

Pencarian Markah Molekuler untuk Padi Tahan Blas: Survai Polimorfisme dan Analisis Segregasi dengan Markah RFLP

Dita Agisimanto, M. Bustamam, Reflinur, dan A. Warsun

Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor

ABSTRAK

Penggunaan varietas tahan adalah strategi yang paling ekonomis, efisien, dan ramah lingkungan dalam mengurangi kehilangan hasil akibat serangan penyakit blas yang disebabkan oleh jamur blas. Percobaan ini dilakukan untuk memper-oleh kombinasi enzim restriksi dan probe yang mampu membedakan Danau Tempe dan Kencana Bali dan analisis segregasi beberapa probe cDNA padi dan oat pada populasi F_8 hasil persilangan Danau Tempe dan Kencana Bali. Kombinasi 53 probe dan lima enzim restriksi menghasilkan 21 pasang kombina-si yang mampu membedakan tetua. Kombinasi antara enzim restriksi *DraI* dan probe dengan motif struktur NBS-LRR menghasilkan tingkat polimorfis tertinggi dibandingkan dengan kombinasi lainnya. Sebanyak enam probe telah dihibridi-sasikan pada galur-galur inbrida rekombinan.

Kata kunci: Blas, Danau Tempe, Kencana Bali

ABSTRACT

The use of resistance varieties are the best strategies and efficient to reduce the yield loss in rice blast endemy area. The objective of the research are to screen combination of probes and restriction enzymes which show polymorphic band between parents and using the polymorphic markers in hybridization of offspring of Danau Tempe and Kencana Bali. Out of 53 probes were screened on genomic parents cut with five restriction enzymes, we found 21 pairs of probes and restriction enzymes show polymorphic. The combination of *DraI* and probe gave the highest polymorphic score than another combination. About six probes were used in segregation analysis of F_8 population.

Key words: Blast, Danau Tempe, Kencana Bali

PENDAHULUAN

Penggunaan varietas tahan dalam budi daya padi gogo adalah langkah yang paling ekonomis dan efisien dalam mengurangi kehilangan hasil akibat serangan blas yang disebabkan oleh jamur *Pyricularia grisea* (*Pyricularia oryzae*). Penyakit blas pada padi sawah merupakan penyakit yang paling merusak selain hawar daun bakteri yang menyebabkan tingginya kehilangan hasil di sentra produksi padi sa-wah dan padi gogo. Hal ini disebabkan oleh tingginya daya adaptasi dan keragam-an patogen blas tersebut (Ou, 1985).

Oleh karena itu, perakitan atau perbaikan varietas yang memiliki gen pengatur ketahanan terhadap blas perlu dilakukan.

Karakterisasi dan penelusuran sifat ketahanan varietas padi (calon tetua) merupakan langkah awal dalam perakitan varietas tahan blas. Karakterisasi dan penelusuran sifat ketahanan varietas terhadap penyakit blas dapat dilakukan dengan teknologi markah molekuler atau markah DNA. Teknologi markah molekuler tersebut secara umum dapat dikelompokkan menjadi markah molekuler berbasis hibridisasi, yaitu *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) yang menggunakan probe dari klon DNA atau kandidat gen dan berbasis PCR seperti *Rapid Amplification Polymorphic DNA* (RAPD) (McCouch dan Tanksley, 1991), *Simple Sequence Repeat* (SSR = mikrosatelit) (Cho *et al.*, 2000; McCouch *et al.*, 1997), *Resistance Gene Analog* (RGA) (Chen *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2000). Teknik analisis DNA tersebut mampu mengidentifikasi dan memetakan sifat-sifat yang mengatur ketahanan terhadap blas dengan markah-markah DNA yang digunakan. Dengan informasi ini memungkinkan para peneliti untuk melakukan seleksi hasil persilangan pada program perbaikan varietas dengan markah DNA yang terpaut dengan sifat tahan blas di masa mendatang.

Untuk mengetahui lokasi gen pengendali ketahanan padi Indonesia terhadap penyakit blas dan untuk mendapatkan markah DNA yang terpaut gen tahan blas maka pada penelitian ini dilakukan (1) pembuatan populasi inbrida rekombinan (*Recombinant Inbred Lines* = RILs) dengan menyilangkan tanaman tahan dan tanaman rentan terhadap penyakit blas, dan mengembangkan masing-masing hasil persilangan secara *Single Seed Descend* (SSD) hingga generasi F₈, (2) menyeleksi markah RFLP dan kombinasinya dengan enzim restriksi tertentu yang dapat memberikan gambaran pola pita DNA yang polimorfis (berbeda) antara tanaman tahan dan tanaman rentan penyakit blas. Markah DNA yang terpilih ini, akan digunakan dalam analisis segregasi inbrida rekombinan F₈.

Makalah ini akan menjelaskan hasil survai polimorfisme Danau Tempe dan Kencana Bali menggunakan markah RFLP dan hasil analisis segregasi beberapa probe RFLP pada populasi F₈ hasil persilangan Danau Tempe dan Kencana Bali.

BAHAN DAN METODE

Persiapan DNA dilakukan berdasarkan metode Dellaporta *et al.* (1983), sedangkan uji kualitas dan kuantitas DNA dilakukan menurut metode Sambrook *et al.* (1989). Setiap sampel DNA tetua dipotong dengan enam macam enzim restriksi, yaitu *Bam*HI, *Dra*I, *Eco*RV, *Hind*III, dan *Sca*I. Fragmen DNA tetua tersebut kemudian diseparasi pada gel agarose 0,8% pada elektroforesis datar. Proses blotting dan hibridisasi 53 macam probe kandidat gen dilakukan berdasarkan sistem labeling ECL yang direkomendasikan oleh Amersham dan bahan bukan radioaktif dig-11-dUTP dari Roche. Pola pita

yang dihasilkan dari hibridisasi ini direkam pada film X-ray dan dibaca sebagai data polimorfis probe dan enzim restriksi. Kombinasi enzim restriksi dan probe yang dapat membedakan tetua selanjutnya digunakan dalam analisis segregasi. Setiap galur inbrida rekombinan beserta kedua tetua dipotong dengan enzim restriksi dan dihibridisasikan dengan probe yang polimorfis dengan metode yang sama (IRRI, 1994a; 1994b).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Survai Polimorfisme Danau Tempe dan Kencana Bali

Identifikasi tetua dengan markah RFLP menggunakan probe kandidat gen (*candidate gene probe*) dilakukan untuk meningkatkan jumlah kombinasi enzim dan probe yang dapat membedakan tetua. Dari 53 probe yang disurvei diperoleh 21 probe yang menghasilkan polimorfisme di antara tetua (Tabel 1). Hasil survai tetua menunjukkan bahwa kombinasi enzim restriksi *DraI* dengan probe kandidat gen menghasilkan pita polimorfis terbanyak antara kedua tetua, yaitu 35,85% (19 probe) (Gambar 1). Sementara jumlah terendah diperoleh dari kombinasi *ScaI* dan probe, yaitu 20,75% (11 probe). Kombinasi probe dengan enzim restriksi *DraI*, *BamHI*, *HindIII*, *EcoRV*, dan *ScaI* masing-masing menghasilkan pita polimorfis antara tetua berturut-turut sebanyak 19, 18, 15, 13, dan 11 pasang dengan total 21 pasang kombinasi. Secara keseluruhan diperoleh 76 kombinasi enzim restriksi dan probe yang polimorfis, namun hanya dipilih 21 pasang kombinasi yang terbaik. Berdasarkan survai polimorfisme tetua tersebut terlihat bahwa keragaman terkelompok pada probe yang terkelompok ke dalam motif struktur NBS-LRR (*nucleotide-binding site-leucine rich repeat*). Hal ini berarti bahwa tanaman yang diuji kemungkinan mengandung struktur yang mirip (homolog) dengan struktur yang umum dari gen ketahanan. Kombinasi enzim restriksi dan probe RFLP hasil survai tetua ini akan digunakan untuk menganalisis segregasi galur inbrida rekombinan. Hasil ini telah menambah jumlah total probe yang sudah disurvei pada tetua selama percobaan berlangsung, yaitu sebanyak 165 probe dengan memperoleh 72 kombinasi probe enzim polimorfis.

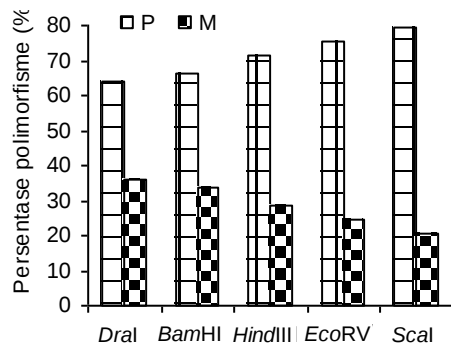
Analisis Segregasi Galur Inbrida Rekombinan dengan Markah RFLP

Analisis segregasi galur inbrida rekombinan dilakukan dengan menggunakan markah molekuler berbasis hibridisasi, yaitu markah RFLP. Setiap galur inbrida rekombinan dan tetua dihibridisasi dengan setiap probe yang telah diseleksi dari survai polimorfis tetua. Pita DNA galur inbrida rekombinan dibaca berdasarkan kesamaannya dengan pita DNA tetua. Sampai saat ini, telah dihibridisasi enam probe yang bersegregasi dengan galur inbrida rekombinan. Gambaran penyebaran genotipe galur dapat dilihat pada Gambar 2. Dari Gambar tersebut tampak keragaman jumlah genotipe galur yang dihasilkan dari setiap probe. Kombinasi enzim dan probe RZ612, RG400, RG1028, RZ390, RG64, dan RZ536 mengidentifikasi berturut-turut 110, 64, 90, 85, 41, dan 97 galur tahan (R) sedangkan galur yang menunjukkan tipe heterozigot (MR) sebanyak 13, 5, 3, dan sisanya nol. Hasil analisis

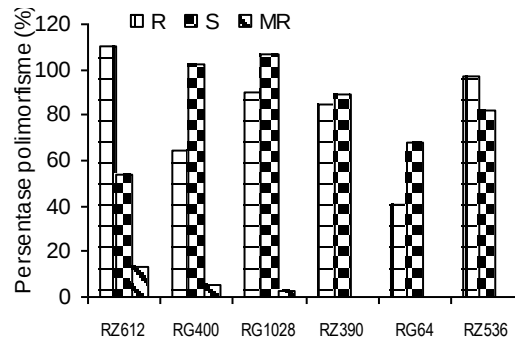
segregasi ini akan digunakan dalam studi keterpautan untuk memperoleh data keterpautan markah molekuler pada sifat tahan blas.

Tabel 1. Daftar probe RFLP yang digunakan dalam survei tetua Danau Tempe dan Kencana Bali

Probe	Posisi	Keterangan	Probe	Posisi	Keterangan	Probe	Posisi	Keterangan
CDO-54	1	1	CDO-686	2	1	RG-450	3	1
RG-236	1	0	CDO-1091	2	1	RG-910	3	2
RG-331	1	0	RG-73	2	0	RZ-329	3	0
RG-345	1	0	RG-139	2	1	RZ-393	3	1
RG-400	1	1	RG-152	2	1	RZ-452	3	1
RG-462	1	0	RG-171	2	1	RZ-745	3	0
RG-612	1	1	RG-256	2	1			
RG-811	1	1	RG-365	2	1			
RZ-288	1	0	RZ-213	2	0			
RZ-566	1	0	RZ-531	2	0			
RZ-730	1	0						
RZ-744	1	0						
RZ-776	1	0						
CDO-36	4	0	CDO-105	5	0	RG-64	6	3
CDO-93	4	0	CDO-346	5	0	RG-123	6	1
RG-91	4	0	RG-207	5	0	RG-244	6	0
RG-169	4	1	RG-344	5	2	RG-424	6	1
RG-329	4	4	RG-360	5	1	RG-433	6	0
RG-788	4	1	RG-470	5	3	RG-445	6	3
RG-864	4	0	RG-480	5	0	RG-456	6	6
RG-908	4	0	RZ-67	5	0	RG-778	6	0
RZ-69	4	0	RZ-70	5	2	RG-1028	6	4
RZ-467	4	1	RZ-390	5	1	RZ-242	6	0
RZ-565	4	0	RZ-495	5	0	RZ-450	6	1
RZ-569	4	0	RZ-556	5	0	RZ-588	6	1
RZ-656	4	0				RZ-612	6	1
RZ-889	4	0				RZ-688	6	0
						RZ-965	6	1
RG-156	7	0	RG-28	8	0	RG-563	9	0
RG-351	7	0	RZ-66	8	2	RG-662	9	2
RZ-272	7	2	RZ-562	8	3	RZ-12	9	0
RZ-387	7	1	RZ-572	8	0	RZ-206	9	1
RZ-395	7	0						
RZ-721	7	0						
RZ-886	7	0						
RG-556	7	0						
RG-752	10	1	CDO-520	11	0	RG-181	12	0
RZ-337	10	1	RG-2	11	3	RG-190	12	0
RZ-561	10	0	RG-16	11	0	RG-241	12	0
RZ-892	10	1	RG-103	11	1	RG-341	12	0
			RG-131	11	0	RG-869	12	4
			RG-303	11	0	RZ-76	12	0
			RG-304	11	0	RZ-257	12	0
			RG-1094	11	0	RZ-397	12	4
			RG-1109	11	1	RZ-816	12	1
			RZ-536	11	2			
			RZ-557	11	0			
			RZ-638	11	0			



Gambar 1. Persentase polimorfisme kombinasi enzim restriksi dan probe kandidat gene



Gambar 2. Komposisi genotipe galur inbrida rekombinan berdasarkan analisis segregasi dengan enam probe RFLP

KESIMPULAN

1. Sebanyak 21 probe kandidat gen menghasilkan pita polimorfis pada survei tetua. Kombinasi enzim *DraI* dan probe menunjukkan polimorfisme tertinggi.
2. Sejauh ini telah dihibridisasi enam probe yang menunjukkan bersegregasi dengan galur inbrida rekombinan dengan perbandingan genotipe yang hampir sama antara R dan S.

DAFTAR PUSTAKA

- Chen, X.M., R.S. Line, and H. Leung. 1998.** Genome scanning for resistance gene analog in rice, barley, and wheat by high resolution electrophoresis. TAG 97:345-355.
- Cho, Y.G., T. Ishii, S. Temnykh, X. Chen, L. Livovich, S.R. McCouch, W.D. Park, N. Ayres, and S. Cartinhour. 2000.** Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and gen bank sequences in rice (*Oryza sativa* L.). TAG 100:713-722.
- Dellaporta, S.L., J. Wood, and J.B. Hicks. 1983.** A plant DNA miniprep: Version II. Plant Molecular Biology Reporter 1:19-21.
- International Rice Research Institute. 1994a.** Trainees Manual. ARBN-1, Follow-up Training Course. IRRI, Los Banos, Philippines.
- International Rice Research Institute. 1994b.** Trainees Manual. Asian Rice Biotechnology Network (ARBN) Phase I Training Course. IRRI, Los Banos, Philippines.

- McCouch, S.R. and S.D. Tanksley. 1991.** Development and use of restriction fragment length polymorphism in rice breeding and genetics. *In* Khush, G.S. and G.H. Toennissen (*Eds.*). Rice Biotechnology. IRRI, Los Banos, Philippines.
- 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 Molecular Biology Reporter* 35:89-99.
- Ou, S.H. 1985.** Rice Disease 2nd ed. Commonwealth Mycological Institute, CAB, Kew, Surrey, England. p. 109-201.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989.** Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Press.
- Wang, Z.H., E.S. Borrowmeo, P. Teng, and H. Leung. 2000.** Diferentiation of rice varieties cultivated in Yunnan, China using PCR marker corresponding to conserved motif of diseases resistance genes. *Plant Breeding*. p. 45-50.