populasi yang dikembangkan dari dua tetua saja, pemetaan LD dapat menggunakan secara langsung beberapa sampai ratusan aksesori yang berbeda untuk membuat peta tanpa harus melakukan persilangan (Flint-Garcia *et al.* 2003). Salah satu keunggulan dari teknologi pencarian alel (*allele mining*) ini, yaitu kita dapat memilih daerah genom yang relatif kecil dengan lebih akurat menggunakan marker yang berpaut ketat dengan sifat penting yang diinginkan, sehingga dapat mengurangi atau bahkan meniadakan segregasi yang tidak diinginkan (*negative linkage drag*). Di samping itu, dengan teknologi ini dimungkinkan untuk memilih secara langsung alel yang kita inginkan pada suatu lokus, melalui proses yang disebut dengan pemilihan alel secara langsung (*direct allele selection*) (<http://smallgrains.cit.cornell.edu/about.html>). Analisis gen kandidat dapat dilakukan dengan DNA *sequencing* dan *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) *genotyping*. Marka SNP mempunyai keunggulan dalam mendeteksi ada tidaknya polimorfisme dibandingkan dengan marka yang lain, karena marka ini dapat mendeteksi perbedaan hingga 1 nukleotida saja (Feltus *et al.* 2004). Hal ini sangat penting karena yang menjadi obyek penelitian dalam pencarian alel adalah daerah genom yang sudah sangat kecil, yaitu QTL atau gen. Dengan demikian perbedaan terkecil dalam QTL atau gen yang memberikan kontribusi yang nyata pada fenotipe dapat terdeteksi.

Penyakit hawar daun bakteri (HDB) disebabkan oleh bakteri patogen *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*, merupakan salah satu penyakit utama pada pertanian padi dan menyebabkan kehilangan hasil yang cukup signifikan setiap tahunnya, yaitu mencapai 15-25% (Yamamoto *et al.* 1977) dan bahkan perkembangan terakhir dapat mencapai 30-40% (Triny *et al.* 2007). Beberapa hasil pengujian pada tahun-tahun sebelumnya menunjukkan bahwa gen ketahanan terhadap penyakit HDB *Xa7*, belum "terpatahkan" oleh beberapa strain HDB yang dominan di lokasi endemik penyakit ini di Indonesia. Oleh karena itu gen *Xa7* potensial sebagai kandidat gen pengendali penyakit HDB di Indonesia, sehingga pencarian alel gen *Xa7* ini pada sejumlah koleksi plasma nutfah padi lokal Indonesia perlu dilakukan untuk mendapatkan sumber donor gen ini. Padi lokal adalah salah satu sumber genetik padi yang saat ini sudah terdesak oleh varietas unggul (Crowder 1997). Untuk itu perlu dilakukan eksploitasi plasma nutfah padi lokal yang selama ini masih banyak yang belum terkarakterisasi (Silitonga *et al.* 1995).

Tujuan dari penelitian ini adalah mengidentifikasi alel gen *Xa7* pada beberapa aksesori plasma nutfah padi

lokal Indonesia dengan pendekatan *allele mining* menggunakan marka molekuler SNP yang spesifik untuk *Xa7*.

BAHAN DAN METODE

Material Genetik dan Evaluasi Tingkat Ketahanan Hawar Daun Bakteri

Material genetik yang digunakan adalah 96 nomor aksesori plasma nutfah padi lokal yang memiliki keragaman genetik berdasarkan 30 marka SSR. Beberapa aksesori tersebut termasuk subspecies *Indica* dan *Tropikal Japonica* (Utami *et al.* 2006). Total 96 aksesori plasma nutfah tersebut tercantum pada Tabel 1. Sedangkan Ras/isolat HDB yang digunakan dalam penelitian ini adalah tiga ras HDB yang dominan di beberapa lokasi endemik penyakit ini di lapang, di Indonesia, yaitu RasIII, RasIV, dan RasVIII dan satu isolat yang secara relatif bersifat spesifik (*correspond*) untuk gen *Xa7* yang belum diidentifikasi rasnya (Utami *et al.* 2007).

Evaluasi tingkat ketahanan terhadap penyakit HDB dari 96 nomor aksesori plasma nutfah dilakukan di rumah kaca dan lapang, dengan menggunakan tiga ras dan satu isolat HDB.

Pengujian dan penentuan tingkat ketahanan terhadap penyakit HDB di rumah kaca dilakukan dengan metode inokulasi penggungtingan terhadap 96 nomor aksesori plasma nutfah yang masing-masing ditanam 5-10 tanaman sebagai ulangan. Sedangkan pengujian di lapang juga dilakukan dengan metode inokulasi penggungtingan terhadap 5-10 tanaman di 4 titik diagonal dan 1 titik di tengah di setiap plot pengujian masing-masing nomor aksesori. Skoring tingkat serangan dilakukan berdasarkan skala intensitas serangan dan skala skor, sesuai dengan SES IRRI (1996). Data hasil pengujian fenotipe selanjutnya dianalisis statistik dengan metode Analisis Gerombol (*Principal Component Analysis/PCA*). Analisis ini dilakukan untuk mengelompokkan data berdasarkan kemiripan sifat tingkat ketahanan ke-96 nomor aksesori plasma nutfah yang diuji berdasarkan analisis perbaikan jarak dengan metode pautan rata-rata (*Average Linkage*) (Karson 1982). Tujuan dari analisis PCA ini adalah untuk memperoleh subsampel representatif yang meliputi aksesori-aksesori yang bersifat superior tahan ataupun yang bersifat peka (sebagai kontrol negatif untuk alel *Xa7*). Subsampel aksesori-aksesori plasma nutfah yang terpilih selanjutnya digunakan dalam analisis *Xa7*-LD dan *Xa7*-SNP *genotyping*.

Tabel 1. Sembilan puluh enam aksesi plasma nutfah padi lokal yang digunakan untuk evaluasi tingkat ketahanan penyakit HDB dan identifikasi alel *Xa7*.

No.	Plasma nutfah	No. reg	Subspesies	No.	Plasma nutfah	No. reg	Subspesies
1.	Hawara Bunar	19285	Indica	50.	Pulut Namang	21256	Indica
2.	P. Timai	19974	Indica	51.	Rumbay	20968	Indica
3.	Mashuri	-	Indica	52.	Pae Gudo	6332	Indica
4.	Getik	5643	Indica	53.	Sampang	5737	Indica
5.	Menta	5758	Indica	54.	Mendalet	5742	Indica
6.	Gajah Mada	5856	Indica	55.	Manggar	5744	Indica
7.	Pudak Kuning	6204	Indica	56.	Ganefo	5648	Indica
8.	Djedah	6601	Indica	57.	P. ketan Alay	C82	Indica
9.	Tjere Bandung	6858	Indica	58.	P. Belanda	C98	Indica
10.	Komas a	6877A	Indica	59.	P. A'gan	C116	Indica
11.	Utri Deli	5730	Indica	60.	P. Ba'an	C119	Indica
12.	Markuti	5754	Indica	61.	P. Jata	C159	Indica
13.	Mutu	5758	Indica	62.	Sibau	19780	Trop-Jap
14.	Gemas	7072	Indica	63.	Padi Jawa	19732	Trop-Jap
15.	Kruet Sintang	8146	Indica	64.	Melaya	19736	Trop-Jap
16.	Rias	8244	Indica	65.	Semirit	19839	Trop-Jap
17.	Suling	21290	Indica	66.	Gundil	12348	Trop-Jap
18.	Sirentek	8194	Indica	67.	Pare Lambeun	15153	Trop-Jap
19.	Gondok	12571	Indica	68.	Ciganjur	21177	Trop-Jap
20.	Buban	13152	Indica	69.	Pandan	21242	Trop-Jap
21.	Bulang	13160	Indica	70.	Bumbuy Inih	21244	Trop-Jap
22.	Kartuna	13270	Indica	71.	Pulut Timuru	21248	Trop-Jap
23.	Padi Lungkai	14716	Indica	72.	Dupa	-	Trop-Jap
24.	Ileuy	14785	Indica	73.	P. Hitam	C2	Trop-Jap
25.	Jerai	14964	Indica	74.	P. Pulut Saleng	C6	Trop-Jap
26.	Nippon	14997	Indica	75.	P. Pulut Longbanga	C13	Trop-Jap
27.	Parekaligolara	1514	Indica	76.	P. Ketan Merah	C18	Trop-Jap
28.	Padi Banten	15195	Indica	77.	P. Puti	C20	Trop-Jap
29.	IR54	21165	Indica	78.	P. Timai	C28	Trop-Jap
30.	Batanghari	21174	Indica	79.	P. Imban	C37	Trop-Jap
31.	Indragiri	21175	Indica	80.	P. Atok	C41	Trop-Jap
32.	Lima Bulan Kamang	12399	Indica	81.	Plong Liyo	C47	Trop-Jap
33.	Padi Belanak K	12674	Indica	82.	P. Mayun	C50	Trop-Jap
34.	Puteh Gaca	12992	Indica	83.	P. Pulut Jangan	C60	Trop-Jap
35.	Teratai	13102	Indica	84.	Pubek Bala	C68	Trop-Jap
36.	Pulut Pagae	13163	Indica	85.	P. ketan Sit	C75	Trop-Jap
37.	Inceklabu	13194	Indica	86.	P. Sekrit	C107	Trop-Jap
38.	Kuntu Ameh	13222	Indica	87.	P. Krayan	C109	Trop-Jap
39.	Sirandah Hitam Ekor	13232	Indica	88.	Pbat Kanjat	C122	Trop-Jap
40.	Lantiak	13236	Indica	89.	P. Kelawit	C126	Trop-Jap
41.	Padi Tinggi	13253	Indica	90.	P. Kendanggang	C131	Trop-Jap
42.	Bintang Ladang	13284	Indica	91.	P. Pui	C135	Trop-Jap
43.	Ketupat	14657	Indica	92.	P. Seribu	C142	Trop-Jap
44.	Condong	14732	Indica	93.	P. Kley	C146	Trop-Jap
45.	Arias Halus	14749	Indica	94.	P. Telengusan	C150	Trop-Jap
46.	Sipulut Merah A	14834A	Indica	95.	P. Siam	C166	Trop-Jap
47.	Nuri Bura	14895	Indica	96.	P. Libang	C182	Trop-Jap
48.	Pare Bakatokaka	15138	Indica	97.	TN1	-	Kontrol peka
49.	Pare Mangata	15148	Indica	98.	IRBB7	-	Kontrol <i>Xa7</i>

Disain Primer *Xa7*-LD dan *Xa7*-SNP Berdasarkan Analisis Gen Kandidat dan DNA Sequencing

Target dari penelitian *allele mining* ini adalah alel dari gen ketahanan HDB, *Xa7*. Gen ketahanan ini pada genom padi terdapat di kromosom 6 dengan ukuran ~1.200 kb. Untuk mengidentifikasi gen sebesar ini maka didisain 60 pasang PCR primer, yang ditandai dengan nama primer *Xa7*-LD. Primer-primer ini tersebar pada beberapa *contig* yang menjadi target, seperti terlihat pada Gambar 1. Primer-primer *Xa7*-LD tersebar

dari *contig* AP004744 (pada posisi genom: 27.221.015-27.221.432 bp) sampai dengan *contig* AP004797 (pada posisi genom: 28.409.251-28.409.822 bp). Disain primer dilakukan berdasarkan *overlapping* sekuen sepanjang 800 bp untuk setiap kali sekuen. Hasil sekuen dengan primer *Xa7*-LD selanjutnya dilakukan *multiple alignment* ke *rice genome database* (subspesies *Japonica*: <http://rgp.dna.affrc.go.jp> dan subspesies *Indica*: <http://www.genomics.org.cn>).

Setiap hasil sekuen dari masing-masing produk PCR *Xa7*-LD yang diperoleh, selanjutnya digunakan

***Xa7*-SNP Genotyping pada Akses-Akresi Terseleksi**

Xa7-SNP genotyping dilakukan pada 22 aksesi plasma nutfah yang bersifat superior tahan berdasarkan analisis statistik untuk data hasil uji fenotipe di rumah kaca dan lapang ditambah dua galur kontrol, yaitu TN1 sebagai galur kontrol peka dan IRBB7 sebagai galur isogenik kontrol untuk gen *Xa7*. DNA dari plasma nutfah tersebut diamplifikasi dengan primer *Xa7*-LD, dengan komposisi PCR: 2 µl 10x bufer PCR; 0,6 µl MgCl₂; 0,6 µl dNTP mix (10 mM); 1,2 µl *Xa7*-LD primer (F+R) (5 µM); 0,15 µl *taq Polymerase*; 2 µl DNA template (10 ng/µl). Program PCR yang digunakan sebagai berikut: 94°C, 2 menit untuk denaturasi awal; 94°C, 45 detik untuk denaturasi; 55°C, 45 detik untuk *annealing*; 68°C, 2 menit untuk proses pemanjangan (*extension*) dan total siklus yang digunakan 29 siklus, proses pemanjangan terakhir pada 72°C selama 7 menit. Setelah dilakukan purifikasi dengan enzim exonuclease I dan shirmp alkaline phosphatase (Exo/SAP), produk *Xa7*-LD yang diperoleh selanjutnya diamplifikasi dengan primer *Xa7*-SNP menggunakan *Beckman SNP primer extension kit*, untuk menandai posisi targer SNP di sekitar gen *Xa7*. Program PCR untuk *Xa7*-SNP adalah sebagai berikut: 96°C, 3 menit untuk denaturasi awal; 94°C, 20°C proses denaturasi; 50°C, 11 detik untuk *annealing*; total siklus sebanyak 25 siklus dan proses pemanjangan akhir dilakukan pada 72°C selama 30 detik. Hasil dari proses SNP *genotyping* selanjutnya di-*running* di mesin *genetic analyzer* CEQ8000 setelah dilakukan purifikasi SAP.

Uji Gabungan (*Association Test*)

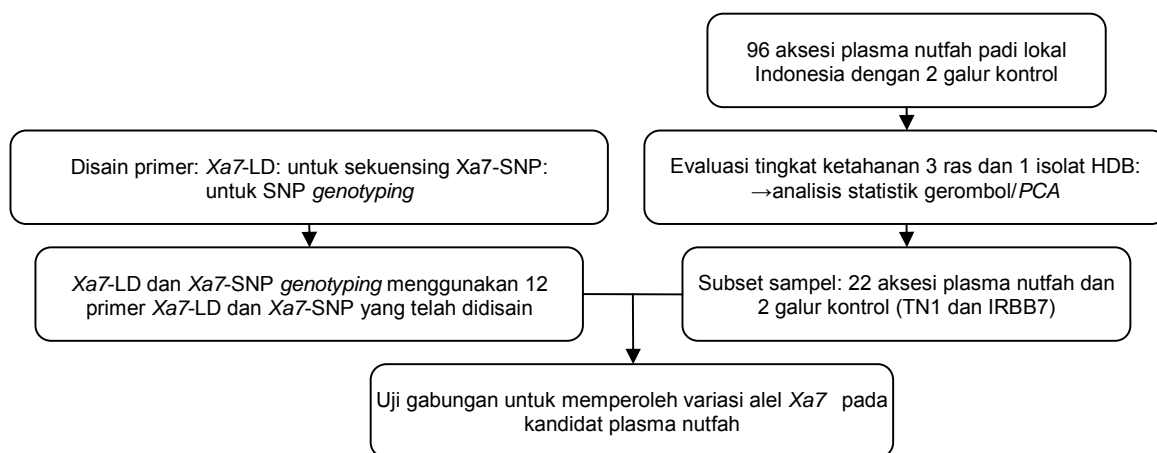
Signifikansi korelasi antara keberadaan polimorfisme SNP dengan data fenotipe yang diperoleh di rumah kaca dan lapang untuk sifat ketahanan terhadap

penyakit HDB dianalisis dengan Uji Gabungan (*Association Test*) menggunakan *software Tassel2_9_4i*. Dari uji gabungan akan terdeteksi variasi alel gen *Xa7* yang secara signifikan berkontribusi dalam membentuk keragaman sifat ketahanan terhadap ras dan isolat HDB uji. Secara garis besar tahapan analisis yang dilakukan dalam penelitian ini seperti pada diagram alur pada Gambar 2.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengujian Fenotipe Tingkat Ketahanan terhadap Empat Isolat/Ras HDB

Data hasil pengujian fenotipe tingkat ketahanan terhadap tiga ras dominan (Ras III, IV, dan VIII) dan satu isolat yang relatif *correspond* untuk gen *Xa7* menunjukkan adanya keragaman dalam respon tingkat ketahanannya. Keragaman ini terlihat dari hasil analisis gerombol yang dilakukan berdasarkan dengan pemotongan dendrogram kesamaan pada tingkat 76,5%. Karakteristik setiap gerombol diperoleh berdasarkan nilai rata-rata masing-masing peubah yang diamati, yaitu tingkat ketahanan terhadap ras/isolat uji. Berdasarkan hasil analisis ini menunjukkan bahwa pada pengujian di rumah kaca pada fase bibit dan dewasa secara berurutan mengelompok menjadi 7 dan 6 gerombol. Sedangkan berdasarkan hasil pengujian di lapang, 96 aksesi plasma nutfah yang diuji berdasarkan tingkat ketahanannya terhadap penyakit HDB, mengelompok menjadi 9 gerombol (data tidak ditampilkan). Berdasarkan hasil analisis gerombol, selanjutnya dipilih aksesi plasma nutfah yang termasuk dalam gerombol terbaik (bersifat superior tahan) baik pada fase bibit, dewasa ataupun di lapang. Akses yang terpilih adalah Parekaligolara, Gajah Mada, Inceklabu, dan Pare Lambeun. Di samping aksesi-aksesi tersebut



Gambar 2. Diagram alur tahapan penelitian pencarian alel gen ketahanan terhadap penyakit HDB, *Xa7*.

beberapa aksesori dengan penampilan terbaik di setiap gerombol yang lain juga dipilih sehingga total aksesori plasma nutfah terpilih sebanyak 22 aksesori ditambah dua galur kontrol, yaitu TN1 sebagai galur kontrol peka terhadap penyakit HDB dan IRBB7 sebagai galur isogenik untuk gen *Xa7*. Secara keseluruhan ke-24 nomor aksesori beserta respon tingkat ketahanannya ditampilkan pada Tabel 3. Hasil pada Tabel 3 menunjukkan bahwa respon tingkat ketahanan terhadap 4 ras/ isolat HDB pada 22 nomor aksesori plasma nutfah padi lokal beserta 2 galur kontrol (TN1 dan IRBB7) menunjukkan adanya respon ketahanan yang bervariasi dari respon sangat tahan (ST) sampai dengan sangat peka (SP). Keragaman respon ketahanan pada sampel material genetik yang digunakan ini penting untuk dipertahankan dalam penentuan subsampel karena untuk menjamin tersedianya semua kemungkinan variasi alel sehingga analisis LD untuk gen target *Xa7* lebih terandal. Di samping itu, Tabel 3 juga menunjukkan bahwa galur kontrol peka TN1 bersifat peka (P) dengan demikian menunjukkan bahwa pengujian di atas telah optimum. Sedangkan tanaman kontrol galur isogenik *Xa7*, IRBB7 menunjukkan respon agak tahan (AT). Respon AT untuk semua isolat ras dan isolat HDB yang digunakan pada galur IRBB7 menunjukkan aktivasi gen *Xa7* yang tidak optimum oleh isolat 93-229. Hal ini karena belum diketahuinya faktor virulensi yang terdapat pada ras-ras dan isolat uji yang digunakan, termasuk

isolat 93-229, sehingga aktivasi spesifik gen *Xa7* belum diperoleh.

Namun demikian ketahanan beberapa aksesori plasma nutfah terpilih menunjukkan respon tahan terhadap ras-ras HDB dominan baik dalam pengujian di rumah kaca ataupun di lapang. Beberapa aksesori ini berpotensi memiliki alel ketahanan terhadap penyakit HDB. Data fenotipe di atas selanjutnya digunakan untuk analisis *Xa7*-SNP *genotyping*.

Xa7-SNP *Genotyping*

Analisis *Xa7*-SNP *genotyping* dilakukan menggunakan 12 primer SNP yang telah didisain di sekitar gen *Xa7* (Tabel 2) pada 22 sampel nomor aksesori plasma nutfah padi lokal dan 2 galur kontrol. Salah satu hasil analisis *genotyping* dengan primer *Xa7*-SNP6 yang di-*running* di mesin *genetic analyzer* CEQ8000, seperti pada Gambar 3.

Salah satu hasil *Xa7*-SNP *genotyping* pada Gambar 3 menunjukkan bahwa salah satu aksesori plasma nutfah padi yang dianalisis menggunakan primer *Xa7*-SNP6, yaitu Parekaligolara pada basa nuklotidanya ke-47 memiliki basa T (Timin). Basa T pada lokus *Xa7*-SNP6 ini menunjukkan bahwa Parekaligolara mempunyai tipe *Xa7*-SNP6 yang termasuk dalam kelompok padi subspecies Indica. Hal ini terlihat pada Tabel 2 bahwa *Xa7*-SNP6 memiliki motif SNP T/C. Hal ini me-

Tabel 3. Respon tingkat ketahanan 24 aksesori plasma nutfah padi lokal terhadap 3 ras HDB dominan di lapang, yaitu RasIII, RasIV, dan Ras VIII dan 1 isolat spesifik untuk gen *Xa7*, isolat 93-229.

Sampel	Subspesies	93-229*	Stadia Bibit			Stadia Dewasa			Lapang		
			III	IV	VIII	III	IV	VIII	III	IV	VIII
Gondok	Indica	AP	AP	AP	T	T	T	T	AT	AT	AT
Pulut Namang	Indica	P	T	T	T	AP	AP	T	AT	AT	AT
Manggar	Indica	P	ST	MS	AT	AT	AT	T	MS	MS	MS
Parekaligolara	Indica	AP	T	T	T	AT	AT	T	AT	AT	AT
P. Pui	Trop Jap	P	AT	AT	ST	AP	AT	AT	AT	AP	P
P. Kley	Trop Jap	AP	AT	T	ST	AT	AT	AT	AT	MS	P
P. Belanda	Indica	P	T	T	T	AT	AT	AT	AT	P	P
P. Puti	Trop Jap	AP	T	T	T	MS	MS	MS	AT	P	P
Sampang	Indica	AP	T	T	ST	AT	AT	AT	AT	P	P
P. Kendanggang	Trop Jap	AP	ST	AP	ST	AT	AT	AT	AT	P	P
Pae Gudo	Indica	P	T	AT	ST	T	AT	AT	AT	AT	AT
P. Siam	Trop Jap	AP	ST	AT	AP	AP	AP	AP	AT	AT	AP
Menta	Indica	AP	AT	ST	AP	AT	T	AP	AT	AP	AP
Kuntu Ameh	Indica	AP	T	T	T	T	AT	AT	AT	AT	AP
Pulut Long Banga	Trop Jap	AP	ST	AT	ST	AT	AT	AT	AT	P	P
Gajah Mada	Indica	AP	AT	T	AT	AT	T	AT	AT	AT	AT
Melaya	Trop Jap	AT	AP	AP	-	T	AT	AT	AT	AP	AP
Semirit	Trop Jap	AT	AT	AT	P	P	-	-	AT	P	AP
Mahsuri	Indica	AT	AT	AT	AP	AT	AT	AT	AP	P	AP
Tjere Bandung	Indica	AT	AT	MS	-	AT	-	-	AT	P	P
Pandan	Trop Jap	AT	T	T	AP	AT	-	-	AT	P	P
TN1	Japonica	AT	AT	T	T	AP	AT	AP	T	AT	AT
IRBB7	Indica	AT	AT	AT	AT	AT	AT	AT	AT	AT	AT

* berdasarkan pengujian di rumah kaca. ST = sangat tahan (0%), T = tahan (1-5%), AT = agak tahan (6-25%), AP = agak peka (26-50%), P = peka (51-75%), SR = sangat rentan (76-100%).

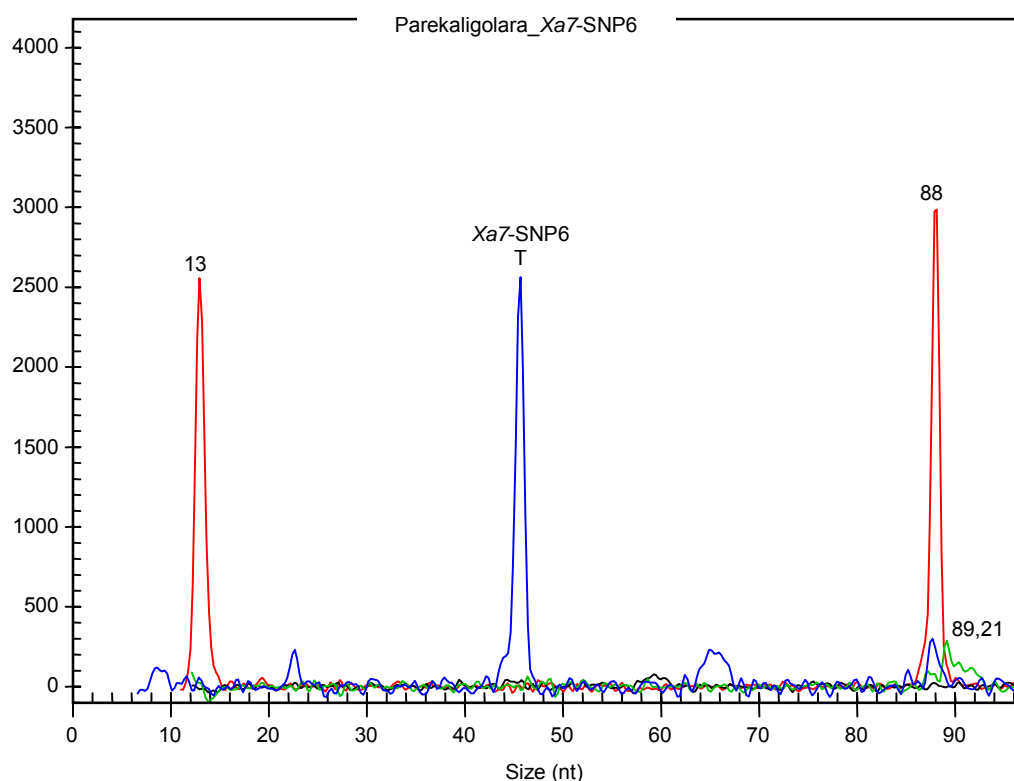
nunjukkan adanya polimorfisme basa nukleotida T (Timin) pada subspecies Indica dan C (Cytisin) pada subspecies Tropical Japonica. IRBB7 sebagai tanaman kontrol isogenik gen *Xa7*, merupakan galur isogenik dari persilangan kultivar DV85 (Indica, asal Bangladesh) sebagai donor gen *Xa7* dengan kultivar IR24 (Indica, asal IRRI, sebagai tetua pemulih) (Sidhu *et al.* 1978, Ogawa *et al.* 1991), memiliki tipe *Xa7*-SNP kelompok subspecies Indica.

Berdasarkan data SNP *genotyping* dengan 12 primer *Xa7*-SNP selanjutnya dilakukan analisis LD *mapping* gen target *Xa7* dan diperoleh hasil seperti tergambar dalam Gambar 4. Hasil tersebut menunjukkan adanya 3 region LD dengan tingkat signifikansi polimorfis paling tinggi. Ketiga region LD gen *Xa7* adalah LD1: SNP2 sampai SNP12 (meliputi LD16-LD9 dengan posisi *contig* = 27.370.133-27.541.931); LDII: SNP4 sampai SNP10 (meliputi LD13-LD44 dengan posisi *contig* = 27.451.531-28.100.952); dan LDIII: SNP5 sampai SNP6 (meliputi LD34-LD14 dengan posisi *contig* = 27.475.112-27.914.495). Posisi LDI, LDII, dan LDIII yang bersifat signifikan digambarkan pada Gambar 4.

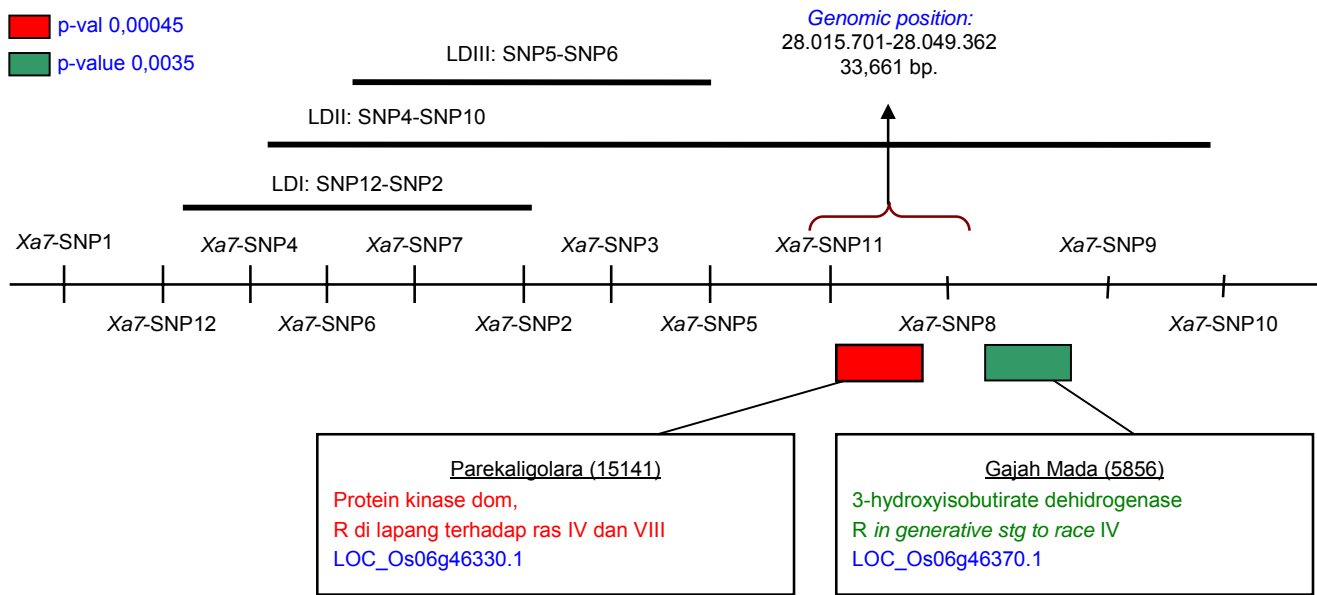
Untuk menentukan region mana yang mempunyai keterpautan dengan gen target maka dilakukan

uji gabungan (*association testing*) antara data *genotyping Xa7*-SNP dengan data fenotipe. Uji lanjutan ini diperlukan untuk menentukan alel dari region LD mana dari lokus gen *Xa7* yang berkontribusi secara nyata dalam membentuk sifat ketahanan terhadap penyakit HDB. Analisis dilakukan dengan Ujoint dan GLM test menggunakan program Tassel2_9_4i.

Hasil analisis di atas juga merupakan hasil plot LD *map* dari 12 marka *Xa7*-SNP yang menandai lokus alel yang berbeda untuk gen *Xa7*. Hasil pada Gambar 4 menunjukkan bahwa dari 12 primer *Xa7*-SNP yang didisain berdasarkan sekuen region gen *Xa7*, terdapat 2 region yang signifikan terhadap data fenotipe tingkat ketahanan terhadap penyakit HDB. Region pertama yang signifikan tersebut terdapat pada region antara marka *Xa7*-SNP11 sampai dengan *Xa7*-SNP8 (pada *contig* AP004989) dengan tingkat signifikansi P-val: 0,00045. Region ini terdiskripsi sebagai gen *protein kinase domain* dan ditandai dengan fenotipe tanaman yang bersifat tahan pada pengujian lapang terhadap ras IV dan VIII. Plasma nutfah dengan penampilan seperti ini diperoleh pada plasma nutfah Parekaligolara (No. aksesori 15141). Region yang lain ditandai antara marka *Xa7*-SNP8 sampai dengan *Xa7*-SNP9 (*contig*



Gambar 3. Genotipe salah satu sampel Parekaligolara dengan primer *Xa7*-SNP6. Pada lokus *Xa7*-SNP6, pada posisi basa ke-47 mempunyai basa nukleotida T (Timin) (warna biru). Puncak warna merah adalah DNA standard yang berukuran 13 dan 88 basa nukleotida.



Gambar 4. Analisis gabungan (association test) antara *Xa7*-SNP genotyping dengan data phenotyping tingkat ketahanan terhadap penyakit HDB, menggunakan ras III, IV, dan VIII, hasil pengujian di rumah kaca dan lapang.

AP003728) dengan tingkat signifikansi yang lebih rendah, yaitu P-val: 0,0035. Region ini terdiskripsi sebagai gen *3-hydroxyisobutirate dehydrogenase* dan ditandai dengan fenotipe tanaman yang bersifat tahan pada fase dewasa terhadap ras IV. Plasma nutfah dengan penampilan seperti ini terdapat pada plasma nutfah Gajah Mada (No. aksesori 5856). Kedua aksesori, Parekaligolara dan Gajah Mada termasuk kelompok subspecies Indica. Kedua plasma nutfah ini memiliki genotipe *Xa7*-SNP yang sama dengan galur isogenik IRBB7 sebagai kontrol alel gen *Xa7* yang juga memiliki tipe alel Indica. Namun demikian kedua aksesori plasma nutfah di atas memiliki variasi alel yang berbeda untuk gen *Xa7*. Variasi alel *Xa7* yang terdapat pada plasma nutfah Parekaligolara berkaitan dengan *protein kinase domain*, sedangkan variasi alel yang terdapat pada plasma nutfah Gajah Mada berkaitan dengan protein *3-hydroxyisobutirate dehydrogenase*. Meskipun masih perlu dikonfirmasi lebih lanjut, namun terdapat indikasi bahwa kedua aksesori plasma nutfah padi lokal di atas dapat dimanfaatkan sebagai sumber alel gen *Xa7* yang selama ini belum diketahui.

Salah satu posisi LD map yang signifikan, yaitu LD map pada posisi genomik: 28.015.701-28.049, yaitu yang terdapat pada *contig* AP004989 berdekatan dengan hasil pemetaan fisik melalui BAC klon gen *Xa7* pada tanaman Nipponbare yang dilakukan oleh Chen *et al.* (2002) dan Porter *et al.* (2003), yang menyebutkan bahwa gen *Xa7* terletak sepanjang *contig* AP005192 sampai dengan *contig* AP004989, yaitu posisi genomik: 27.735.172-28.015.701. Sedangkan hasil pe-

nelitian terbaru pemetaan gen *Xa7* oleh Chen *et al.* (2008) diketahui bahwa gen *Xa7* terdapat pada *contig* AP006056 dengan posisi genomik: 27.953543-27976.665. Di samping itu, pada posisi genomik ini juga diketahui terdapat 3 marka mikrosatelit yang ber-*co-segregation* dengan gen *Xa7*, yaitu RM20589, RM20590, dan RM20591 (Chen *et al.* 2008). Untuk pengembangan penelitian lanjutan, ketiga marka mikrosatelit tersebut dapat diaplikasikan ke aksesori Parekaligolara dan Gajah Mada untuk mendesain *Xa7*-SNP baru yang ber-*co segregation* langsung dengan gen *Xa7*. Berdasarkan hasil yang diperoleh maka marka *Xa7*-SNP8 dan *Xa7*-SNP11 adalah marka yang terdekat dengan gen *Xa7* dari 12 marka *Xa7*-SNP yang didesain yang dapat digunakan untuk membantu proses seleksi plasma nutfah ataupun hasil pemuliaan sebagai marka MAS (*Marker Assisted Selection*).

KESIMPULAN DAN SARAN

Telah diperoleh dua kandidat variasi alel gen *Xa7*, yaitu (1) variasi alel yang berkaitan dengan protein *kinase domain*, yaitu terdapat pada plasma nutfah Parekaligolara (Indica, 15141), dengan fenotipe tanaman yang bersifat tahan pada pengujian lapang terhadap ras IV dan VIII dan 2. Variasi alel yang berkaitan dengan protein *3-hydroxyisobutirate dehydrogenase*, yaitu terdapat pada plasma nutfah Gajah Mada (Indica, 5856), dengan fenotipe tanaman yang bersifat tahan pada fase dewasa terhadap ras IV.

Kedua variasi alel untuk gen *Xa7* terpetakan pada posisi LD *map* 28,05-28,1 Mb dari kromosom 6, yang ditandai dengan marka yang terpaut *Xa7*-SNP8 dan *Xa7*-SNP11. Kedua marka tersebut dapat digunakan untuk membantu proses seleksi plasma nutfah ataupun hasil pemuliaan sebagai marka MAS.

Sebagai penelitian lanjutan, dalam rangka mengkonfirmasi dua kandidat variasi alel gen *Xa7* yang diperoleh maka diperlukan identifikasi gen *avr* pada ras atau isolat HDB yang digunakan dalam pengujian yang secara spesifik *correspond* dengan gen *Xa7*.

DAFTAR PUSTAKA

- Chen, M., G. Presting, W.B. Barbazuk, J.L. Goicoechea, B. Blackmon, G. Fang, H. Kim, D. Frisch, Y. Yu, S. Sun, S. Hgingbottom, J. Phimphilai, Dphimphilai, S. Thurmond, B. Gaudette, P. Li, J. Liu, J. Hatfield, D. Main, K. Farar, C. Henderson, L. Barnett, R. Costa, B. Williams, S. Walsler, M. Atkins, C. Hall, M.A. Budiman, J.P. Tomkins, M. Luo, I. Bancroft, J. Salse, F. Regad, T. Mohapatra, N.K. Singh, A.K. Tyagi, C. Soderlund, R.A. Dean, and R.A. wing. 2002. An integrated physical and genetic map of the rice genome. *Plant Cell* 14:537-545.
- Chen, S., Z. Huang, L. Zeng, J. Yang, Q. Liu, and X. Zhu. 2008. High resolution mapping and gene prediction of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* resistance gene *Xa7*. *Mol. Breed.* 11032-009-9187-1.
- Crowder, L.V. 1997. *Genetika Tumbuhan*. Gadjah Mada University Press.
- Feltus, A.F., J. Wan, S.R. Schulze, J.C. Estill, N. Jiang, and A.H. Paterson. 2004. An SNP resource for rice genetics and breeding based on subspecies Indica and Japonica. *J. Genome Res.* 14:1812-1819.
- Flint-Garcia, S.A., J.M. Thornsberry, and E.S. BucklerIV. 2003. Structure of linkage disequilibrium in plants. *J. Annu. Rev. Plant. Biol.* 54:357-374.
- IRRI. 1996. *Standard Evaluation System for Rice*. International Rice Research Institute. Manila, Philippines.
- Karson, M.J. 1982. *Multivariate Statistical Methods*. The Iowa Stape University Press.
- Latha, R., L. Rubia, J. Bennett, and M.S. Swaminathan. 2004. *Allele mining* for stress tolerance genes in *Oryza* species and related germplasm. *Mol. Biotechnol.* 27:101-108.
- Morton, N.E. 2005. Linkage disequilibrium and association pemetaan. *J. Clin. Invest.* 115:1425-1430.
- Ogawa, T., T. Yamamoto, G.S. Khush, and T.W. Mew. 1991. Breeding of near-isogenic lines of rice with single genes for resistance to bacterial blight pathogen (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*). *Japan J. Breed.* 41:523-529.
- Porter, B.W., J.M. Chittoor, M. Yano, T. Sasaki, and F.F. White. 2003. Development and mapping of markers linked to the Rice Bacterial Blight resistance gene *Xa7*. *Crop Sci.* 43(4):1484-1492.
- Rangan, L., S. Constantino, G.S. Khush, and M.S. Swaminathan. 1999. The feasibility of PCR-based *allele mining* for stress tolerance genes in rice. *Rice Genet. Newsletter* 16:43-47.
- Shidu, G.S., G.S. Khush, and T.W. Mew. 1978. Genetic analysis of bacterial blight resistance in seventy-four cultivars of rice, *Oryza sativa* L. *Theor. Appl. Genet.* 53:105-111.
- Tanskey, S.D. and S.R. McCouch. 1997. Seed banks and molecular maps; unlocking genetics potential from the wild. *Science* 277:1063-1066.
- Triny, S.K., I. Hanarida, D.W. Utami, S. Koerniati, A.D. Ambarwati, A. Apriana, dan S. Sisharmini. 2007. Evaluasi ketahanan populasi haploid ganda silangan IR64 dan *Oryza rufipogon* terhadap hawar daun bakteri pada stadia bibit. *Buletin Plasma Nutfah*.
- Silitonga, T.S., H.R. Hifni, M. Amir, K. Kardin, dan A. Nasution. 1995. Evaluasi keragaman genetik plasma nutfah padi. *Dalam Kinerja Penelitian Tanaman Pangan*. Puslitbangtan. Bogor. hlm. 20-23.
- Utami, D.W., E.M. Septiningsih, A. Nasution, Santosa, Fatimah, dan S. Yuriyah. 2006. Pencarian alel-alel baru untuk gen-gen penting toleran cekaman biotik dan abiotik pada padi. Struktur populasi keragaman genetik plasma nutfah padi dan evaluasi ketahanan terhadap penyakit blas (*Pyricularia grisea*) untuk pencarian alel-alel baru. Laporan Hasil Penelitian APBN. BB-Biogen, Badan Litbang Pertanian Departemen pertanian.
- Utami, D.W., E.M. Septiningsih, I. Hanarida, S. Yuriyah, dan I. Ridwan. 2007. Pencarian alel-alel baru untuk gen-gen penting toleran cekaman biotik dan abiotik pada padi. Pencarian alel gen ketahanan terhadap penyakit hawar daun bakteri, *Xa7* menggunakan marka molekuler SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) dan *Xa26* berdasarkan analisis sekuensing dan evaluasi tingkat toleransi plasma nutfah padi terhadap keracunan Fe di lapang dan disain primer Fe-SNP. Laporan Hasil Penelitian APBN. BB-Biogen, Badan Litbang Departemen pertanian.
- Yamamoto, T., H.R. Hifni, M. Machmud, T. Nishizawa, adn D.M. Tantera. 1977. Variation in phatogenicity of *Xanthomonas oryzae* and resistance varieties to the pathogen. *Contribution* 28. *Centr. Res. Inst. Agric. Bogor.* 22 p.