

Pemetaan Gen Ketahanan terhadap Wereng Batang Cokelat pada Untup Rajab, Varietas Padi Lokal Indonesia (Mapping of Resistance Genes to Brown Planthopper in Untup Rajab, an Indonesian Local Rice Variety)

Muhamad Yunus*, Diani Damayanti, Ahmad Dadang, Ahmad Warsun, Dani Satyawan, Kusumawaty Kusumanegara, Iswari Saraswati Dewi, Sutrisno, dan Bahagiawati Amir Husin

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111 Indonesia
Telp. (0251) 8622833; Faks. (0251) 8622833; *E-mail: muhamadyunus101@gmail.com

Diajukan: 23 November 2018; Direvisi: 10 Desember 2018; Diterima: 12 Desember 2018

ABSTRACT

Brown planthopper (BPH) is a major rice pest in Indonesia. The most economical and effective approach to control the insect pest is by using resistant varieties. Exploring for resistance genes is, therefore, a prerequisite for effective breeding program for BPH resistance. This study aimed to map BPH resistance genes in Untup Rajab, an Indonesian local rice variety. Genetic map was constructed using an F_2 population from a cross between TN-1 and Untup Rajab, and SNP markers from RiceLD SNP Chip. Phenotyping was performed using bulk seedling test on $F_{2,3}$ seedlings against two BPH populations, i.e. X1 and S1. Four QTLs were identified on chromosomes 5, 6, 8, and 11 with PVE values of 7.63%, 9.40%, 17.66%, and 3.05%, respectively. Relatively normal distribution of resistance phenotype and the relatively low PVE values indicate that Untup Rajab has a quantitative resistance to BPH with two different resistance loci identified for each BPH test population. The QTL on chromosome 8 overlaps with *OsHI-LOX* gene, which is associated with resistance to BPH, and adjacent to another QTL for resistance to green leafhopper. The QTL on chromosome 6 was found near *OsPLD α 4* and *OsPLD α 5* genes which are related to BPH resistance. Meanwhile, the QTL intervals on chromosome 5 and 11 did not overlap with any known BPH QTLs or genes, which make them attractive candidates for novel BPH resistance gene discovery.

Keywords: Brown planthopper, rice, resistance gene, local rice variety.

ABSTRAK

Wereng batang cokelat (WBC) merupakan hama utama tanaman padi di Indonesia. Penanganan yang ekonomis dan efektif terhadap hama ini adalah dengan menanam varietas tahan. Eksplorasi gen ketahanan sangat diperlukan untuk merakit varietas tahan WBC. Penelitian ini bertujuan memetakan gen ketahanan terhadap WBC pada Untup Rajab yang merupakan varietas lokal Indonesia. Konstruksi peta pautan menggunakan 115 individu tanaman populasi F_2 hasil persilangan TN-1 dengan Untup Rajab, dan marka SNP dari *RiceLD SNP Chip*. Analisis ketahanan menggunakan galur $F_{2,3}$ dan dua populasi WBC, yaitu X1 and S1 yang berbeda tingkat virulensinya, dilakukan dengan metode *Bulk Seedling Test*. Empat lokus (QTL) yang berhubungan dengan ketahanan terhadap WBC dapat diidentifikasi pada kromosom 5, 6, 8 dan 11 dengan nilai PVE berturut-turut 7,63%, 9,40%, 17,66%, dan 3,05%. Data fenotipe ketahanan yang menyebar relatif normal dan nilai PVE yang relatif rendah mengindikasikan Untup Rajab memiliki sifat ketahanan kuantitatif terhadap WBC dengan dua lokus ketahanan berbeda yang teridentifikasi untuk tiap populasi WBC uji. QTL pada kromosom 8 terletak pada lokasi yang tumpang tindih dengan gen *OshI-LOX* yang memiliki fungsi ketahanan terhadap WBC dan berdekatan dengan satu QTL yang berhubungan dengan ketahanan terhadap wereng hijau. QTL pada kromosom 6 berdekatan dengan dua gen, yaitu *OsPLD α 4* dan *OsPLD α 5*, yang memiliki fungsi ketahanan terhadap WBC. Sementara untuk QTL pada kromosom 5 dan 11, tidak teridentifikasi adanya gen yang berasosiasi dengan ketahanan terhadap WBC sehingga merupakan kandidat untuk penemuan gen ketahanan baru.

Kata kunci: Wereng batang cokelat, padi, gen ketahanan, varietas padi lokal.

PENDAHULUAN

Wereng batang coklat (WBC) merupakan salah satu hama utama tanaman padi di Indonesia. Hama ini merusak tanaman padi dengan cara mengisap cairan sel tanaman, juga dapat berperan sebagai vektor virus penyebab penyakit kerdil rumput dan kerdil hampa (Oka dan Bahagiawati 1984). Tanaman padi yang terserang WBC menunjukkan gejala layu dan akhirnya tampak seperti terbakar sehingga serangan berat hama ini dikenal dengan istilah *hopperburn*. Serangan WBC dapat mengakibatkan gagal panen. Pada tahun 1976/1977, WBC menyerang lebih kurang 450.000 ha sawah dengan kerugian diperkirakan mencapai US\$ 100 juta (Oka dan Bahagiawati 1983).

Populasi WBC mudah beradaptasi dengan mengubah tingkat virulensinya menjadi biotipe atau populasi yang berbeda dengan biotipe atau populasi sebelumnya. Wabah WBC telah beberapa kali terjadi Indonesia, yaitu pada tahun 1974 biotipe 1 menyerang varietas unggul Pelita, tahun 1976 biotipe 2 menyerang varietas IR26, dan awal 1980-an biotipe Sumatra Utara menyerang varietas IR42 (Oka dan Bahagiawati 1984). Serangan WBC sempat mereda pada awal 1990-an, tetapi ancaman serangan hama ini perlu terus-menerus diwaspadai. Pada tahun 1998, WBC terbukti menyerang areal pertanaman padi di pulau Jawa dan menyebabkan kerusakan lebih dari 10.000 ha (Somantri 1998). Serangan WBC, yang diduga biotipe 3 dan 4, kembali terjadi pada tahun 2009/2010 pada puluhan ribu hektar padi sawah di pulau Jawa, terutama yang ditanami varietas IR64 dan Ciherang (Baehaki 2010).

Cara yang paling praktis dan ekonomis untuk menangani WBC di lapangan adalah dengan menanam varietas tahan (Brar et al. 2009). Dengan demikian, tantangan utama pemulia padi untuk ketahanan terhadap WBC adalah mengatasi perubahan yang sering terjadi pada biotipe atau populasi WBC, terlebih dalam konteks perubahan iklim (Brar et al. 2009). Tersedianya gen-gen ketahanan menjadi sangat krusial dalam perakitan varietas unggul baru tahan hama ini. Ribuan aksesori plasma nutfah padi telah ditapis di IRRI untuk ketahanan terhadap WBC biotipe 1, 2, dan 3 (Brar et al. 2009). Hu et al. (2018) melaporkan lebih dari 30 gen ketahanan terhadap WBC telah diidentifikasi pada tanaman padi. Beberapa gen yang bertanggung jawab terhadap ketahanan tanaman padi bahkan telah diidentifikasi dan diketahui mekanisme kerjanya, di antaranya *Bph3* (Liu et al. 2015), *Bph6* (Guo et al. 2018), dan *Bph14* (Du et al. 2009). Jena et al. (2017) telah

memanfaatkan 10 gen ketahanan terhadap WBC untuk mengembangkan 25 *near-isogenic lines* (NILs) yang dapat digunakan sebagai sumber gen ketahanan dalam perbaikan genetika ketahanan tanaman padi.

Plasma nutfah padi di Indonesia cukup melimpah untuk eksplorasi gen-gen ketahanan baru terhadap WBC. Gen-gen ketahanan tersebut dapat diuji untuk mengidentifikasi gen yang paling efektif dalam mengatasi WBC yang berkembang di Indonesia. Selanjutnya, gen-gen tersebut dapat dipetakan lokasinya secara tepat dalam kromosom padi dengan menggunakan marka molekuler sehingga dapat digunakan dalam perakitan varietas baru tahan WBC berbasis marka atau untuk identifikasi dan isolasi gen secara lebih detail. Hasil pengujian yang dilakukan terhadap beberapa aksesori plasma nutfah padi lokal Indonesia menunjukkan varietas Untup Rajab memiliki ketahanan terhadap dua populasi WBC dari lapangan, asal Bekasi (populasi S1) dan Sulawesi Selatan (populasi X1), yang memiliki tingkat virulensi berbeda (Yunus et al. 2017). Tujuan penelitian ini adalah memetakan gen ketahanan terhadap WBC pada varietas Untup Rajab. Penelitian ini merupakan upaya pertama untuk memetakan gen ketahanan terhadap WBC pada varietas padi lokal Indonesia.

BAHAN DAN METODE

Bahan Penelitian

Materi genetik yang digunakan dalam analisis genotipe adalah 115 individu tanaman populasi F₂ beserta TN-1 dan Untup Rajab sebagai tetua persilangannya (Yunus et al. 2017). TN-1 dikenal sebagai varietas padi yang tidak memiliki gen ketahanan terhadap WBC. Benih F₃ yang berasal dari setiap individu tanaman F₂ (galur F_{2,3}) beserta kedua tetua dan PTB33 (varietas pembandingan tahan) digunakan dalam uji ketahanan terhadap populasi WBC (S1 dan X1) yang secara berurutan diketahui memiliki tingkat virulensi rendah dan tinggi (Chaerani et al. 2016). Populasi S1 dipelihara dan diperbanyak pada varietas Manohara, sedangkan populasi X1 pada varietas Ciliwung.

Pengujian Ketahanan Tanaman terhadap Populasi WBC Lapangan

Pengujian ketahanan tanaman terhadap WBC menggunakan metode *Bulk Seedling Test* (Baehaki 2012). Pengujian dimulai dengan tahap peneluran dari imago betina bunting, dibiarkan selama 2–3 malam pada tanaman pakan di dalam kurungan. Jumlah imago betina bunting dan tanaman pakan yang di-

gunakan disesuaikan dengan keperluan pengujian. Telur yang telah diletakkan di dalam tanaman dipelihara hingga menetas menjadi nimfa WBC instar 2–3. Benih $F_{2:3}$, kedua tetua, dan kontrol tahan PTB33 yang telah dikecambahkan selama 3 hari di dalam cawan petri ditanam pada larikan di dalam bak-bak berisi lumpur tanah sebanyak 20 kecambah per larikan. Kedua tetua dan PTB33 masing-masing ditanam dalam satu larikan, di kedua sisi dan tengah bak. Tujuh sampai 10 hari setelah ditanam, bibit diinfestasi dengan ± 8 ekor nimfa WBC instar 2–3 per tanaman dengan *dikeprik* secara merata.

Skor kerusakan tanaman diamati setiap hari dan skor terakhir dicatat pada saat $\geq 90\%$ tanaman varietas kontrol rentan (TN-1) mati. Kriteria skor ketahanan terhadap WBC mengikuti metode Sun et al. (2005) dan Kumari et al. (2010) sebagaimana disajikan pada Tabel 1. Pengujian ketahanan populasi $F_{2:3}$ terhadap populasi S1 dilakukan sebanyak tiga ulangan, sedangkan terhadap populasi X1 dilakukan sebanyak dua ulangan. Luasan area di bawah kurva skor ketahanan selama pengamatan (*area under disease progression curve/AUDPC*) dikalkulasikan sesuai metode yang diuraikan oleh Madden et al. (2017).

Isolasi DNA Genomik Tanaman

Daun diambil dari tiap individu tanaman populasi F_2 dan kedua tetua persilangan, kemudian DNA diisolasi dengan menggunakan metode Dellaporta et al. (1983). DNA hasil isolasi diukur konsentrasinya dengan *NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific, AS). Konsentrasi DNA dilarutkan menjadi 50 ng/ μ l untuk keperluan analisis genotipe.

Analisis Genotipe Populasi F_2

Analisis genotipe berdasarkan manual *Infinium® II Assay* (Illumina, AS) menggunakan marka SNP pada *RiceLD SNP Chip* yang memiliki lebih dari 7.000 marka SNP. Proses analisis dimulai dengan mengamplifikasi sampel DNA semalaman. DNA yang telah diamplifikasi difragmentasi menggunakan proses yang dikendalikan secara enzimatik. DNA yang ter-

fragmentasi selanjutnya dipresipitasi menggunakan alkohol dan diresuspensi. *BeadChip* disiapkan untuk proses hibridisasi pada *capillary flow-through chamber*. Sampel DNA kemudian dihibridisasi pada *BeadChip* dan diinkubasi semalaman. Setiap DNA berikatan secara kovalen dengan potongan-potongan 50-mer spesifik lokus yang terkait dengan satu *beadtype* yang bersesuaian dengan tiap alel per lokus SNP. Selanjutnya, dilakukan tahap ekstensi/pemanjangan dan pewarnaan secara fluoresensi. Intensitas fluoresensi tiap *bead* dideteksi dan dianalisis menggunakan perangkat lunak dari Illumina untuk mendapatkan data genotipe dari tiap marka SNP. Marka-marka SNP yang polimorfik untuk kedua tetua dengan kualitas tinggi diidentifikasi dan digunakan untuk mengidentifikasi genotipe tiap individu tanaman F_2 . Data genotipe tersebut digunakan dalam analisis peta gen ketahanan terhadap WBC.

Pemetaan Gen Ketahanan Tanaman terhadap WBC

Data genotipe marka SNP yang dihasilkan dari populasi F_2 dan data fenotipe ketahanan terhadap WBC dari pengujian populasi $F_{2:3}$ digunakan untuk menganalisis letak gen yang memberikan kontribusi terhadap sifat ketahanan tanaman padi terhadap WBC. Peta genetik dibuat dengan menggunakan 885 marka yang polimorfik pada populasi F_2 dengan perangkat lunak *QTL IciMapping* (Meng et al. 2015). Lokasi fisik tiap-tiap marka pada kromosom ditambahkan sebagai *anchor* dan pemetaan dilakukan dengan pengaturan parameter sebagai berikut: *mapping function* Kosambi, *grouping* dengan *logarithm of the odds* (LOD) 3.0, *ordering* dengan *nearest neighbor two-opt* (nnTwoOpt), dan *rippling* dengan *sum of adjacent recombination fractions* (SARF) dan *window size* = 5. Identifikasi gen dan *quantitative trait locus* (QTL) dilakukan dengan menggunakan *Inclusive Composite Interval Mapping* (ICIM-ADD) dari perangkat lunak *QTL IciMapping* dengan pengaturan parameter sebagai berikut: *delete missing data*, *scanning step* 1 cM, *probability in stepwise regression* (PIN) 0001, dan *LOD threshold* 2.5.

Tabel 1. Kriteria skor ketahanan padi terhadap wereng batang cokelat (WBC) (Sun et al. 2005; Kumari et al. 2010).

Skor ketahanan	Gejala kerusakan	Tingkat ketahanan
0	Tidak ada daun yang menyusut dan tanaman sehat	Tahan (T)
1	Satu daun menguning	Tahan (T)
3	Satu sampai dua daun menguning atau satu daun menyusut	Agak tahan (AT)
5	Satu sampai dua daun menyusut atau satu daun mengerut	Agak tahan (AT)
7	Tiga sampai empat daun menyusut atau dua sampai empat daun mengerut, tanaman masih hidup	Rentan (R)
9	Tanaman mati	Rentan (R)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Virulensi Populasi WBC Uji dan Ketahanan Varietas Pembanding

Kerusakan tanaman akibat serangan dari kedua populasi WBC uji memiliki pola peningkatan yang berbeda dengan berjalannya waktu (Gambar 1A dan 1B). Serangan populasi X1 terlihat lebih cepat menimbulkan gejala kerusakan dibanding dengan populasi S1 terhadap varietas TN-1 sejak hari pertama pengamatan. Waktu yang diperlukan kedua populasi WBC untuk mematikan $\geq 90\%$ tanaman varietas TN-1 berkisar antara 3–7 hari. Nilai AUDPC pada TN-1 setelah diinfestasi dengan populasi X1 mencapai 9,34; lebih tinggi daripada yang diperoleh pada populasi S1 (7,83). Hal ini menunjukkan bahwa populasi X1 lebih virulen terhadap TN-1 daripada populasi S1 dan hasil ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Chaerani et al. (2016).

Hasil yang berbeda teramati pada PTB33, yaitu populasi S1 justru terlihat relatif lebih virulen dibanding dengan populasi X1 (Gambar 1). Nilai AUDPC oleh populasi S1 adalah sebesar 2,38 yang tidak berbeda jauh dengan nilai AUDPC oleh populasi X1, yaitu 2,42. Namun jika AUDPC pada PTB-33 dinormalisasi terhadap AUDPC pada TN-1, nilainya berturut-turut adalah 25,8% dan 30,4% untuk populasi X1 dan S1. Hasil ini berbeda dengan yang dilaporkan oleh Chaerani et al. (2016) yang menunjukkan populasi X1 lebih virulen terhadap PTB33 daripada populasi S1.

Pada Untup Rajab, populasi S1 juga lebih virulen dibanding dengan populasi X1. Skor terakhir untuk populasi S1 lebih dari 5, sedangkan untuk populasi X1 skor 3 (Gambar 1A dan 1B). Nilai absolut AUDPC oleh populasi X1 lebih tinggi (4,71) dibanding dengan populasi S1 (4,12). Namun, jika dinormalisasi terhadap nilai AUDPC TN-1, populasi S1 sedikit lebih virulen daripada populasi X1 (52,7% versus 50,4%). Pada penelitian sebelumnya, populasi S1 lebih virulen terhadap varietas Untup Rajab daripada populasi X1, meskipun dengan tingkat ketahanan yang lebih tinggi, yaitu skor 3 dan 1 berturut-turut untuk populasi X1 dan S1 (Yunus et al. 2015).

Perbedaan hasil kedua penelitian tersebut kemungkinan disebabkan oleh kondisi lingkungan pengujian yang berbeda sehingga berpengaruh terhadap aksi populasi WBC. Yadav et al. (2010) menunjukkan bahwa perkembangan WBC dipengaruhi oleh temperatur dan kelembaban lingkungannya. Sejalan dengan itu, Wang et al. (2010) melaporkan bahwa kenaikan suhu dapat menurunkan tingkat ketahanan tanaman padi terhadap WBC.

TN-1 merupakan varietas yang paling tinggi skor kerusakannya akibat serangan WBC dikarenakan varietas ini memang dikenal tidak memiliki gen ketahanan terhadap WBC (Habibuddin 1989; Liu et al. 2009; Qiu et al. 2011). Varietas TN-1 biasa digunakan sebagai kontrol rentan dalam pengujian ketahanan tanaman padi terhadap WBC. Untup Rajab sebagai tetua sumber gen ketahanan yang akan dipetakan lokasi gen ketahanannya memiliki tingkat ketahanan lebih moderat dengan skor secara berurutan 3 dan 5,4 terhadap populasi X1 dan S1. Tingkat ketahanan ini lebih rendah daripada hasil penelitian sebelumnya oleh Yunus et al. (2015) yang memperoleh skor 1 dan 3 berturut-turut untuk populasi X1 dan S1. Sebagaimana yang dijelaskan sebelumnya, perbedaan tingkat ketahanan ini mungkin disebabkan perkembangan WBC yang dipengaruhi oleh kondisi lingkungan yang berbeda (Yadav et al. 2010) dan peningkatan suhu dapat menurunkan ketahanan tanaman padi terhadap serangan WBC (Wang et al. 2010). PTB33 selama ini dikenal memiliki tingkat ketahanan yang paling tinggi terhadap WBC dengan skor kerusakan 1,9 dan 1,8 secara berurutan untuk populasi S1 dan X1. Varietas ini biasa digunakan sebagai kontrol ketahanan dalam pengujian ketahanan tanaman padi terhadap WBC. Tingkat ketahanan PTB33 yang tinggi terhadap WBC diduga karena varietas tersebut memiliki lebih dari dua gen ketahanan (Santhanalakshmi et al. 2010; Bhanu et al. 2014; Baehaki dan Iswanto 2017). Urutan tingkat ketahanan ketiga varietas terhadap populasi WBC uji tersebut seperti yang diharapkan (Yunus et al. 2015).

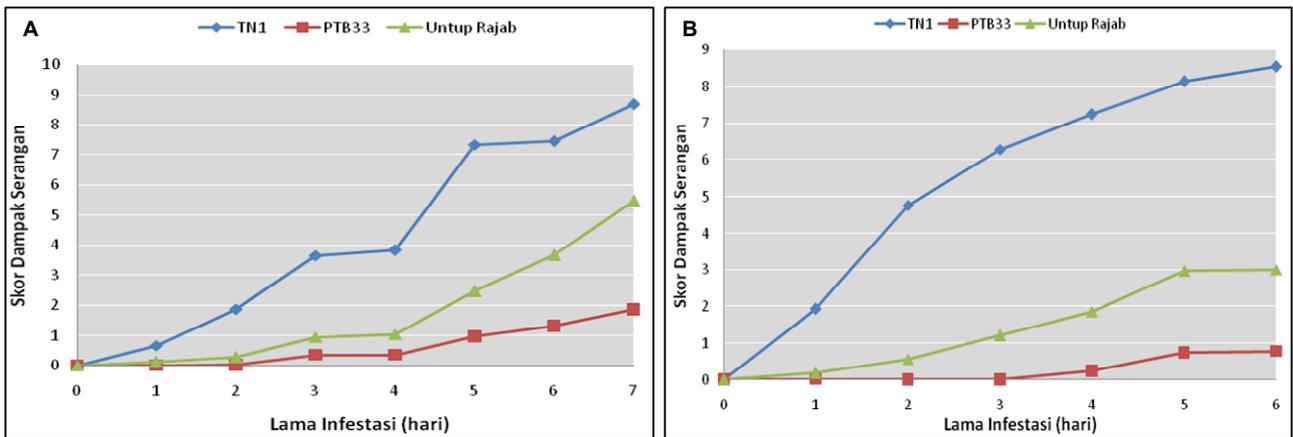
Uji Fenotipe Populasi $F_{2:3}$

Skor ketahanan terhadap WBC pada 115 galur $F_{2:3}$ yang diinfestasi dengan populasi S1 relatif menyebar normal pada kisaran skor 0–9 dengan pengecualian skor 7 di sebelah kanan kurva sebaran yang memiliki jumlah individu yang relatif lebih tinggi (Gambar 2A). Demikian pula, skor ketahanan hasil infestasi dengan populasi X1 relatif menyebar normal dengan kisaran skor 2–9, meskipun dengan kurva yang relatif sedikit mengarah ke arah skor rentan (Gambar 2B). Segregasi yang cenderung menyebar normal ini mengindikasikan kemungkinan sifat kuantitatif (QTL) yang mengatur ketahanan terhadap WBC pada Untup Rajab. Pola sebaran hasil uji ini berbeda dengan yang diperoleh oleh Sun et al. (2005) dan Jairin et al. (2006), yaitu distribusi frekuensi galur yang diinfestasi dengan WBC terlihat kontinyu (mendatar) dengan beberapa puncak di antaranya. Sun et al. (2005) dalam analisisnya mengelompokkan hasil uji fenotipe tersebut ke dalam pola segregasi homo-

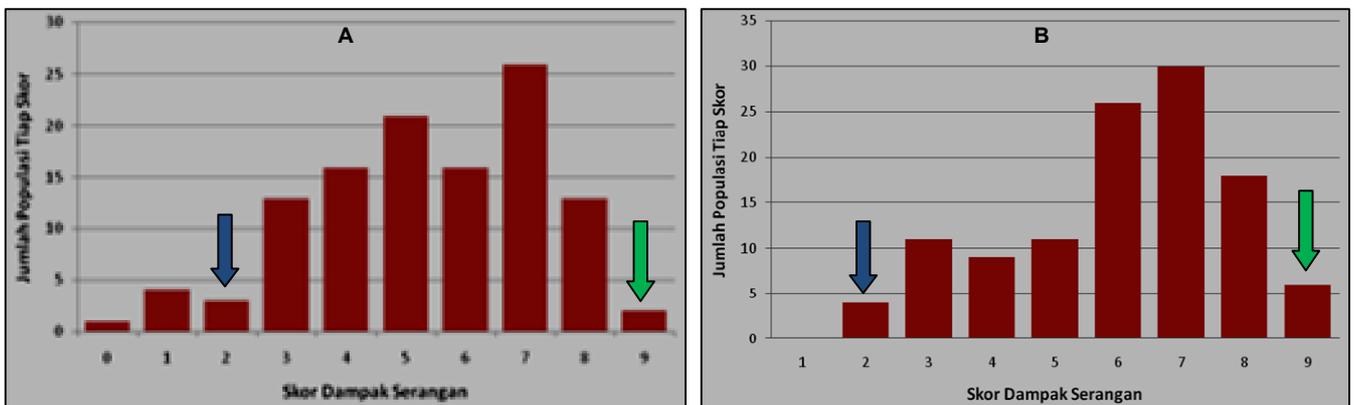
zigot tahan, heterozigot, dan homozigot rentan dengan proporsi yang sesuai dengan rasio 1:2:1 dan berhasil memetakan lokus gen *Bph17*. Sementara, Jairin et al. (2006) mengelompokkan hasil uji fenotipe menjadi tahan dan tidak tahan dengan perbandingan 3:1 karena menduga adanya aksi gen dominan berdasarkan analisis fenotipe tanaman F₁ dan berhasil memetakan lokus gen *Bph3*. Hasil penelitian lain yang dilaporkan oleh Yang et al. (2012) dalam memetakan lokus gen *Bph20* dan *Bph21* memperlihatkan hasil uji fenotipe yang sebarannya tinggi di bagian rentan yang kemudian dikelompokkan ke dalam dua grup dengan skor 1–5 sebagai tahan dan 7–9 rentan dengan perbandingan 1:15. Hal berbeda dilaporkan oleh Liu et al. (2009), yang juga dilakukan dalam penelitian ini, yaitu skor ketahanan tidak dikelompokkan dalam rasio segregasi tertentu, melainkan langsung menggunakan data fenotipe untuk memetakan lokasi kromosom yang menyumbangkan ketahanan terhadap WBC.

Konstruksi Peta Genetik Marka SNP

Peta pautan dibuat berdasarkan marka SNP yang polimorfik dari *RiceLD SNP Chip* yang mengandung 7.098 marka dengan 115 individu F₂ dari persilangan TN-1 dengan Untup Rajab. Hasil analisis menunjukkan hanya 6.658 marka yang terbaca dari 7.098 marka SNP yang dianalisis. Marka polimorfik diidentifikasi dengan membandingkan tiap marka SNP pada kedua tetua persilangan, dengan nukleotida yang berbeda di antara kedua tetua dinyatakan sebagai marka polimorfik. Sebanyak 885 marka polimorfik terpetakan pada 12 kromosom padi dengan rata-rata 73 marka untuk tiap kromosom. Marka tidak menyebar rata pada tiap kromosom, dengan kisaran terendah 37 marka pada kromosom 5 dan tertinggi 122 marka pada kromosom 1. Panjang peta genom keseluruhan adalah 4.136,09 cM dengan jarak antarmarka rata-rata 4,6 cM dan densitas 0–68,6 cM per marka. Pengelompokan marka pada tiap kromosom disesuaikan dengan letak marka pada



Gambar 1. Pola serangan populasi wereng batang cokelat (WBC) pada varietas TN-1, PTB33, dan Untup Rajab. (A) Populasi WBC S1, (B) Populasi WBC X1.



Gambar 2. Distribusi frekuensi skor ketahanan galur F_{2:3} pada 115 individu F₂ hasil persilangan TN-1 dengan Untup Rajab pada pengujian dengan populasi wereng batang cokelat (WBC). (A) Populasi WBC S1. (B) Populasi WBC X1. Panah biru menunjukkan skor tetua tahan (Untup Rajab), sedangkan panah hijau menunjukkan skor tetua rentan (TN-1).

peta fisik marka-marka tersebut (Kawahara et al. 2013). Sebagai perbandingan, untuk identifikasi gen ketahanan terhadap WBC, Sun et al. (2005) membuat peta pautan dengan menggunakan 124 marka SSR yang meliputi 1.499,1 cM dengan jarak antarmarka rata-rata 12,09 cM. Sementara itu, pada peta pautan yang dikonstruksi oleh Liu et al. (2009) digunakan 117 marka SSR yang meliputi 1.389,9 cM untuk 12 kromosom dengan jarak antarmarka rata-rata 11,9 cM. Peta pautan yang dihasilkan pada penelitian ini menggunakan marka lebih banyak dibanding dengan penelitian lainnya. Hal ini merupakan konsekuensi dari hasil analisis polimorfisme marka pada *chip* yang mengandung lebih dari 7.000 marka SNP, dengan sekitar 10% marka polimorfik. Dengan demikian, densitas marka dalam kromosom lebih tinggi dan jarak fisik antarmarka menjadi lebih dekat, tetapi jarak pautan total dalam cM menjadi lebih panjang.

Identifikasi Lokus Gen Ketahanan terhadap WBC

Analisis QTL dengan batas LOD 2,5 dan tingkat signifikan 0,001 mendeteksi empat lokus untuk ketahanan terhadap WBC (Gambar 3 dan Tabel 2). Dari empat lokus yang terdeteksi, dua berasal dari pengujian ketahanan menggunakan populasi X1 dan sisanya dari pengujian dengan populasi S1. Lokus pertama yang terdeteksi pada pengujian dengan populasi X1 terletak pada kromosom 8 pada posisi 61 cM, posisi basa 24.205.833–26.038.950, dan marka pengapit 8990744–8938168 dengan nilai LOD 5,24 dan *phenotypic variation explained*/sumbangan terhadap variasi fenotipe (PVE) 17,66%. Lokus kedua terdeteksi pada kromosom 11 dengan posisi 92 cM, posisi basa 8.073.231–9.004.576, dan marka pengapit SNP-11.8068975–SNP-11.8999188 dengan nilai LOD 2,63 dan PVE 3,05%. Sementara untuk populasi S1, lokus pertama terdeteksi pada kromosom 5 dengan posisi 206 cM, posisi basa 28.130.268–28.563.271, dan marka pengapit 5762361–SNP-5.28500625 dengan nilai LOD 2,69 dan PVE 7,63%. Lokus kedua terletak pada kromosom 6 dengan posisi 222 cM, posisi basa 22.969.778–24.219.798, dan marka pengapit 6702537–6746843 dengan nilai LOD 2,60 dan PVE 9,40%.

Lokus-lokus yang diidentifikasi pada penelitian ini memiliki nilai PVE yang relatif rendah dengan kisaran 3,05–17,66%. Nilai ini menunjukkan ketahanan terhadap WBC pada varietas Untup Rajab bersifat kuantitatif, yaitu tidak ada gen tunggal yang dominan yang mengendalikan sifat ketahanan, melainkan banyak gen dengan efek relatif kecil yang mengontrol sifat ketahanan. Hasil serupa diperoleh oleh Liu et al. (2009) yang mengidentifikasi empat lokus dari persilangan varietas tahan Yagyaw dengan varietas rentan Cpslo17 yang memberikan efek pada ketahanan terhadap WBC dengan kisaran PVE rendah (5,64–12,77%) yang digolongkan sebagai QTL.

Hasil berbeda dilaporkan oleh Sun et al. (2005) yang dapat mengidentifikasi satu lokus gen ketahanan utama yang berasal dari varietas Rathu Heenati yang dinamai *Bph17* dengan nilai LOD dan PVE yang signifikan, berturut-turut 63,7 dan 83,9% pada kromosom 4 di antara marka RM8213 dan RM5953. Demikian pula, Jena et al. (2006) dapat memetakan satu gen tahan dari galur IR65482-7-216-2 pada kromosom 12 di antara marka RM463 dan S15552 yang memiliki nilai PVE signifikan 37–44%. Gen ini kemudian diusulkan sebagai *Bph18(t)*.

Gen yang bersifat kuantitatif atau yang dikendalikan oleh banyak gen dengan kontribusi masing-masing gen kecil memiliki peranan yang penting dalam mengendalikan ketahanan karena pada umumnya diduga dapat bertahan lebih lama dibanding dengan yang dikendalikan oleh satu gen (Heinrichs 1986). Akan tetapi, perakitan varietas untuk perbaikan sifat kuantitatif akan lebih sulit dilakukan mengingat banyak gen yang harus digabungkan. Keberadaan marka molekuler dalam kasus semacam ini akan sangat membantu dalam perakitan tanaman.

Lokus QTL yang berada pada kromosom 8 dan 5, yang secara berurutan terdeteksi untuk populasi X1 dan S1, memiliki nilai aditif negatif yang menunjukkan bahwa lokus-lokus tersebut memiliki kontribusi meningkatkan ketahanan terhadap WBC dengan menurunkan skor kerusakan. Sementara, lokus-lokus pada kromosom 11 dan 6, yang secara berurutan

Tabel 2. Lokus ketahanan/QTL terhadap wereng batang coklat (WBC) populasi X1 dan S1 pada progeni F₂ hasil persilangan TN-1 dengan Untup Rajab.

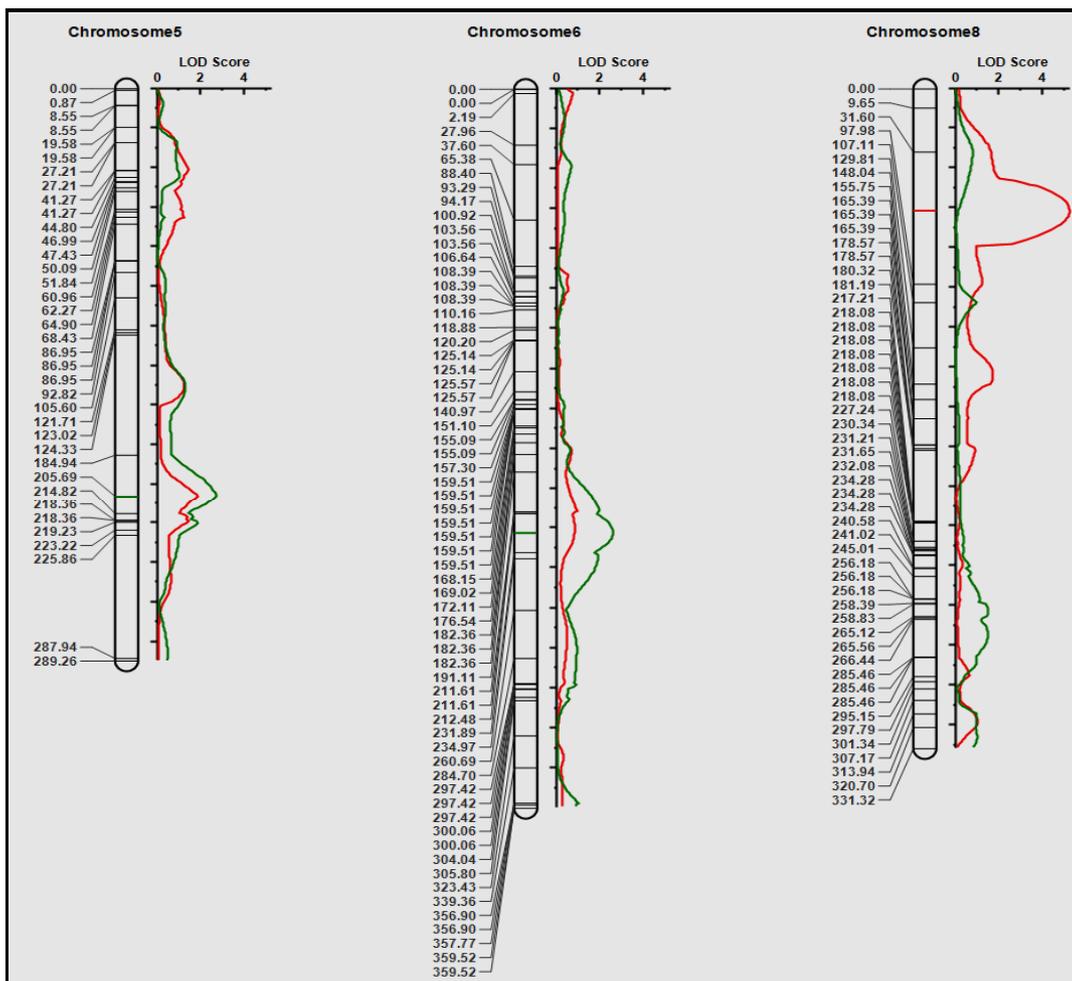
Populasi WBC	Kromosom	Posisi (cM)	Posisi (basa)	Marka kiri	Marka kanan	LOD	PVE (%)	Add	Dom
X1	8	61	24.205.833–26.038.950	8990744	8938168	5,24	17,66	-1,63	1,81
X1	11	92	8.073.231–9.004.576	SNP-11.8068975	SNP-11.8999188	2,63	3,05	0,51	0,71
S1	5	206	28.130.268–28.563.271	5762361	SNP-5.28500625	2,69	7,63	-0,64	-0,55
S1	6	222	22.969.778–24.219.798	6702537	6746843	2,60	9,40	0,53	0,99

LOD = *logarithm of the odds*, PVE = *phenotypic variation explained*, Add = *additive effect of allele substitution*, Dom = *dominant effect of allele substitution*.

terdeteksi untuk populasi X1 dan S1, menunjukkan sebaliknya. QTL yang memiliki nilai efek aditif negatif mengindikasikan bahwa alel tahan berasal dari tetua tahan, sedangkan QTL yang memiliki nilai efek aditif positif mengindikasikan sebaliknya (Liu et al. 2009).

Penelitian ini menunjukkan adanya lokus-lokus yang berbeda yang mengendalikan ketahanan tanaman padi terhadap populasi WBC uji yang digunakan. Untup Rajab diduga memiliki ekspresi gen ketahanan yang berbeda ketika diserang oleh populasi WBC yang berbeda sehingga berpotensi baik untuk di-gunakan sebagai sumber ketahanan dalam perakitan varietas padi baru. Varietas-varietas yang memiliki gen ketahanan berbeda terhadap WBC telah banyak diketahui, seperti varietas PTB33 yang memiliki tiga gen (Santhanalakshmi et al. 2010) dan dikenal sangat tahan terhadap WBC, serta varietas ADR52 yang me-miliki gen *Bph25* dan *Bph26* (Myint et al. 2012).

Identifikasi gen atau QTL yang berada pada segmen marka pengapit atau di dekat lokus-lokus yang telah terpetakan sebelumnya dilakukan dengan menggunakan fasilitas pada situs web *Q-TARO Gene Browser* (<http://qtaro.abr.affrc.go.jp>). Pada kromosom 8, diidentifikasi satu gen pada segmen lokus ketahanan terhadap WBC dengan posisi fisik pada genom padi 25.304.465–25.312.083. Gen tersebut bernama *herbivore-induced rice type 2 13-LOX (OsHI-LOX)* yang memiliki fungsi untuk ketahanan terhadap *rice striped stem borer* dan WBC. Gen ini berkorelasi dengan konsentrasi H₂O₂ yang tinggi dan asam salisilat yang diinduksi oleh WBC dan peningkatan respons hipersensitivitas kematian sel (Zhou et al. 2009). Selain itu, satu QTL hasil pemetaan dari persilangan Taichung 65 dengan *Oryza rufipogon* Griff. (W1962) yang memiliki fungsi ketahanan terhadap wereng hijau teridentifikasi berada di dekat lokus ketahanan terhadap WBC dengan posisi fisik 26.582.935–27.651.023 di genom padi yang diapit marka SSR RM502–RM6845.



Gambar 3. Peta lokus ketahanan/QTL terhadap wereng batang coklat (WBC) populasi X1 (merah) dan S1 (hijau) pada progeni F₂ hasil persilangan TN-1 dengan Untup Rajab.

Pada lokus ketahanan terhadap WBC di kromosom 6, dua gen teridentifikasi berada di dekatnya, yaitu gen *phospholipases D α4 (OsPLDα4)* dan *phospholipases D α5 (OsPLDα5)*, yang berturut-turut berlokasi pada posisi 24.785.921–24.790.804 dan 24.798.943–24.801.922 pada genom padi. Kedua gen tersebut memiliki fungsi ketahanan terhadap *rice striped stem borer* dan WBC. Kedua gen tersebut mengatur aliran sinyal *oxylipin* dan etilen yang menghasilkan respons pertahanan yang efektif, baik secara langsung maupun tidak langsung, terhadap induksi oleh herbivora (Qi et al. 2011). Sementara itu, di sekitar lokus ketahanan terhadap WBC di kromosom 5 dan 11 tidak diperoleh informasi adanya gen atau QTL yang berhubungan dengan ketahanan terhadap WBC. Dengan demikian, peluang untuk memperoleh gen atau QTL baru ketahanan terhadap WBC sangat terbuka untuk kedua lokus tersebut dan dapat digunakan untuk mengetahui mekanisme gen ketahanan baru yang nantinya dapat dimanfaatkan dalam program pemuliaan berbasis persilangan atau melalui rekayasa genetika.

KESIMPULAN

Varietas Untup Rajab memiliki ketahanan yang bersifat kuantitatif terhadap dua populasi WBC dengan lokus-lokus ketahanan yang berbeda untuk tiap populasi WBC uji. Dari empat lokus yang teridentifikasi, dua lokus di antaranya bersinggungan dengan gen ketahanan terhadap WBC yang telah diketahui sebelumnya. Untuk dua lokus lainnya belum terdapat informasi mengenai adanya gen ketahanan lain yang teridentifikasi sehingga berpotensi menjadi gen baru yang dapat digunakan untuk penelitian mekanisme gen ketahanan baru. Gen tersebut nantinya dapat dimanfaatkan dalam program pemuliaan berbasis persilangan atau melalui rekayasa genetika.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai dari anggaran DIPA BB Biogen TA 2017. Penulis menyampaikan terima kasih kepada Fajar Suryawan, Rudi Mahmudin, Moch. Irfan, M. Saputro, dan Riko Harmando yang telah memberikan bantuan teknis dalam pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Baehaki, S.E. (2010) Perubahan biotipe wereng cokelat pada beberapa sentra produksi padi di Indonesia. Dalam: *Prosiding Seminar Nasional V, Pemberdayaan Keanekaragaman Serangga untuk Peningkatan*

Kesejahteraan Masyarakat. Perhimpunan Entomologi Indonesia. hlm. 53–62.

- Baehaki, S.E. (2012) Standar operasional prosedur pengujian galur dan varietas padi terhadap wereng batang cokelat (*Nilaparvata lugens*). Jakarta, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian.
- Baehaki, S.E. & Iswanto, E.H. (2017) The filtering of rice resistance and population buildup to determine antibiosis and tolerance as characteristics of rice resistance to brown planthopper biotype 3. *American Journal of Engineering Research*. [Online] 6 (3), 188–196. Available from: [http://www.ajer.org/papers/v6\(03\)/ZE0603188196.pdf](http://www.ajer.org/papers/v6(03)/ZE0603188196.pdf) [Accessed 28 June 2018].
- Bhanu, K.V., Lakshmi, V.J., Katti, G. & Reddy, A.V. (2014) Antibiosis and tolerance mechanisms of resistance in rice varieties carrying brown planthopper resistance genes. *Asian Journal of Biological and Life Sciences*, 3 (2), 108–113.
- Brar, D.S., Virk, P.S., Jena, K.K. & Khush, G.S. (2009) Breeding for resistance to planthoppers in rice. In: Heong, K.L. & Hardy, B. (eds.) *Planthoppers: New threats to the sustainability of intensive rice production systems in Asia*. International Rice Research Institute Los Baños, Philippines, 401–409.
- Chaerani, Damayanti, D., Trisnarningsih, Yuriyah, S., Kusumanegara, K., Dadang, A., Sutrisno & Bahagiawati (2016) Virulence of brown planthopper and development of core collection of the pest. *Jurnal Penelitian Tanaman Pangan*, 35 (2), 109–118.
- Dellaporta, S., Wood, J. & Hicks, J. (1983) A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1, 19–21.
- Du, B., Zhang, W., Liu, B., Hu, J., Wei, Z., Shi, Z., He, R., Zhu, L., Chen, R., Han, B. & He, G. (2009) Identification and characterization of *Bph14*, a gene conferring resistance to brown planthopper in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. [Online] 106 (52), 22163–22168. Available from: doi:10.1073/pnas.0912139106 [Accessed 28 June 2018].
- Guo, J., Xu, C., Wu, D., Zhao, Y., Qiu, Y., Wang, X., Ouyang, Y., Cai, B., Liu, X., Jing, S., Shanguan, X., Wang, H., Ma, Y., Hu, L., Wu, Y., Shi, S., Wang, W., Zhu, L., Xu, X., Chen, R., Feng, Y., Du, B. & He, G. (2018) *Bph6* encodes an exocyst-localized protein and confers broad resistance to planthoppers in rice. *Nature Genetics*. [Online] 50 (2), 297–306. Available from: doi:10.1038/s41588-018-0039-6 [Accessed 10 June 2018].
- Habibuddin, H. (1989) Variation of brown planthopper population from major rice regions of Peninsular Malaysia. *MARDI Research Journal*, 17 (2), 218–224.
- Heinrichs, E.A. (1986) Perspectives and directions for the continued development of insect-resistant rice varieties. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. [Online] 18 (1), 9–36. Available from: doi:10.1016/0167-8809(86)90172-6 [Accessed 22 June 2018].

- Hu, J., Chang, X., Zou, L., Tang, W. & Wu, W. (2018) Identification and fine mapping of *Bph33*, a new brown planthopper resistance gene in rice (*Oryza sativa* L.). *Rice*. [Online] 11 (1), 55. Available from: doi:10.1186/s12284-018-0249-7 [Accessed 6 November 2018].
- Jairin, J., Phengrat, K., Teangdeerith, S., Vanavichit, A. & Toojinda, T. (2006) Mapping of a broad-spectrum brown planthopper resistance gene, *Bph3*, on rice chromosome 6. *Molecular Breeding*. [Online] 19 (1), 35–44. Available from: doi:10.1007/s11032-006-9040-3 [Accessed 26 June 2018].
- Jena, K.K., Jeung, J.U., Lee, J.H., Choi, H.C. & Brar, D.S. (2006) High-resolution mapping of a new brown planthopper (BPH) resistance gene, *Bph18(t)*, and marker-assisted selection for BPH resistance in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. [Online] 112, 288–297. Available from: doi:10.1007/s00122-005-0127-8 [Accessed 26 June 2018].
- Jena, K.S., Hechanova, S.L., Verdeprado, H., Prahalada, G.D. & Kim, S.R. (2017) Development of 25 near-isogenic lines (NILs) with ten BPH resistance genes in rice (*Oryza sativa* L.): Production, resistance spectrum, and molecular analysis. *Theoretical and Applied Genetics*. [Online] 130 (11), 2345–2360. Available from: doi:10.1007/s00122-017-2963-8 [Accessed 26 June 2018].
- Kawahara, Y., de la Bastide, M., Hamilton, J.P., Kanamori, H., McCombie, W.R., Ouyang, S., Schwartz, D.C., Tanaka, T., Wu, J., Zhou, S. & Childs, K.L. (2013) Improvement of the *Oryza sativa* Nipponbare reference genome using next generation sequence and optical map data. *Rice*. [Online] 6 (1), 4. Available from: doi:10.1186/1939-8433-6-4 [Accessed 22 October 2018].
- Kumari, S., Sheba, J.M., Marappan, M., Ponnuswamy, S., Seetharaman, S., Pothi, N., Subbarayalu, M., Muthurajan, R. & Natesa, S. (2010) Screening of IR50 × Rathu Heenati F7 RILs and identification of SSR markers linked to brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål) resistance in rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular Biotechnology*, 46, 63–71.
- Liu, Y., Su, C., Jiang, L., He, J., Wu, H., Peng, C. & Wan, J. (2009) The distribution and identification of brown planthopper resistance genes in rice. *Hereditas*. [Online] 146 (2), 67–73. Available from: doi:10.1111/j.1601-5223.2009.02088.x [Accessed 22 October 2018].
- Liu, Y., Wu, H., Chen, H., Liu, Y., He, J., Kang, H., Sun, Z., Pan, G., Wang, Q., Hu, J., Zhou, F., Zhou, K., Zheng, X., Ren, Y., Chen, L., Wang, Y., Zhao, Z., Lin, Q., Wu, F., Zhang, X., Guo, X., Cheng, X., Jiang, L., Wu, C., Wang, H. & Wan, J. (2015) A gene cluster encoding lectin receptor kinases confers broad-spectrum and durable insect resistance in rice. *Nature Biotechnology*. [Online] 33 (3), 301–307. Available from: doi:10.1038/nbt.3069 [Accessed 26 June 2018].
- Madden, L.V., Hughes, G. & van den Bosch, F. (2017) Chapter 4: Temporal analysis I: Quantifying and comparing epidemics. In: Madden, L.V., Hughes, G. & van den Bosch, F. (eds.) *The Study of Plant Disease Epidemics*. [Online] 63–116. Available from: doi:10.1094/9780890545058.004 [Accessed 21 June 2018].
- Meng, L., Li, H., Zhang, L. & Wang, J. (2015) QTL IciMapping: Integrated software for genetic linkage map construction and quantitative trait locus mapping in biparental populations. *The Crop Journal*. [Online] 3 (3), 269–283. Available from: doi:10.1016/j.cj.2015.01.001 [Accessed 22 September 2018].
- Myint, K.K.M., Fujita, D., Matsumura, M., Sonoda, T., Yoshimura, A. & Yasui, H. (2012) Mapping and pyramiding of two major genes for resistance to the brown planthopper (*Nilaparvata lugens* [Stål]) in the rice cultivar ADR52. *Theoretical and Applied Genetics*. [Online] 124 (3), 495–504. Available from: doi:10.1007/s00122-011-1723-4 [Accessed 22 September 2018].
- Oka, I.N. & Bahagiawati, A.H. (1983) Wereng coklat dan pengendaliannya dalam perspektif. Masalah dan hasil penelitian padi. Dalam: *Risalah Lokakarya Penelitian Padi*. Cibogo, Bogor, 22–24 Maret 1983. hlm. 87–101.
- Oka, I.N. & Bahagiawati, A.H. (1984) *Development and management of a new brown planthopper (Nilaparvata lugens Stål) biotype in North Sumatra, Indonesia*. [Online] Central Research Institute for Food Crops, Bogor, Indonesia. Contribution 71, 14 pp. Available from: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19860532793> [Accessed 22 September 2018].
- Qi, J., Zhou, G., Yang, L., Erb, M., Lu, Y., Sun, X., Cheng, J. & Lou, Y. (2011) The chloroplast-localized phospholipases D α 4 and α 5 regulate herbivore-induced direct and indirect defenses in rice. *Plant Physiology*. [Online] 157 (4), 1987–1999. Available from: doi:10.1104/pp.111.183749 [Accessed 22 November 2018].
- Qiu, Y., Guo, J., Jing, S., Tang, T., Zhu, L. & He, G. (2011) Identification of antibiosis and tolerance in rice varieties carrying brown planthopper resistance genes. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. [Online] 141 (3), 224–231. Available from: doi:10.1111/j.1570-7458.2011.01192.x [Accessed 10 December 2018].
- Santhanalakshmi, S., Saikumar, S., Rao, S., SaiHarini, A., Khera, P., Shashidar, H.E. & Kardivel, P. (2010) Mapping genetic locus linked to BPH resistance in rice. *International Journal of Plant Breeding and Genetics*, 4 (1), 13–22.
- Somantri, I.H. (1998) Hama wereng coklat padi: Perkembangan biotipe, mekanisme dan genetika ketahanan varietas. *Buletin Agrobio*, 2 (1), 36–44.
- Sun, L., Su, S., Wang, C., Zhai, H. & Wan, J. (2005) Mapping of a major resistance gene to the brown planthopper in the rice cultivar Rathu Heenati. *Breeding Science*. [Online] 55 (4), 391–396. Available from: doi:10.1270/jsbbs.55.391 [Accessed 26 June 2018].

- Wang, B., Xu, H., Zheng, X., Fu, Q. & Lu, Z. (2010) high temperature modifies resistance performances of rice varieties to brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål). *Rice Science*. [Online] 17 (4), 334–338. Available from: doi:10.1016/S1672-6308(09)60036-6 [Accessed 22 November 2018].
- Yadav, D.S., Chander, S. & Selvaraj, K. (2010) Agro-ecological zoning of brown planthopper (*Nilaparvata lugens* [Stål]) incidence on rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Scientific and Industrial Research*, 69 (11), 818–822.
- Yang, L., Li, R.B., Li, Y.R., Huang, F.K., Chen, Y.Z., Huang, S.Sh., Huang, L.F., Liu, Ch., Ma, Z.F., Huang, D.H. & Jiang, J.J. (2012) Genetic mapping of *bph20(t)* and *bph21(t)* loci conferring brown planthopper resistance to *Nilaparvata lugens* Stål in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica*. [Online] 183 (2), 161–171. Available from: doi:10.1007/s10681-011-0437-7 [Accessed 22 September 2018].
- Yunus, M., Dadang, A., Warsun, A., Slamet, Damayanti, D., Chaerani, Dewi, I.S., Abdullah, B., Sutrisno & Bahagiawati, A.H. (2015) *Pemetaan genetik gen ketahanan terhadap wereng batang coklat*. Laporan Hasil Penelitian 2015. Bogor, BB Biogen.
- Yunus, M., Warsun, A., Slamet, Dadang, A., Damayanti, D., Kusumanegara, K., Dewi, I.S., Abdullah, B. & Bahagiawati, A.H. (2017) *Pemetaan genetik ketahanan terhadap wereng batang coklat*. Laporan Hasil Penelitian 2017. Bogor, BB Biogen.
- Zhou, G., Qi, J., Ren, N., Cheng, J., Erb, M., Mao, B. & Lou, Y. (2009) Silencing *OsHI-LOX* makes rice more susceptible to chewing herbivores, but enhances resistance to a phloem feeder. *Plant Journal*. [Online] 60 (4), 638–648. Available from: doi:10.1111/j.1365-3113.2009.03988.x [Accessed 5 September 2018].
-