

Analisis Genotip Pohon Induk Jeruk Bebas Penyakit Hasil Perbanyak Tunas Pucuk dengan Primer RAPD

Supriyanto, A., D. Agisimanto, T. Purbiati, N.F. Devy, dan M.E. Dwiastuti

Loka Penelitian Tanaman Jeruk dan Hortikultura Subtropik. Jl. Raya Tlekung No 1, Batu Malang 65305

Naskah diterima tanggal 25 Juni 2005 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 8 September 2005

ABSTRAK. Uji tepat varietas untuk pohon induk jeruk bebas penyakit diperlukan untuk memastikan kebenaran genotip tanaman yang diperbanyak secara vegetatif. Percobaan dilakukan untuk menganalisis kesamaan genotip pohon induk jeruk bebas penyakit (benih penjenis) hasil perbanyak vegetatif melalui penyambungan tunas pucuk dari pohon induk tunggalnya menggunakan penanda DNA RAPD. Daun dari tunas muda berumur 20-25 hari diekstrak untuk mendapatkan *bulk* DNA. Setiap sampel DNA dari setiap varietas diampifikasi menggunakan 2 primer RAPD dan diseparaasi menurut metode elektroforesis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 2 primer RAPD OPN14 dan OPN16 mampu memperlihatkan keseragaman pita DNA benih-benih penjenis dengan induknya. Hasil penelitian ini menegaskan bahwa tidak ada perbedaan genotip antara tanaman yang diperoleh dari protokol pembuatan benih penjenis dengan pohon induk tunggalnya.

Kata kunci: *Citrus sinensis*; *Citrus grandis*; Primer RAPD; Benih penjenis jeruk; Penyambungan tunas pucuk

ABSTRACT. Supriyanto, A., D. Agisimanto, T. Purbiati, N.F. Devy, and M.E. Dwiastuti. 2006. **Genotype analysis of vegetatively propagated of citrus using RAPD primers.** True variety testing is needed to proof the genotype truthfulness of virus free mother plant that vegetatively multiplied. Study was done to analyze the genotype similarity of virus free mother plant that vegetatively multiplied through shoot tip grafting from the single mother plant using DNA RAPD marker. Leaves from young flush of 20-25 days were extracted in order to find out the bulk DNA. Each DNA sample from each variety was amplified by 2 RAPD primer and separated electrophoretically. The results indicated that 2 RAPD OPN14 and OPN16 primer revealed the uniformity of DNA band of the breeder seeds and the mother plant. The results strongly confirm that there was no genotype differences among the plant generated from standard protocol of producing virus free of citrus breeder seeds and the single mother plant.

Keywords: *Citrus sinensis*; *Citrus grandis*; RAPDs primer; Virus-free mother tree; Shoot tip grafting.

Pembangunan agribisnis jeruk di Indonesia menuntut dukungan industri benih yang tangguh,

profesional, dan adaptif terhadap penyempurnaan dan kemajuan iptek yang terus berkembang pesat. Keberhasilan pengembangan budidaya jeruk di Indonesia akan ditentukan oleh ketersediaan bibit yang bermutu pada saat tanam dan dengan harga yang terjangkau oleh petani. Bibit jeruk bermutu diartikan sebagai (1) bebas dari patogen sistemik seperti CVPD, dan (2) varietas batang atas dan bawah terjamin kemurniannya.

Tanaman hasil perbanyak menggunakan bagian vegetatif diyakini mempunyai sifat yang sama dengan tetuanya. Namun demikian proses produksi benih yang bertahap dan berulang-ulang mendorong perlunya pembuktian kesamaan genotip benih yang dihasilkan pada akhir proses dengan tetuanya. Metode pembersihan patogen sistemik pohon induk tunggal jeruk dapat dilakukan melalui perbanyak tunas pucuk (Triatminingsih *et al.* 1992). Teknik tersebut telah menghasilkan benih penjenis dari puluhan varietas atau spesies jeruk komersial yang distribusinya mengikuti alur

yang telah dibakukan secara nasional (Supriyanto dan Whittle 1992).

Sidik jari (*fingerprinting*) DNA untuk identifikasi kultivar atau varietas telah menjadi alat yang penting untuk identifikasi genetik dalam pemuliaan tanaman dan pengelolaan plasma nutfah. Berbagai sistem dan teknik telah tersedia dan penanda DNA berbasis PCR paling sering digunakan. Umumnya teknik berbasis PCR ini lebih cepat dan hanya memerlukan sedikit DNA, sehingga teknik tersebut sangat bermanfaat untuk menyeleksi plantlet-plantlet dari perbanyak in vitro.

Analisis isozim mampu membedakan kultivar yang dihasilkan dari reproduksi seksual, namun tidak mampu membedakan kultivar yang berubah akibat mutasi (Roose 1988; Herrero *et al.* 1996). RFLP dikenal mempunyai polimorfisme sangat tinggi pada jeruk (Roose 1988), namun karena kejadian mutasi yang menyebabkan munculnya fenotipe baru pada sebuah kultivar hanya sedikit

berpengaruh terhadap genom dan perubahan mungkin hanya terjadi pada 1 nukleotida, maka analisis RFLP yang menggunakan probe DNA yang secara random diseleksi dari genom, nampaknya tidak mungkin mendeteksi secara efisien.

Teknik lain yang lebih efisien adalah RAPD (Santos *et al.* 1994; Rajapakse *et al.* 1995). Sejak RAPD diperkenalkan pada tahun 1990 (William *et al.* 1990), penggunaan RAPD dalam analisis genetik tanaman telah meningkat disebabkan karena kemudahan prosedurnya, kebutuhan DNA amat sedikit dan tidak memerlukan informasi awal sekuen. Analisis RAPD telah digunakan untuk karakterisasi genotip (Lu *et al.* 1996), pemetaan genetik (Chaparro *et al.* 1994) dan untuk mengidentifikasi penanda DNA yang terpaut dengan gen tertentu (Nair *et al.* 1996). RAPD juga digunakan untuk mengidentifikasi genetik beberapa spesies lain seperti Malus (Harada *et al.* 1993), Peach (Pooler dan Scorza 1995). Polimorfisme diamati dan diskor sebagai fragmen yang muncul dan tidak muncul sebagai akibat keragaman sekuen karena penyisipan, pemutusan, dan penggantian nukleotida.

Penelitian ini bertujuan untuk menguji kesamaan genetik pohon induk jeruk hasil penambungan tunas pucuk dengan pohon induk tunggalnya melalui aplikasi primer RAPD.

BAHAN DAN METODE

Material tanaman dan ekstraksi DNA

Pohon induk jeruk manis (*Citrus sinensis* cv Pacitan = PIT1), pomelo (*Citrus grandis* cv Nambangan = PIT2, dan *Citrus grandis* cv Sri Nyonya = PIT4), beserta benih-benih penjenis hasil penambungan tunas pucuk, berturut-turut STG1a, STG1d, STG1e, STG2c, STG2e, STG2g, STG2h, STG4a, STG4b, dan STG4c telah disiapkan untuk digunakan sebagai bahan analisis genotip untuk membandingkan genotipnya. Pohon induk tunggal dan pohon induk bebas penyakit hasil perbanyakan tunas pucuk yang ditanam di pot besar dipelihara secara optimal. Perlakuan cekaman air selama 3 minggu dilakukan pada tanaman uji pada periode akhir musim kemarau 2002, untuk memperoleh tunas muda. DNA diekstraksi dari daun muda yang berumur

2-3 tiga minggu.

Ekstraksi, amplifikasi, dan deteksi

Ekstraksi DNA jeruk dilakukan menurut metode *minipreparation* berdasarkan metode Deng *et al.* (1996) yang dimodifikasi. Daun jeruk digerus menggunakan nitrogen cair. Tepung daun dimasukkan ke dalam tabung eppendorf 2 ml hingga mencapai batas volume 200 μ l. Setiap volume sampel sebanyak 200 μ l tersebut diekstrak dengan 800 μ l buffer ekstrak (3% CTAB, 1,4M NaCl 20 mM EDTA, dan 100 mM Tris-HCl pH 8,0 dan suhu 60°C) dan 100 μ l 10% sarkosil. Inkubasi dilakukan dalam *waterbath* suhu 65°C selama 30 menit. Pemisahan dilakukan dengan penambahan kloroform dan isoamil alkohol (chisam) perbandingan 24:1 sebanyak 700 μ l. Sentrifugasi dilakukan dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit. Presipitasi dilakukan dengan menambahkan etanol absolut ke dalam tabung berisi supernatan. Pelet DNA dikeringkan dan dilarutkan kembali di dalam buffer TE (100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8,0). Uji kualitas dan kuantitas DNA dilakukan pada gel elektroforesis agarose 0,8% berdasarkan metode Sambrook *et al.* (1989).

Amplifikasi sampel DNA jeruk dilakukan dengan profil mesin 1 siklus denaturasi suhu 95°C selama 5 menit, diikuti dengan 44 siklus denaturasi suhu 95°C selama 1 menit, *annealing* suhu 45°C selama 1 menit dan ekstensi suhu 72°C selama 2 menit. Siklus PCR diakhiri dengan 1 siklus ekstensi akhir suhu 72°C selama 7 menit. Setiap sampel dicampurkan dengan 20 μ l pereaksi PCR yang mengandung 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl; 0,2 mM dNTPs; 2,5 mM MgCl₂; 0,3 μ M Primer; dan 1 unit Taq DNA polimerase (Promega). Sebanyak 15 primer RAPD (operon teknologi) yaitu OPB14, OPE14, OPW5, OPW12, OPB5, OPA17, OPE17, OPE18, OPN14, OPB17, OPN16, OPA16, OPB10, OPN18, dan OPN8. Pemisahan fragmen RAPD hasil amplifikasi dilakukan dengan metode elektroforesis pada gel agarose 1,4% di dalam larutan 0,5X TBE selama 4 jam pada kekuatan arus 80 volt. Deteksi pita DNA dilakukan dengan merendam gel agarose di dalam larutan Ethidium bromida (10 mg/l) selama 5 menit dan difiksasi dalam film polaroid dengan kamera UV. Skoring pita DNA

dilakukan berdasarkan ada dan tidaknya pita DNA pada setiap varietas.

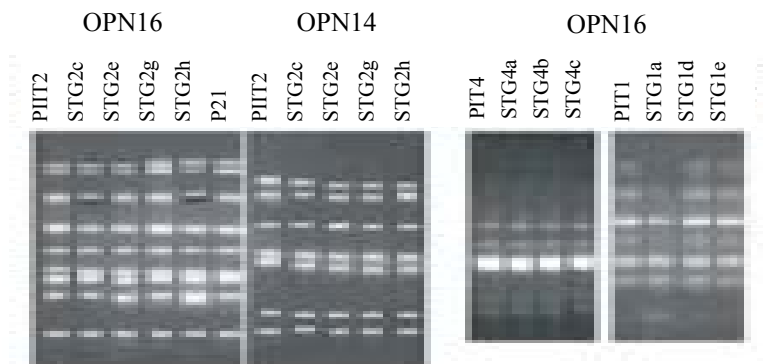
HASIL DAN PEMBAHASAN

Kebenaran genotip varietas pohon induk jeruk bebas penyakit yang diproduksi menurut protokol standar penyambungan tunas pucuk dari pohon induk tunggalnya telah dilakukan menggunakan teknik RAPD. Sebanyak 15 primer RAPD telah digunakan untuk mengamplifikasi DNA sampel yang berasal dari daun muda tanaman jeruk masing-masing varietas. Dari 15 primer tersebut 2 primer dipilih untuk menggambarkan perbandingan genotip jeruk. Primer tersebut dipilih berdasarkan jumlah pita DNA yang teramplifikasi dan kemudahan membandingkan antarpita DNA. Alur konfirmasi genotip tersebut adalah sebagai berikut. Pohon induk tunggal yang ada di sentra produksi jeruk dikoleksi mata tunasnya dan diokulasikan pada batang-bawah jeruk di Loka Penelitian Jeruk dan Hortikultura Subtropik. Tunas pucuk yang berasal dari bibit pohon induk tunggal tersebut disambung- pukkan menurut metode penyambungan tunas pucuk dan diindeksing. Bibit yang telah diketahui sehat dijadikan sebagai pohon induk untuk sumber mata tunas bibit bebas penyakit. Sumber DNA dikoleksi dari pohon induk tunggal, bibit hasil STG dan indeksing (pohon induk) dan bibit hasil perbanyakan dan genotipnya dibandingkan.

Hasil identifikasi genotip pohon induk jeruk manis Pacitan, pomelo Nambangan, dan Sri

Nyonya beserta benih hasil STG dengan 2 primer RAPD terpilih yaitu OPN 16 dan OPN 14 menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan genetik yang spesifik diantara tanaman yang diuji (Gambar 1). Primer OPN 16 dapat mengamplifikasi 9 pita DNA pada pomelo Nambangan sedangkan primer OPN14 menghasilkan 7 pita. Sementara itu amplifikasi pomelo Sri Nyonya dan manis Pacitan dengan primer OPN 16 menghasilkan 7 pita DNA. Secara individu atau bersama-sama primer operon OPN16 dan OPN14 mampu membedakan setiap sampel dengan jumlah pita DNA dan polimorfisme yang tinggi. Hasil ini menegaskan bahwa perbanyakan secara vegetatif yang melibatkan metode in vitro tidak menyebabkan penyimpangan pada genotip turunannya, serta menegaskan kebenaran identitas turunan terhadap induknya. Kebenaran genotip pohon induk bebas penyakit dibanding dengan pohon induk tunggal berdasarkan seleksi primer OPN14 dan OPN16 pada pomelo Nambangan dilaporkan oleh Agisimanto dan Supriyanto (2005 dalam proses).

Dari Gambar 1 terlihat bahwa primer RAPD OPN16 mampu mengamplifikasi genom jeruk dengan memperoleh jumlah pita yang bervariasi. Namun demikian, secara keseluruhan pita DNA yang dihasilkan berada pada posisi berbeda yang tegas, terutama diantara spesies. Hal ini membuka peluang untuk melanjutkan identifikasi pada pencarian fragmen spesifik untuk setiap varietas, sehingga menjadi identitas spesifik sebuah genotip. Hasil amplifikasi semua varietas jeruk menunjukkan bahwa seleksi genotip jeruk berdasarkan penanda



Gambar 1. Profil DNA pohon induk pomelo Nambangan (P21), Sri Nyonya (PIT4), dan manis Pacitan (PIT1) beserta benih-benih penjenis dari hasil penyambungan tunas pucuk (*DNA profile of Nambangan pummelo mother plant (P21), Sri Nyonya (PIT4), and Pacitan sweet orange (PIT1) together with the breeder seeds generated through shoot-tip-grafting*)

RAPD dapat berfungsi sebagai metode uji untuk kebenaran varietas.

Teknologi penanda molekuler (DNA) mampu mengidentifikasi kesamaan DNA tanaman dari 1 genera, spesies, dan interspesies serta dapat dipergunakan untuk membuat identitas genetik, mendiagnosis heterogenitas, dan menjamin atau menjaga perbanyakannya dari berbagai variasi. Polimorfisme yang dideteksi oleh marka RAPD (dan juga RFLP) disebabkan terutama oleh perbedaan sekuens nukleotida yang disebabkan oleh substitusi basa atau delesi/insersi. Untuk kultivar modern, penandaan identitas genotip tanaman menggunakan penanda DNA menjadi penting untuk menjamin kemurnian genetik dan melindunginya dari duplikasi secara genetik, selain memastikan kebenaran genotipnya.

Analisis RAPD telah digunakan untuk karakterisasi genotip (Lu *et al.* 1996), dan identifikasi keterpautan penanda DNA dengan gen tertentu (Nair *et al.* 1996). RAPD juga digunakan untuk mengidentifikasi genetik beberapa spesies seperti malus (Harada *et al.* 1993) dan peach (Pooler dan Scorza 1995).

KESIMPULAN

Konfirmasi kesamaan genotip pohon induk jeruk bebas penyakit manis Pacitan, pomelo Nambangan, dan Sri Nyonya serta tetuanya telah dilakukan dengan penanda DNA RAPD OPN14 dan OPN16. Pohon induk jeruk bebas penyakit yang dihasilkan melalui protokol standar penyambungan tunas pucuk terbukti secara genetik sama dengan induknya.

PUSTAKA

1. Agisimanto, D. dan A. Supriyanto. 2005. Keragaman genetik pamelos Indonesia berdasarkan primer random amplified polymorphic DNA. (*dalam proses untuk J. Hort.*)
2. Chaparro, J.X., D.J. Werner, D. O'Malley, and R.R. Sederoff. 1994. *Targeted mapping and linkage analysis of morphological, isozyme, and RAPD markers in peach*. *Theor. Appl. Genet.* 87:805-815.
3. Deng ZN, A. Gentile, E. Nicolosi, A. Vardi, and E. Tribulato. 1995. Identification of in vivo and in vitro lemon mutants by RAPD markers. *J. Hort. Sci.* 70:117-125
4. Harada, T., K. Matsukawa, T. Sato, R. Ishikawa, M. Nizeki, and K. Saito. 1993. DNA-RAPDs detect genetic variation and paternity in Malus. *Euphytica.* 65:87-91.
5. Herrero, R, M.J. Asins, E.A. Carbonell, and L. Navarro. 1996. Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. I. Intraspecific and intragenus genetic variability. *Theor. Appl. Genet.* 92:599-609
6. Lu, Z.X., G.L. Reighard, W.V. Baird, Abbott, A.G., and S. Rajapakse. 1996. Identification of peach rootstock cultivars by RAPD markers. *Hort.Sci.* 31(1):127-129.
7. Nair, S., A. Kumar, M.N. Srivastava, and M. Mohan. 1996. PCR-based DNA markers linked to a gall midge resistance gene, Gm4t, has potential for markers-aided selection in rice. *Theor. Appl. Genet.* 92:660-665.
8. Pooler, M.R. and R. Scorza. 1995. Aberrant transmission of RAPD markers in haploids, doubled haploids, and F1 hybrids of peach: observations and speculation on causes. *Scientia Horticulturae.* 64:233-241.
9. Rajapakse S, L.E. Beltho, G. He, A.E. Estager, R. Scorza, I. Verde, R.E. Ballard, W.V. Baird, A. Callahan, R. Monet, and A.G. Abbott. 1995. Genetic linkage mapping in peach using morphological, RFLP and RAPD markers. *Theor Appl Genet.* 90:503-510
10. Roose, M.L. 1988. Isozymes and DNA restriction fragment length polymorphisms in citrus breeding and systematics. In: Goren R, Mendel K (eds) *Proc 6th Int Citrus Congr.* Balaban Publishers, Rehovot, Israel. 1:155-165
11. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning* (A laboratory manual) Vol. 2. Spring Harbor Laboratory Press.
12. Santos, JB Dos, J. Nienhuis, P. Skroch, J. Tivang, and M.K. Slocum. 1994. Comparison of RAPD and RFLP genetic markers in determining genetic similarity among *Brassica oleracea* L. genotypes. *Theor Appl Genet* 87:909-915
13. Supriyanto, A. and A.M. Whittle. 1992. Citrus Rehabilitation in Indonesia. In R.H. Brlansky, R.F. Hee and L.W. Timmer (eds.) *Proc. 11th Conf. of IOCV.* p. 409-413
14. Triatminingsih, R., T. Purbiati and E. Wiedayati. 1992. Citrus Shoot-tip Grafting and its application in Indonesia In L. Setyobudi, F.A. Bahar, M. Winarno and A.M. Whittle (eds.). *Proc. Asian Citrus Rehab. Conf.* CRIFH, Indonesia
15. Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18:6531-6535.