

Survei Primer Mikrosatelit dan Isolasi DNA Tanaman F2 (Dupa x ITA131)

Joko Prasetyono, Tasliah, dan Sugiono Moeljopawiro

Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian Abstrak

ABSTRAK

Lahan masam di Indonesia diperkirakan mencapai 27,5 juta hektar (29,7% luas daratan). Perkembangan dibidang biologi molekuler memungkinkan untuk mendeteksi markah molekuler yang terpaut dengan sifat toleransi terhadap keracun-an aluminium. Markah mikrosatelit merupakan salah satu markah baru yang memiliki potensi tinggi dibidang pemuliaan tanaman. Markah tersebut bisa di-percaya, efektif, ekonomis, dan praktis. Berdasarkan hal tersebut akan dilaku-kan pemetaan alel-alel yang terpaut dengan toleransi keracunan aluminium pa-da kultivar asli Indonesia. Peta akan dibuat dengan menggunakan 190 generasi F2 persilangan Dupa (Indonesia, toleran) dan ITA131 (Afrika, sensitif). Data fenotipik akan didapatkan dari pengujian F2 dan F3 di bawah kondisi stress aluminium dibandingkan dengan kondisi normal. Sebanyak 243 markah mikro-satelit akan diaplikasikan. Program Mapmaker/QTL akan digunakan untuk mak-sud pemetaan tersebut. Uji fenotipik pada F2 telah dilakukan pada tahun 2000. Pada tahun 2001 telah dilakukan pengujian primer pada 2 tetua dan diperoleh 110 primer yang menghasilkan pita polimorfik. Dari primer tersebut, dipilih 70 primer untuk digunakan pada analisis segregasi pada 190 F2 (Dupa x ITA131). Isolasi DNA F2 telah dikerjakan dan siap digunakan untuk analisis segregasi.

Kata kunci: Keracunan aluminium, markah mikrosatelit, Dupa, ITA131

ABSTRACT

Acid soil in Indonesia is about 27.5 million hectares (29.7% of Indonesian mainland). Recent development in molecular biology can be used to identify molecular markers of trait related to aluminum toxicity tolerance. Microsatellite markers is effective, economical, and practical. In order to identify microsatellite markers, it will be mapped alleles that linked to aluminum toxicity tolerance on Indonesian cultivar. Map will be developed on 190 F2 generation of crossing between Dupa cultivar (Indonesia, highly tolerant) and ITA131 (Africa, very sensitive). Phenotypic data will be obtained from growing F2 and F3 under Al stress versus non stress condition. 243 microsatellite markers will be applied. Mapmaker/QTL program will be used for this mapping purpose. Phenotypic test on F2 was finished at 2000. At 2001, It have been finished primers survey and resulted 110 polymorphic primers. 70 polymorphic primers will be applied to 190 F2 (Dupa x ITA131). DNA of F2 have been isolated and ready to be amplified using selected primers.

Key words: Aluminum toxicity, microsatellites marker, Dupa, ITA131

PENDAHULUAN

Aluminium (Al) merupakan salah satu unsur yang banyak terdapat dalam tanah masam. Pemasaman tanah dapat berkembang secara alami jika kation basa tercuci dari tanah, namun dapat dipercepat karena tindakan budi daya. Pemasaman tersebut akan mengakibatkan keracunan aluminium yang dapat mengurangi pertumbuhan akar dan tajuk (Fageria *et al.*, 1988; Chaudhary *et al.*, 1987; Gauer dan Horst, 1990). Selain itu, ketersediaan hara N, P, K, Ca, Mg, dan Mo juga sangat terbatas (Fageria dan Robello, 1987; Baligar *et al.*, 1989; Kaher, 1993; Lubis *et al.*, 1993). Defisiensi P pada umumnya diinduksi oleh kandungan Al yang tinggi. Hal ini disebabkan terbentuknya kompleks Al-fosfat (baik di larutan tanah maupun di dalam sel) yang tidak bisa digunakan oleh tanaman. Kemampuan tanaman untuk dapat memanfaatkan kandungan P yang rendah secara efisien selalu dihubungkan dengan sifat toleransi tanaman terhadap Al. Kation trivalen Al^{3+} akan menghambat transpor Ca^{2+} secara efektif ke dalam akar, protoplas, dan membran *vesicles*. Hasil studi pada *lipid bilayer* menunjukkan bahwa Al dapat memblok Ca^{2+} dan saluran K^+ (Ryan *et al.*, 1997).

Tanaman tidak dapat menghindari kehadiran aluminium di larutan tanah karena proses pemasaman spontan dari tanah (Hai *et al.*, 1989). Kelebihan Al sangat dipengaruhi oleh pH tanah. Tanah dengan pH <5 kelarutan Al sangat tinggi dan Al terdapat dalam bentuk monomer Al^{3+} yang sangat beracun bagi tanaman. Di samping Al^{3+} , dapat juga $Al(OH)^{2+}$, dan $Al(OH)_2$ yang terbentuk sebagai akibat kenaikan pH. Pada pH mendekati netral aluminium menjadi gipsit atau $Al(OH)_3$ (Delhaize dan Ryan, 1995; Marschener, 1995). Oleh karena itu, pada pH rendah terbatasnya pertumbuhan tanaman tidak hanya disebabkan oleh aktivitas ion H^+ , tetapi juga kelebihan ion aluminium yang meracuni perakaran tanaman.

Cara terbaik untuk menanggulangi hal tersebut adalah melakukan perakitan varietas yang tahan di lahan masam. Varietas tersebut dapat bertahan hidup dengan kondisi tercekam, sehingga pengapuran untuk meningkatkan pH tanah dapat diminimalkan. Pemuliaan konvensional membutuhkan waktu yang panjang dan areal luas untuk memproduksi satu galur baru. Lebih jauh lagi, seleksi berdasarkan pada fenotipe saja akan menemui banyak kesulitan dan memiliki efisiensi yang rendah (Bennet, 1993).

Perkembangan teknologi baru telah menjangkau pengujian polimorfisme DNA untuk pemetaan genetik, markah untuk pemuliaan tanaman, dan eksplorasi hubungan kekerabatan. Teknologi tersebut meliputi RFLP, RAPD, AFLP, dan mikro-satelit (Powell *et al.*, 1996). Markah mikrosatelit mempunyai sifat seperti halnya markah RFLP. Mikrosatelit adalah motif sederhana urutan basa nitrogen yang terdapat pada kromosom suatu organisme. Urutan itu berulang-ulang sebagai motif yang unik. Para ilmuwan memanfaatkannya dengan memetakan urutan tersebut pada kromosom suatu organisme, sehingga markah mikrosatelit memiliki kemampuan mendeteksi suatu

populasi segregasi seakurat RFLP. Dengan kemampuan-nya *multiple loading* pada gel poliakrilamid pendeteksian populasi segregasi akan dapat dilakukan secara cepat, tepat, dan efisien (McCouch *et al.*, 1997; Panaud *et al.*, 1995). Sampai saat ini, ratusan markah mikrosatelit telah dibuat (Panaud *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997; Temnykh *et al.*, 2000).

Penggunaan markah mikrosatelit relatif mudah karena menggunakan teknik PCR, mereka terdistribusi pada seluruh kromosom sehingga diharapkan semakin tinggi kemungkinan untuk mendapatkan markah yang terpaut dengan suatu sifat tertentu. Selain itu, pembuatan peta keterpautan mikrosatelit di dalam merakit varietas baru dapat menghemat waktu, tenaga, dan dana (Akagi *et al.*, 1996).

BAHAN DAN METODE

Survei Primer Mikrosatelit

DNA dari 2 tetua (Dupa x ITA131) diisolasi menggunakan metode Dellaporta *et al.* (1983). DNA diencerkan dan digunakan untuk reaksi PCR menggunakan primer mikrosatelit. Campuran PCR untuk satu reaksi disajikan pada Tabel 1.

Program PCR yang digunakan dalam penelitian ini adalah 5 menit pada suhu 94°C untuk denaturasi permulaan, selanjutnya dilakukan 35 siklus terdiri dari 1 menit pada suhu 94°C untuk denaturasi, 1 menit pada suhu 55°C untuk penempelan primer, dan 2 menit pada suhu 72°C untuk perpanjangan primer. Perpanjangan primer terakhir 7 menit pada suhu 72°C.

Sampel diberi loading bufer kemudian didenaturasi menggunakan mesin PCR pada suhu 94°C selama 5 menit dan secepat mungkin dimasukkan ke dalam kotak berisi es. Gel dipersiapkan terlebih dahulu dan dimasukkan dalam alat pen-cetak gel (*glass plate*) merk *BioRad*. Sampel dielektroforesis pada 5% gel poliakri-lamid pada suhu 45°C dengan daya 100 watt selama 3 jam.

Tabel 1. Komposisi reaksi PCR untuk mikrosatelit

Reagen	Konsentrasi Stok	Volume (µl)	Konsentrasi akhir
ddH ₂ O steril	-	12,5	-
Bufer PCR dengan 15 mM MgCl ₂	10 x	2	*1 x
dNTPmix	1 mM	2	100 µM
Primer forward	5 µM	1	0,25 µM **
Primer reverse	5 µM	1	0,25 µM**
Taq polymerase	5 unit/µl	0,5	2,5 Unit/20 µl
DNA	25 ng/µl	2	50 ng/µl
Total		20	

*1 x bufer PCR: 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,01% Gelatin

** Kedua primer sudah dicampur terlebih dahulu dan diambil 2 µl (F + R)

Pewarnaan DNA dilakukan dengan metode silver staining. Glass plate yang mengandung gel berisi DNA direndam dalam baki berisi 10% asam asetat glasial (larutan fiksasi) yang dishaker selama 20 menit, atau warna loading bufer pada gel menjadi hilang. Glass plate dicuci dalam *ultra pure water* (air yang disuling 2 kali) selama 3 kali masing-masing 1 menit. Glass plate direndam dalam larutan pewarna (*silver staining*) di atas shaker selama 1 jam, kemudian dibilas dalam *ultra pure water* selama 10 detik. Glass plate kemudian direndam dalam larutan developer sehingga akan muncul pita-pita. Setelah itu, secepatnya direndam dalam larutan asam asetat selama 5 menit dan dibilas dengan *ultra pure water* lagi dan dikering-anginkan. Primer yang memberikan pola pita polimorfis dipakai untuk analisis segregasi pada populasi F₂-nya

Isolasi DNA F₂

Daun dari 190 nomor F₂ (Dupa x ITA131) terpilih diambil dan diisolasi DNA-nya menggunakan metode Dellaporta yang dimodifikasi (Dellaporta *et al.*, 1983). Daun segar seberat 5 g digerus dalam cawan. Agar tidak terjadi kerusakan sel, selama penggerusan ditambah nitrogen cair. Serbuk daun dimasukkan dalam 50 ml *polypropylene tube*. Larutan bufer ekstrak yang mengandung Na-disulfit (0,8 g/100 ml bufer ekstrak) ditambahkan dan dipanaskan dalam waterbath pada suhu 65°C, selama 15 menit. *Polypropylene tube* dibolak-balik tiap 5 menit. Untuk memisahkan supernatan (larutan yang mengandung DNA) dengan kotorannya ditambahkan chloroformisoamyl alkohol (Chisam) dengan perbandingan 1 : 1. Kedua bahan tersebut dicampur dengan mesin penggoyang (*shaker*) selama 20 menit, kemudian disentrifugasi pada 4000 rpm selama 20 menit. Supernatan DNA (larutan atas) di-pindah ke 50 ml *polypropylene tube* yang baru dan ditambah dengan alkohol absolut (96%) dengan perbandingan 1 : 2 (supernatan : alkohol absolut). DNA yang terbentuk diambil dengan pipet pasteur, dipindahkan ke dalam effendorf 1,5 ml. Endapan DNA dicuci dengan alkohol 70% 2 kali, kemudian dikeringkan dalam mesin vacum. Endapan DNA dilarutkan dalam 1 x TE bufer sesuai dengan besar kecil-nya endapan. RNase ditambahkan untuk melarutkan RNA. Na asetat sebanyak 1/10 volume ditambahkan ke dalam larutan DNA untuk menghilangkan kotorannya. Untuk mengamati kualitas dan kuantitas DNA digunakan alat elektroforesis dan spektrofotometer.

Untuk mengamati kualitas DNA, diambil 3 µl DNA padi dicampur 3 µl blue juice dimasukkan dalam *hole* (sumur) gel yang mengandung 0,8% agarose (0,8 g agarose dilarutkan dalam 100 ml 0,5 x TBE). Gel dielektroforesis kemudian di-rendam dalam etidium bromida dan dipotret. DNA padi yang bagus akan memiliki gumpalan besar di dekat hole.

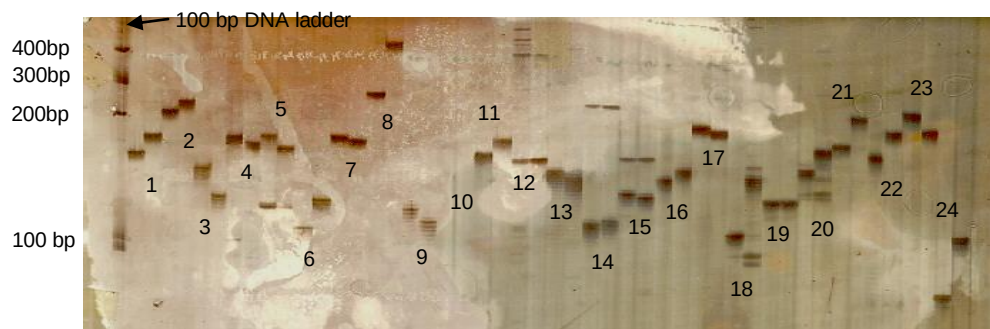
Untuk menguji kuantitas DNA diambil 10 µl DNA dilarutkan dalam 2490 µl TE. Diukur dengan alat spektrofotometer, pada panjang gelombang (λ 260 dan 280. Dari data tersebut dapat dihitung purity/kemurnian dan jumlah

DNA (purity = λ 260/ λ 280). Apabila diperoleh angka kurang dari 1,8 ditambahkan protease dan apabila angka yang diperoleh lebih besar ditambah RNase. Jumlah DNA = λ 260 x 250 x 50/1000 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$). DNA diencerkan sesuai dengan kebutuhan. DNA inilah yang akan digunakan untuk analisis segregasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Survei Primer Mikrosatelit

Dari hasil survei tetua menggunakan 243 primer mikrosatelit telah diperoleh 110 primer (45,27%) yang polimorfis pada 2 tetua, 3 primer tidak menghasilkan pita, 7 primer menghasilkan pita yang banyak, dan 123 primer menghasilkan pita yang monomorfis. Berdasarkan jarak antarprimer di dalam peta pautan yang sudah ada, dari 110 primer polimorfis dipilih 70 primer yang digunakan untuk meng-amplifikasi DNA 94 individu F₂. Contoh hasil amplifikasi survei primer pada kedua tetua dapat dilihat dalam Gambar 1 dan 2.



1 = RM 201, 2 = RM 202, 3 = RM 204, 4 = RM 209, 5 = RM 210, 6 = RM 220, 7 = RM 224, 8 = RM 226, 9 = RM 228, 10 = RM 231, 11 = RM 232, 12 = RM 239, 13 = RM 241, 14 = RM 246, 15 = RM 249, 16 = RM 253, 17 = RM 254, 18 = RM 256, 19 = RM 261, 20 = RM 262, 21 = RM 263, 22 = RM 306, 23 = CT 109 (RM264), 24 = CT 114

Gambar 1. Hasil amplifikasi primer mikrosatelit pada tetua Dupa x ITA131 pada gel poliakrilamid 5%

Isolasi DNA F2

Berdasarkan pertimbangan efisiensi biaya, waktu, dan tenaga maka dari 300 sampel DNA yang telah diisolasi dipilih 190 galur untuk analisis keterpautan. Dasar pemilihan adalah hasil isolasi DNA yang bagus dan memiliki benih F3. Dari 300 nomor galur F2 yang ditanam setelah diuji fenotipik tidak semua galur menghasilkan biji. Sebagian biji hampa sebagian dimakan burung. Berdasarkan hal tersebut maka dipilih 190 nomor galur. Jumlah galur ini telah didiskusikan dengan beberapa pakar yang telah berpengalaman dalam studi keterpautan, sehingga bisa dipertanggungjawabkan secara ilmiah.

RM 84	RM 485	RM 22	RM 307	RM 548	RM 170
RM 220	RM 211	RM 489	RM 273	RM 437	RM 510
RM 490	RM 279	RM 545	RM 241	RM 169	RM 204
RM 259	RM 53	RM 232		RM 509	RM 253
RM 243	RM 555	RM 251		RM 440	RM 50/RM 276
RM 580	RM 145	RM 282		RM 26	RM 275
RM 140	RM 492	RM 503		RM 538	RM 340
RM 5	RM 262	RM 426			RM 439
RM 237	RM 341	RM 55			
RM 128	RM 475	RM 168			
RM 226	RM 263	RM 520			
RM 212	RM 526	RM 442			
RM 315	RM 221				
RM 472	RM 6				
RM 431	RM 240				
RM 104	RM 250				
	RM 166				
	RM 208				
	RM 482				
	RM 266				
	RM 138				
Kromosom 1	Kromosom 2	Kromosom 3	Kromosom 4	Kromosom 5	Kromosom 6
RM 436	RM 506	RM 285	RM 474	RM 167	RM 19
RM 295	RM 407	RM 464	RM 330 A	RM 202	RM 247
RRM 481	RM 126	RM 566	RM 216	RM 209	RM 277
RRM 445	RRM 256	RM 257	RM 467	RM 313	RM 313
RRM 11	RRM 308	RM 257	RM 271	RM 229	
RRM 234	RRM 230	RM 242	RM 294 A	RM 457	
RRM 18	RRM 264	RM 201	RM 228	RM 21	
RRM 248			RM 484	RM 144	
			RM 333		
			RM 591		
Kromosom 7	Kromosom 8	Kromosom 9	Kromosom 10	Kromosom 11	Kromosom 12

Tanda bold (tebal) adalah markah mikrosatelit yang terpilih untuk analisis segregasi

Gambar 2. Markah mikrosatelit yang telah diuji pada dua tetua dan telah menghasilkan polimorfisme di antara keduanya

KESIMPULAN

1. Telah diperoleh 70 primer terpilih untuk analisis segregasi pada populasi F2 (Dupa x ITA131).
2. Telah diisolasi DNA sejumlah 190 nomor galur F2 (Dupa x ITA131) untuk analisis segregasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Akagi H., Y. Yokozeki, A. Inagaki, and T. Fujimaura. 1996.** Microsatellite DNA markers for rice chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 93:1071-1077.
- Baligar, V.C., H.L. Dos Santos, G.V.E. Pitta, E.C. Filho, C.A. Vasconcelos, and A.F. De Filho. 1989.** Aluminum effect on growth, grain yield, a nutrient use efficiency ratio in sorghum genotypes. *Plant and Soil* 116:257-264.
- Bennet, J. 1993.** Maps and markers. *In* Genome analysis of plant, pests, and pathogens. Workshop handbook. International Rice Research Institute. Los Banos.
- Chaudhry, M.A., S. Yoshida, and B.S. Vergara. 1987.** Induces mutation for Al tolerance after N-methyl-N-nitrosurea treatment of fertilized egg cell in rice. *Environment and Experimental Botany* 27(1):37-43.
- Chen, X., S. Temnykh, Y. Cu, F.G. Cho, and S.R. McCouch. 1997.** Development of a microsatellite framework map providing genome wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 95:553-567.
- Delhaize and Peter R. Ryan. 1995.** Aluminum toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiol* 107:315-321.
- Dellaporta, S.L., J. Wood, and J.B. Hicks. 1983.** A plant DNA miniprep: version II. *Plant. Mol. Biol. Rep.* 1(4):19-21.
- Fageria and Robello. 1987.** Tolerance of rice cultivars to iron toxicity. *J. of Plant Nutrition* 10:653-661.
- Fageria, R.J. Wright, and V.C. Baligar. 1988.** Rice cultivar respon to aluminum in nutrient solution. *Commun. in Soil Sci. and Plant Annal.* 9:1133-1142.
- Gauer, U.E. and W.J. Horst. 1990.** Effect of pH and nitrogen source on aluminum tolerance of rye (*Secale cereale* L.) and yellow lupin (*Lupinus luteus* L.). *Plant and Soil* 127:13-21.

- Hai, T.V., T.T. Nga, and H. Laudelout. 1989.** Effect of aluminum on the mineral nutrition of rice. *Plant and soil* 114:173-175.
- Kaher, A. 1993.** Status perbaikan varietas padi gogo untuk lahan kering marginal. Disajikan sebagai makalah penunjang dalam Simposium Penelitian Tanaman Pangan II. Puslitbangtan. Jakarta/Bogor, 23-25 Agustus 1993.
- Lubis, E., M. Diredja, Z. Harahap, dan B. Kustianto. 1993.** Perbaikan varietas padi gogo. Disajikan sebagai makalah penunjang dalam Simposium Penelitian Tanaman Pangan II. Puslitbangtan. Jakarta/Bogor, 23-25 Agustus 1993.
- Marschner, H. 1995.** Mineral nutrition of higher plants. Academic Press. New York.
- McCouch, S.R., X. Chen, O. Panaud, S. Temnykh, Y. Xu, Y.G. Cho, N. Huang, T. Ishii, and M. Blair. 1997.** Microsatellite marker development, mapping, and applications in rice genetics and breeding. *Plant Mol. Biol.* 35:89-99.
- Panaud, O., X. Chen, and S.R. McCouch. 1995.** Frequency of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Genome* 38:1170-1176.
- Panaud, O., X. Chen, and S.R. McCouch. 1996.** Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Gen Genet.* 252:597-607.
- Powell, W., M. Morgante, C. Andre, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingey, and A. Rafalski. 1996.** The comparison of RFLP, RAPD, AFLP, and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2:225-238.
- Ryan, P.R., R.J. Reid, and F.A. Smith. 1997.** Direct evaluation of the Ca^{2+} -displacement hypothesis for Al toxicity. *Plant Physiol.* 113:1351-1357.
- Temnykh, S., W.D. Park, N. Ayres, S. Cartinhour, N. Hanck, L. Lipovich, Y.G. Cho, T. Ishii, and S.R. McCouch. 2000.** Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 100:697-712.