

Pemuliaan Molekuler untuk Perakitan Varietas Unggul Baru Padi Gogo ‘Bio Patenggang Agritan’

(Molecular Breeding for Developing A New Upland Rice Variety ‘Bio Patenggang Agritan’)

Dwinita W. Utami^{1*}, Maulidia Rahmawati², Siti Yuriyah¹, Siti Nurani¹, Ahmad Dadang¹, dan Nurul Jadid²

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111 Indonesia
Telp. (0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820; *E-mail: dwinitawikan@pertanian.go.id, dnitawu@windowslive.com

²Departemen Biologi, Fakultas Sains, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Jl. Raya ITS, Surabaya 60111 Indonesia

Diajukan: 24 Oktober 2018; Direvisi: 13 Mei 2019; Diterima: 22 Mei 2019

ABSTRACT

Situ Patenggang is an elite upland rice variety well-accepted by farmers, but recently this variety started to be attacked by blast disease (*Pyricularia grisea*) that causes yield loss up to 50%. To overcome this problem, Bio Patenggang variety has been developed through molecular breeding using blast-resistant monogenic lines as donor parents. The aim of this research was to present molecular breeding approach of Bio Patenggang development, including steps from the phenotypic selection on candidate lines to the genotypic analysis assisted by molecular markers. The phenotypic performances were assessed using Distinctness, Uniformity, and Stability (DUS) testing by following the standard method stated in the rice test guidelines. The genotypic analyses were performed using foreground and background markers. Four BC₃F₇ lines were selected as the candidates of the Situ Patenggang-derived variety. Based on ANOVA and Principal Component Analysis (PCA), phenotypic performances of the four lines demonstrated no significant differences with that of Situ Patenggang. The selected lines have also passed the foreground analysis confirming that the lines contained *Pita*, *Pii*, *Pik-p*, and *Pia* last resistance genes. Background analysis showed that the selected lines demonstrated agronomic performances very similar to that of Situ Patenggang. Association analyses showed that 14 markers were associated with the target traits and 10 out of the 14 markers were identified as co-segregation markers. The four selected lines, therefore, were proposed to be released as Situ Patenggang-derived variety. One of the lines (Sta-8-S15-TB16) has been approved to be released as a new variety, namely ‘Bio Patenggang Agritan’.

Keywords: Bio Patenggang Agritan, essentially derived variety, DUS testing, foreground and background selection.

ABSTRAK

Situ Patenggang merupakan varietas padi gogo yang telah diterima oleh petani, tetapi mulai terserang penyakit blas (*Pyricularia grisea*) yang dapat menyebabkan kehilangan hasil hingga 50%. Untuk mengatasinya, telah dirakit varietas Bio Patenggang melalui pemuliaan molekuler menggunakan galur monogenik tahan blas sebagai donor gen tahan blas. Tujuan penelitian ini ialah menampilkan proses pemuliaan molekuler pada perakitan varietas Bio Patenggang yang mencakup tahapan seleksi fenotipe galur-galur harapan (*advance lines*) diikuti dengan analisis keragaan genotipe yang dipandu marka molekuler. Keragaan fenotipe dianalisis berdasarkan karakterisasi morfo-agronomi melalui uji Petak Pembandingan dengan varietas asalnya Situ Patenggang dan mengacu pada uji Baru, Unik, Seragam, dan Stabil (BUSS). Keragaan genotipe dianalisis dengan menggunakan marka *foreground* dan *background*. Empat galur populasi BC₃F₇ dipilih sebagai calon varietas turunan esensial (VTE). Berdasarkan ANOVA dan Analisis Komponen Utama (AKU), empat galur tersebut tidak berbeda nyata dengan Situ Patenggang, kecuali galur Sk-59-S15-TB16 dan Sa-97-S15-TB16 pada beberapa sifat. Hasil analisis keragaan genotipe juga mengonfirmasi empat galur tersebut terdeteksi membawa gen *Pita*, *Pii*, *Pik-p*, dan *Pia* berdasarkan seleksi dengan marka *foreground*. Hasil analisis marka *background* menunjukkan bahwa keempat galur uji memiliki keragaan karakter morfo-agronomi yang sangat mirip dengan Situ Patenggang. Berdasarkan hasil analisis asosiasi, diperoleh 14 marka signifikan dapat menandai beberapa karakter morfo-agronomi dan 10 marka di antaranya merupakan marka kosegregasi. Empat galur tersebut diusulkan pada sidang pelepasan. Salah satunya (Sta-8-S15-TB16) telah disetujui untuk dilepas sebagai varietas unggul baru padi gogo yang diberi nama ‘Bio Patenggang Agritan’.

Kata kunci: Bio Patenggang Agritan, varietas turunan esensial, uji BUSS, seleksi dengan marka *foreground* dan *background*.

PENDAHULUAN

Padi merupakan komoditas tanaman pangan dan bahan pangan utama masyarakat Indonesia. Kementerian Pertanian menempatkan beras sebagai komoditas pangan utama selama tiga tahun ke depan sebagai manifestasi dari visi ketujuh 'Nawa Cita' yakni mewujudkan kemandirian ekonomi nasional. Hal ini membuat peningkatan produksi padi nasional menjadi salah satu prioritas sektor pertanian Indonesia. Saat ini, Pulau Jawa masih menduduki peringkat pertama dalam produksi beras nasional dengan total produksi mencapai 34,93 juta ton gabah kering giling, setara dengan 47,75% dari total produksi padi nasional. Namun demikian, pada tahun 2016 terjadi penurunan produktivitas padi di beberapa provinsi sentra produksi padi, termasuk di Pulau Jawa (Heni 2016). Badan Pusat Statistik melaporkan adanya penurunan produksi padi pada tahun 2015–2016, terutama di sentra produksi padi nasional di Jawa Barat (Badan Pusat Statistik 2018).

Salah satu faktor yang memengaruhi penurunan produktivitas padi ialah keberadaan cendawan patogen tanaman. Penyakit blas yang disebabkan oleh *Pyricularia oryzae* merupakan salah satu penyakit cendawan utama tanaman padi (Santoso dan Nasution 2009). Di Indonesia serangan penyakit blas mencapai 1.285 juta ha atau setara dengan 12% dari total areal pertanaman padi nasional (Kharisma et al. 2013) dan dapat menyebabkan penurunan produksi padi sebesar 1–50% (Koga 2001; Santoso dan Nasution 2009).

Cendawan *P. oryzae* memiliki tingkat virulensi beragam dan mampu beradaptasi terhadap ketahanan inang. Cendawan ini mampu melakukan persilangan antargameta haploid, termasuk antargametotipe dengan latar belakang genetik berbeda. *P. oryzae* juga mampu membentuk ras baru apabila ketahanan tanaman berubah (Vasudevan et al. 2015). Penyakit blas merupakan ancaman utama pertanian, di lahan gogo khususnya. Namun demikian, saat ini penyakit blas juga telah menjadi tantangan pada padi sawah. Pada beberapa lokasi sentra produksi padi sawah, seperti Lampung, Sumatra, Sulawesi, Jawa Barat, dan Bali, dilaporkan mulai adanya kendala produksi sebagai akibat serangan penyakit blas (Santoso dan Nasution 2009).

Padi varietas Situ Patenggang memiliki kemampuan untuk beradaptasi, baik di lahan sawah maupun lahan kering. Varietas ini secara genetik memiliki sifat ketahanan terhadap blas dan juga merupakan varietas padi yang disukai petani karena keragaan tanamannya yang superior (Wahab et al. 2017). Namun

demikian, sifat ketahanan varietas Situ Patenggang terhadap penyakit blas di beberapa lokasi endemis, seperti Lampung dan Sukabumi, telah mulai patah sehingga tanaman terserang blas (Santoso dan Nasution 2009). Perakitan varietas turunan esensial (VTE) dari varietas Situ Patenggang yang membawa gen tahan penyakit blas merupakan alternatif dalam mengendalikan penyakit blas dengan tetap mempertahankan karakter unggulnya yang telah diterima petani.

Pemanfaatan marka molekuler pada program pemuliaan untuk merakit varietas unggul baru tahan penyakit blas sangat prospektif. Dengan telah diisolasinya beberapa gen ketahanan terhadap penyakit blas, dimungkinkan untuk melakukan seleksi karakter ketahanan penyakit blas tersebut dengan bantuan marka DNA berbasis gen. Seleksi terhadap karakter target pemuliaan pada galur uji dapat dilakukan dengan menggunakan marka seleksi untuk gen target insersi (*foreground marker*) dan marka seleksi karakter di luar gen target insersi (*background marker*) (Divya et al. 2014). Penggunaan marka molekuler untuk mendukung uji kemiripan memungkinkan untuk menyeleksi galur-galur yang memiliki gen terinsersi dari tetua donor dengan latar belakang genetik (*genetic background*) sesuai dengan tetua pemulih (*recurrent parent*). Perkembangan terkini pemuliaan berbantuan marka molekuler untuk seleksi melalui pendekatan *marker-assisted backcrossing* (MABC) telah dilakukan dengan menggunakan kapasitas marka yang lebih besar (6K) dengan teknik *array* sehingga mampu mendeteksi introgresi yang membawa gen atau QTL target secara cepat dengan menghindari introgresi karakter yang tidak diinginkan dari tetua donor (*linkage drag*) (Thomson et al. 2017). Dengan demikian, pemanfaatan marka molekuler merupakan upaya untuk meningkatkan presisi seleksi berdasarkan gen target dan meminimalkan terjadinya *linkage drag*. Tujuan penelitian ini ialah menampilkan proses pemuliaan molekuler pada perakitan varietas Bio Patenggang yang mencakup tahapan seleksi fenotipe galur-galur harapan (*advance lines*) diikuti dengan analisis keragaan genotipe galur uji yang dipandu marka molekuler.

BAHAN DAN METODE

Penelitian uji Petak Pembanding dilaksanakan di Kebun Percobaan Citayam, Bogor, Jawa Barat pada musim tanam (MT) II tahun 2018. Penelitian analisis molekuler galur-galur uji dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (BB Biogen), Bogor, Jawa Barat.

Materi Genetik

Materi genetik yang digunakan pada penelitian ini ialah galur-galur silang balik (*backcross*) generasi lanjut (BC_3F_7) hasil persilangan tetua pemulih, Situ Patenggang yang merupakan varietas padi amfibi dan telah dikenal luas oleh petani, dengan varietas monogenik blas (IRBL) yang mengandung empat gen ketahanan terhadap penyakit blas sebagai tetua donor. Sebanyak empat galur calon VTE telah diuji pada penelitian ini, yaitu Sta-8-S15-TB16 (mengandung insersi gen *Pita*), Si-28-S15-TB16 (mengandung insersi gen *Pii*), SK-59-S15-TB16 (mengandung insersi gen *Pik-p*), dan Sa-97-S15-TB16 (mengandung insersi gen *Pia*). Situ Patenggang digunakan sebagai varietas cek.

Karakterisasi Fenotipe

Setiap calon VTE baru yang akan dilepas/didaftarkan harus melalui pengujian yang telah ditetapkan dalam panduan (*guideline*) International Union for the Protection of New Varieties of Plants (UPOV) dalam bentuk uji *Distinct, Uniform, and Stable* (DUS) atau uji Baru, Unik, Seragam, dan Stabil (BUSS) (UPOV 2002). Pengujian dilakukan melalui uji Petak Pembanding galur calon varietas dengan Situ Patenggang sebagai varietas asal (Prakash 2005). Uji Petak Pembanding dilakukan berdasarkan Panduan Pelaksanaan Uji (PPU) padi (PVTTP 2012). Pengujian dilakukan dengan Rancangan Acak Kelompok dan empat ulangan. Ukuran plot yaitu 5 m × 5 m, jumlah tanaman dengan total empat ulangan dalam satu plot percobaan adalah 400 tanaman. Jarak tanam yang digunakan 25 cm × 25 cm. Benih yang digunakan bermutu baik dengan daya kecambah 80% dan vigor tinggi. Penanaman dilakukan dengan satu benih setiap lubang tanam. Penanaman dilakukan pada tanggal 23 Agustus 2017. Pemupukan NPK (Phonska) dan Urea masing-masing dilakukan dengan dosis 300 kg/ha dan 100 kg/ha yang diberikan dalam tiga tahap, yaitu pada saat tanaman berumur 10 hari setelah tanam (HST) dipupuk dengan NPK 100 kg/ha, pada 35 HST dipupuk dengan NPK 100 kg/ha, dan pada saat tanaman sudah menunjukkan primordial bunga dipupuk dengan NPK 100 kg/ha dan Urea 100 kg/ha. Pemeliharaan tanaman dilakukan secara optimum sesuai kondisi lapangan. Pengamatan dilakukan terhadap karakter kualitatif (*qualitative characteristic/QL*), karakter kuantitatif (*quantitative characteristic/QN*), dan karakter pseudokualitatif (*pseudo-qualitative characteristic/PQ*). Karakter kualitatif/fenotipe yang berbeda jelas antara satu dengan yang lainnya dikelompokkan ke dalam beberapa kategori dengan mengikuti metode Nasir (2001) seperti diuraikan di bawah ini.

Pada setiap galur uji, 20 individu tanaman (sebagai ulangan) dikarakterisasi keragaman karakter agromonomi dan morfologinya berdasarkan PPU padi melalui uji Petak Pembanding (PVTTP 2012). Beberapa karakter tersebut, yaitu karakter malai yang meliputi jumlah malai dan panjang malai; karakter batang yang meliputi panjang batang, ketebalan batang, tinggi tanaman pada fase vegetatif, tinggi tanaman pada saat panen, dan kemampuan beranak; karakter daun yang meliputi panjang pelepah daun, lebar daun bendera, panjang daun bendera, lebar helai daun, panjang helai daun, dan panjang lidah daun. Pengamatan terhadap karakter kuantitatif terkait hasil dilakukan dengan cara mengukur panjang malai, jumlah gabah total/malai, jumlah gabah hampa/malai, jumlah gabah isi/malai, dan bobot 1.000 butir gabah. Karakter-karakter kuantitatif tersebut harus diamati seperti disyaratkan pada uji BUSS pada uji Petak Pembanding.

Karakterisasi dengan Marka Molekuler

Isolasi DNA genomik galur uji

DNA diisolasi dari daun berumur 30 HST dalam kondisi segar. Sebanyak 0,1 g potongan daun padi digerus menjadi bubuk dan diisolasi DNA-nya dengan bufer *Cetyltrimethylammonium bromide* (CTAB) mengacu pada metode Amani et al. (2011) dan Doyle dan Doyle (1990) dengan modifikasi. DNA hasil isolasi dilarutkan dalam bufer TE. DNA ditentukan konsentrasi dan kemurniannya secara kuantitatif dengan *NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific, AS) dan secara kualitatif menggunakan gel agarosa 1%.

Marka molekuler untuk analisis *foreground* dan *background*

Marka molekuler yang digunakan, yaitu marka *Sequence Tag Sites* (STS) sebagai marka *foreground* terkait dengan gen target insersi (Tabel 1) dan marka STS dan *Single Nucleotide Amplified Polymorphism* (SNAP) sebagai marka *background* (Tabel 2) terkait dengan gen-gen pengatur karakter morfo-agronomi, seperti jumlah anakan total (JAT), tinggi tanaman (TT), umur berbunga (rs), panjang malai, bobot 1.000 butir (B1000), dan sudut daun bendera, yang lokasinya tersebar pada dua belas kromosom padi.

Amplifikasi fragmen marka SNAP dan STS dengan teknik PCR

DNA genomik diencerkan dengan konsentrasi 10 ng/ μ l yang digunakan sebagai cetakan (*template*) pada reaksi PCR. Campuran PCR dibuat dengan komposisi 2 μ l DNA (10 ng/ μ l), 2 μ l ddH₂O, 1 μ l marka SNAP

Tabel 1. Marka *foreground* untuk seleksi galur uji.

Nama marka	Kromosom	Posisi genetik (bp)	Penanda gen
Pii2	9	10.234.958	<i>Pii</i>
Pii3		10.347.110	<i>Pii</i>
Piablasi1	11	6.535.813	<i>Pia</i>
Piablasi2		6.540.137	<i>Pia</i>
Pikp1	12	29.416.141	<i>Pikp</i>
Pikp2		29.830.452	<i>Pikp</i>
Pikp3		30.786.890	<i>Pikp</i>
ITS		24.627.650	<i>Pita</i>
Pita403		10.606.799	<i>Pita</i>

Tabel 2. Marka *background* untuk seleksi galur uji.

Nama marka*	Kromosom	Posisi genetik (bp)
JAT1	1	423.329
SNAP rs31		19.918.097
SNAP rs6		2.024.902
SNAP rs7		39.906.335
TT 1	2	19.845.250
JAT 5		28.687.616
SNAP rs21		201.495
B-3		28.772.698
B-4	3	33.475.497
B-5		7.805.945
B-6		3.489.584
B-7		8.523.481
B-8	4	5.485.868
B-9		28.973.183
B-10		29.061.946
B-11		25.254.364
B-12	5	26.632.665
B-13		26.633.067
TT 2		28.042.163
B-14		28.902.175
B-15	6	29.065.876
TT 3		4.862.717
B-17		2.127.181
B-18		28.905.733
B1000	7	29.048.897
JAT 3		2.453.894
JAT 4		11.843.395
SNAP rs6		2.024.902
B-20	8	2.400.627
B-21	9	17.876.799
B-22	10	3.090.435
B-23	11	6.218.054
B-24	12	6.220.687
SNAP rs12		7.666.455

*JAT = jumlah anakan total, SNAP = *Single Nucleotide Amplified Polymorphism*, rs = umur berbunga, TT = tinggi tanaman, B1000 = bobot 1.000 butir.

F+R (20 pM), dan 5 µl KAPA2G Fast ReadyMix PCR Kit (KAPA Biosystems, AS). Reaksi PCR dilakukan pada 96-well PCR plate menggunakan mesin PCR T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad, AS) dan diatur sesuai dengan profil program PCR untuk marka SNAP sebagai berikut: 5 menit pada 94°C; 30 detik pada 94°C, 1 menit pada 61°C/62°C, 1 menit pada 72°C, 35 siklus; 10 menit pada 72°C. Profil program PCR untuk marka STS adalah sebagai berikut: 5 menit pada 94°C; 45 detik pada 94°C, 45 detik pada 55°C, 1 menit 45 detik

pada 72°C, 36 siklus; 5 menit pada 72°C. Elektroforesis produk PCR dilakukan pada gel agarosa 1,5% dengan 24 sumur. Pada tiap sumur, dimasukkan campuran 3 µl loading dye dan GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, AS) : ddH₂O (1:2), dan 1 µl produk PCR. Elektroforesis dilakukan dengan arus listrik 90 volt selama 1 jam.

Analisis Data

Data fenotipe dianalisis dengan program *Analysis of Variance* (ANOVA) kemudian dilanjutkan dengan analisis Duncan. Selanjutnya, untuk mengetahui karakter yang secara nyata berkontribusi membentuk keragaman galur-galur uji, dilakukan analisis korelasi antarkarakter (*Principal Component Analysis/PCA*) dan analisis koordinat utama (*Principal Coordinates Analysis/PCoA*) dengan perangkat lunak XLSTAT. Hasil analisis PCA dapat digunakan untuk menentukan karakter penciri dari galur uji (Afuape et al. 2011).

Analisis keragaan genotipe galur uji dilakukan dengan mengonversi hasil visualisasi marka SNAP menjadi data biner (A/A) untuk pita DNA yang muncul dan (B/B) untuk pita DNA yang tidak muncul. Sementara, marka STS dianalisis dengan menyesuaikan posisi genetik dari gen target sesuai informasi yang terdapat pada *rice genome browser* (*MSU Rice Genome Annotation Project*) (Kawahara et al. 2013). Pada kedua set data, yakni data fenotipe dan genotipe, selanjutnya dilakukan analisis asosiasi dengan menggunakan perangkat lunak TASSEL untuk mengetahui keterkaitan antar kedua data tersebut (Bradbury et al. 2007).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakterisasi Morfo-Agronomi melalui Uji Petak Pembandingan

Data morfo-agronomi yang digunakan pada penelitian ini merupakan hasil pengamatan fase vegetatif dan generatif dari percobaan uji Petak Pembandingan galur-galur terpilih calon VTE. Hasil ANOVA keragaan karakter morfologi (13 karakter) yang diamati pada 20 individu dari keempat galur calon VTE disajikan pada Tabel 3. Hasil analisis tersebut menunjukkan bahwa pada 20 individu tanaman dari setiap galur uji terlihat adanya variasi, minimal 2 karakter dari 13 karakter morfo-agronomi yang diamati. Pada galur Sta-8-S15-TB16, terdapat keragaman (*p-value* berbeda nyata) pada 20 individu tanaman yang diamati, yaitu pada karakter tinggi tanaman saat fase vegetatif dan fase siap panen serta karakter panjang pelepah daun.

Tabel 3. Hasil ANOVA keragaan karakter morfo-agronomi pada galur-galur uji.

Karakter	<i>p-Value*</i>			
	Sta-8-S15-TB16	Si-28-S15-TB16	Sk-59-S15-TB16	Sa-97-S15-TB16
Jumlah malai	0,740	0,404	0,317	0,081
Panjang malai	0,808	0,650	0,230	< 0,0001**
Panjang batang	0,420	0,002**	0,422	< 0,0001**
Ketebalan batang	0,748	0,264	0,530	0,987
Tinggi tanaman saat panen	0,010**	0,129	0,018**	< 0,0001**
Kemampuan beranak	0,978	0,999	0,538	0,977
Tinggi tanaman vegetatif	< 0,0001**	0,062	0,009**	< 0,0001**
Panjang pelepah	0,017**	0,804	< 0,0001**	< 0,0001**
Lebar daun bendera	0,676	0,025**	0,001**	< 0,0001**
Panjang daun bendera	0,848	0,230	0,048**	0,000**
Lebar helai daun	0,474	0,785	< 0,0001**	< 0,0001**
Panjang helai daun	0,344	0,961	< 0,0001**	< 0,0001**
Panjang lidah daun	0,235	0,686	< 0,0001**	0,017**

*Dianalisis berdasarkan keragaan karakter pada 20 individu tanaman. **Tercetak tebal: berbeda nyata pada $p\text{-value} \leq 1\%$ atau $p\text{-value} \leq 5\%$.

Berdasarkan hasil analisis komponen utama, diketahui terdapat beberapa karakter yang sangat memengaruhi keragaman galur-galur uji. Hasil analisis ini dapat mereduksi total karakter morfologi yang diamati menjadi tiga komponen utama (KU-1, KU-2, dan KU-3) yang mewakili nilai akar penciri (*eigenvalue*) >1 dan mampu menjelaskan keragaman keragaan galur sebesar 74,23%. Karakter dengan koefisien yang lebih besar nilainya pada suatu komponen utama memiliki kontribusi besar terhadap komponen utama tersebut (Abdurachman et al. 2014).

Komponen utama pertama (KU-1) dengan *eigenvalue* sebesar 6,77 berkontribusi terhadap 52,06% keragaman total. Komponen utama kedua (KU-2) dengan *eigenvalue* sebesar 1,58 berkontribusi terhadap 64,19% keragaman total di antara galur-galur uji. Sementara, komponen utama ketiga (KU-3) dengan *eigenvalue* sebesar 1,304 berkontribusi terhadap 74,23% keragaman total galur-galur uji.

Analisis vektor penciri (Tabel 4) menunjukkan karakter yang berkontribusi maksimum terhadap keragaman galur-galur uji, merupakan karakter yang memiliki nilai vektor penciri terbesar dan bernilai positif (Haydar et al. 2007). Pada KU-1, karakter yang berkontribusi besar terhadap keragaman galur-galur uji ialah karakter daun (panjang helai daun), karakter batang (panjang batang), dan karakter agronomi (tinggi tanaman saat fase vegetatif). Pada KU-2, karakter yang berkontribusi besar terhadap keragaman galur-galur uji ialah karakter daun (panjang lidah daun), karakter batang (panjang batang), dan karakter agronomi (jumlah malai). Pada KU-3, karakter yang berkontribusi besar terhadap keragaman galur-galur uji ialah karakter daun (panjang daun bendera), karakter batang (panjang batang). Sementara untuk

karakter agronomi, tinggi tanaman saat fase vegetatif dan jumlah malai berkontribusi terhadap keragaman galur-galur uji.

Analisis koordinat utama dilakukan untuk menggambarkan posisi relatif setiap galur uji seperti disajikan pada Gambar 1. Hasil tersebut menunjukkan bahwa sebagian besar individu-individu Sta-8-S15-TB16 dan Si-28-S15-TB16 berada pada kluster yang sama dengan Situ Patenggang. Hal tersebut sesuai dengan data yang disajikan pada Tabel 3 bahwa karakter-karakter galur uji tidak berbeda nyata. Dengan demikian, baik hasil pengujian ANOVA maupun analisis koordinat utama menunjukkan bahwa galur Sta-8-S15-TB16 dan Si-28-S15-TB16 memiliki keragaman karakter morfo-agronomi yang sama (secara statistik tidak berbeda nyata) dengan varietas tetua asalnya (Situ Patenggang).

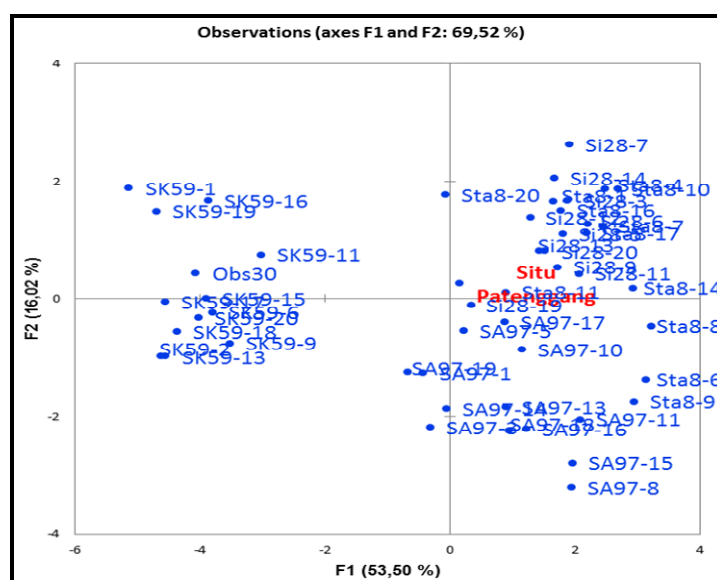
Karakterisasi Genotipe Galur-galur Uji pada Seleksi dengan Marka *Foreground*

DNA empat galur uji digunakan pada seleksi *foreground*. Seleksi *foreground* dilakukan untuk menyeleksi galur-galur yang terinsersi gen target yakni gen tahan blas. Marka molekuler yang digunakan ialah marka penanda gen blas (*Pi*) yang menjadi target dari introgresi setiap populasi. Marka-marka molekuler tersebut telah teridentifikasi sebagai marka molekuler fungsional penanda gen *Pi* yang berkosegregasi dengan karakter tahan penyakit blas. Galur Sta-8-S15-TB16 merupakan galur turunan Situ Patenggang dengan tetua donor IRLta-Re2 yang membawa gen ketahanan terhadap penyakit blas (*Pita*). Untuk menganalisis terinsersinya gen ini, digunakan marka *foreground* Pita403 dan ITS. Hal yang sama juga dilakukan pada galur Si-28-S15-TB16 dengan marka *foreground*-nya (Pii3 dan Pii2).

Tabel 4. Faktor penciri karakter morfo-agronomi yang memengaruhi perbedaan sifat galur-galur uji.

Karakter morfo-agronomi			Komponen utama*		
			KU-1	KU-2	KU-3
Morfologi	Daun	Panjang lidah daun	0,307	0,237	0,128
		Panjang helai daun	0,359	0,045	0,029
		Lebar helai daun	0,332	-0,025	-0,002
		Panjang daun bendera	0,274	-0,136	0,210
		Lebar daun bendera	0,284	-0,176	0,024
		Panjang pelepah daun	0,348	0,179	-0,025
		Ketebalan batang	0,075	-0,450	-0,299
Agronomi	Batang	Panjang batang	0,329	0,166	0,031
		Panjang malai	0,147	-0,450	-0,501
		Jumlah malai	-0,078	0,584	-0,295
		Tinggi tanaman saat fase vegetatif	0,353	-0,033	-0,114
		Kemampuan beranak	0,017	0,284	-0,698
		Tinggi tanaman saat panen	0,351	-0,073	-0,099

*Tercetak tebal: berbeda nyata pada p -value $\leq 1\%$ atau p -value $\leq 5\%$.

**Gambar 1.** Biplot penyebaran galur-galur uji terhadap tetua asalnya (Situ Patenggang).

Visualisasi hasil analisis PCR menggunakan marka *foreground* pada kedua galur tersebut disajikan pada Gambar 2.

Hasil analisis *genotyping* pada Gambar 2 menunjukkan bahwa marka *foreground* yang digunakan polimorfis pada kedua tetua, yaitu tetua pemulih (Situ Patenggang) dan tetua donor (IRBLta dan IRBLi). Tipe genotipe yang berbeda pada kedua tetua inilah yang selanjutnya digunakan sebagai pola untuk menyeleksi galur-galur turunannya sehingga diketahui galur-galur yang memiliki tipe genotipe sama dengan tetua donornya yang membawa gen ketahanan terhadap penyakit blas.

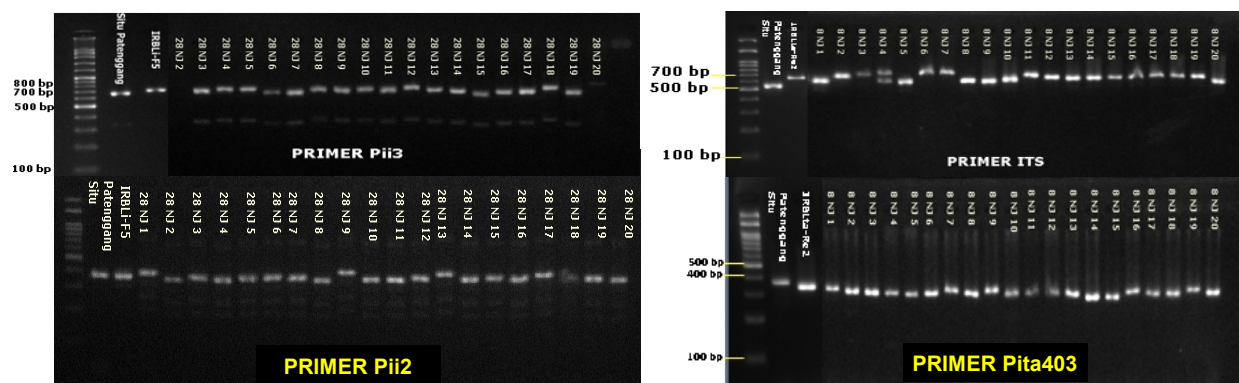
Analisis yang sama juga dilakukan pada 20 individu tanaman galur Sk-59-S15-TB16 dan Sa-97-S15-TB16 dengan marka seleksi *foreground* secara berurutan marka Pkp3 dan Pkp2 untuk galur Sk-59-

S15-TB16; marka Piablas1 dan Piablas2 untuk galur Sa-97-S15-TB16. Visualisasi produk PCR menggunakan dua pasang marka *foreground* pada dua galur uji tersebut disajikan pada Gambar 3.

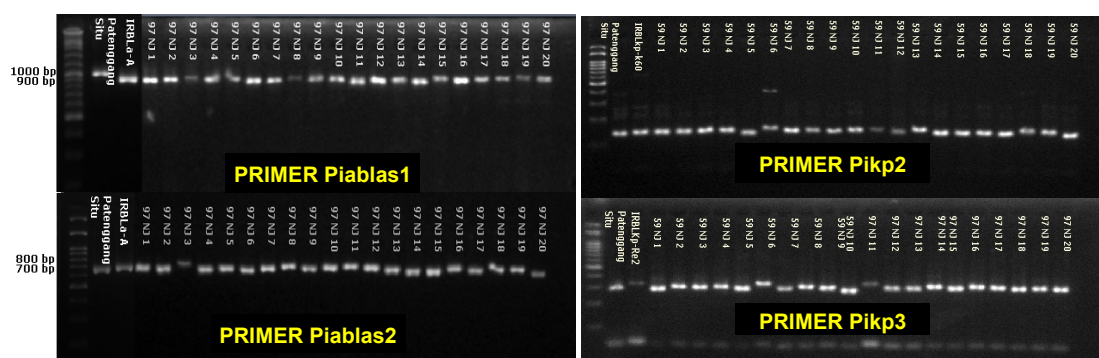
Karakterisasi Genotipe pada Seleksi dengan Marka *Background*

Seleksi *background* dilakukan untuk mengeliminasi alel yang tidak diinginkan dari tetua donor yang ikut terintrogresi ke dalam galur-galur segrekan. Marka molekuler yang digunakan minimal 2–3 marka yang rata-rata terpetakan pada sekitar 100 cM (Hospital 2009).

Seleksi *background* awal dilakukan pada generasi segregasi BC₃F₂ menggunakan marka *high-density genome-based* 384 SNP yang dijalankan menggunakan alat *high-throughput genome analyzer*



Gambar 2. Visualisasi produk PCR menggunakan marka *foreground* ITS dan Pita403 pada galur Sta-8-S15-TB16 serta marka *foreground* Pii3 dan Pii2 pada galur Si-28-S15-TB16.



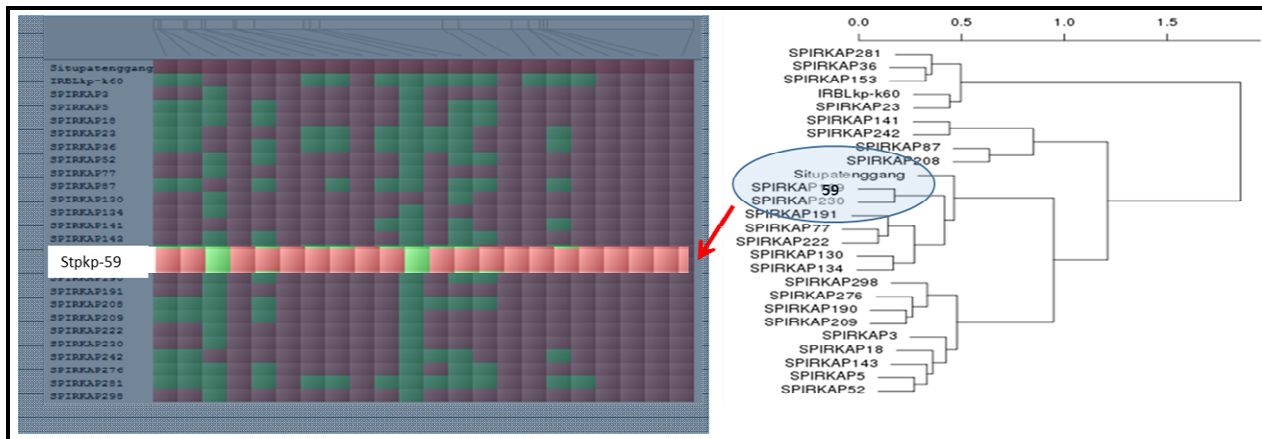
Gambar 3. Visualisasi produk PCR menggunakan marka *foreground* Piablas1 dan Piablas2 pada galur Sa-97-S15-TB16 dan marka *foreground* Pikp2 dan Pikp3 pada galur Sk-59-S15-TB16.

iScan (Illumina, AS). Marka-marka SNP yang signifikan hasil analisis ini kemudian dirancang ulang sebagai marka SNAP yang aplikatif untuk seleksi populasi silang balik lanjut. Sebagian hasil keragaan genotipe hasil analisis menggunakan dua set marka *background* disajikan pada Gambar 4.

Berdasarkan keragaan profil genotipe menggunakan dua set marka *background* ini, dapat dianalisis kedekatan genetik berdasarkan tingkat kesamaan profil *background* genetiknya. Hasil analisis dendrogram galur Sta-8-S15-TB16 yang disajikan pada Gambar 4 menunjukkan bahwa berdasarkan penanda dalam seleksi *background* hampir seluruh individu dalam galur tersebut mengelompok pada tetua pemulih Situ Patenggang. Hal tersebut berarti bahwa individu-individu dalam galur uji memiliki kemiripan karakter dengan varietas Situ Patenggang. Hal tersebut juga sesuai dengan hasil karakterisasi fenotipe yang disajikan pada Tabel 3 di atas yang menunjukkan bahwa keragaan galur Sta-8-S15-TB16 tidak menunjukkan perbedaan yang nyata dengan tetua pemulih Situ Patenggang. Dari hasil analisis *background* yang disajikan pada Gambar 5 juga terlihat jelas bahwa tidak ada galur-galur uji yang mengelompok pada tetua donor IRBLta-Re2.

Seleksi *background* terhadap galur Si-28-S15-TB16 menunjukkan bahwa seluruh galur uji mengelompok pada Situ Patenggang. Beberapa individu seperti individu dengan nomor Si-28-S15-TB16-15, Si-28-S15-TB16-14, Si-28-S15-TB16-7, Si-28-S15-TB16-6, Si-28-S15-TB16-5, Si-28-S15-TB16-4, Si-28-S15-TB16 Si-28-S15-TB16-3, dan Si-28-S15-TB16-2 memiliki kekerabatan sangat dekat dengan Situ Patenggang. Individu lain berada dalam grup yang berbeda, namun tidak dalam satu grup yang sama dengan IRBLi-F5 sebagai tetua donor.

Dendrogram galur Sk-59-S15-TB16 yang ditampilkan pada Gambar 4 menunjukkan bahwa berdasarkan penanda dalam seleksi *background* hampir seluruh individu dalam galur tersebut mengelompok pada tetua pemulih Situ Patenggang. Hal tersebut berarti bahwa individu-individu dalam galur uji memiliki kemiripan sifat dengan Situ Patenggang. Hal tersebut juga sesuai dengan hasil karakterisasi fenotipe pada Tabel 4 yang menunjukkan bahwa galur Sk-59-S15-TB16 tidak memiliki perbedaan nyata dengan tetua pemulih Situ Patenggang. Dari Gambar 4 juga diketahui bahwa tidak ada galur uji yang mengelompok pada tetua donor IRBLkp-K60.



Gambar 4. Keragaan genotipe galur-galur uji menggunakan dua set marka *background* (384 SNP dan 20 SNAP). *Pikp*: kromosom 11 (29,4–30,7 Mb).



Gambar 5. Dendrogram hasil seleksi *background* galur-galur calon VTE. (A) Kelompok galur Sta-8-S15-TB16. (B) Kelompok galur Si-28-S15-TB16. (C) Kelompok galur SK59-S15-TB16. (D) Kelompok galur SA-97-S15-TB16.

Dendrogram pada Gambar 5 menunjukkan bahwa semua individu tanaman keempat kelompok galur uji, yaitu Sta-8-S15-TB16, Si-28-S15-TB16, Sk-59-S15-TB16, dan Sa-97-S15-TB16 yang mengelompok dalam satu kelompok dengan tetua pemulih Situ Patenggang dan berbeda kelompok dengan tetua IRBL berdasarkan hasil analisis menggunakan marka *background*. Hal ini secara tegas menunjukkan bahwa genotipe galur-galur uji memiliki kemiripan yang sangat tinggi dengan tetua pemulih Situ Patenggang

sehingga dengan demikian telah memenuhi syarat sebagai galur-galur calon VTE.

Hasil Analisis Asosiasi Karakter Fenotipe dan Genotipe

Asosiasi karakter fenotipe dan genotipe bertujuan mengetahui marka-marka yang dapat digunakan untuk pengujian spesifik pada galur-galur uji. Berdasarkan hasil pengujian, didapatkan beberapa karakter dengan nilai *p-value* kurang dari 0,05 yang

Tabel 5. Hasil analisis asosiasi fenotipe-genotipe antara marka-marka *background* dan berbagai karakter fenotipe serta tingkat kosegregasinya pada galur-galur uji.

Karakter	Marka	<i>p-Value</i>	Galur	Kosegregasi (%)
Panjang daun bendera	BL14	0,0072	28 NJ	70
Panjang batang	BL12	0,0097	97 NJ	5
Tinggi tanaman vegetatif	BL21	0,011	97 NJ	5
Tinggi tanaman vegetatif	BL12	0,017	97 NJ	20
Panjang lidah daun	BL23	0,022	8 NJ	75
Tinggi tanaman saat panen	BL9	0,024	28 NJ	90
Panjang helai daun	BL7	0,024	28 NJ	95
Panjang helai daun	BL13	0,024	28 NJ	95
Panjang helai daun	BL21	0,025	97 NJ	55
Ketebalan batang	BL14	0,026	28 NJ	85
Tinggi tanaman vegetatif	BL24	0,035	59 NJ	70
Ketebalan batang	BL5	0,035	28 NJ	95
Ketebalan batang	BL17	0,042	28 NJ	90
Panjang lidah daun	BL5	0,046	28 NJ	95

berarti bahwa karakter tersebut berasosiasi dengan marka molekuler yang digunakan (Utami et al. 2017). Utami et al. (2017) melaporkan bahwa nilai kosegregasi dinyatakan cukup tinggi apabila nilai kosegregasi tersebut di atas 50%. Berdasarkan hasil asosiasi dan analisis kosegregasi karakter fenotipe dan genotipe (Tabel 5), diperoleh cukup banyak marka potensial yang dapat digunakan untuk analisis sifat fenotipe berdasarkan data genotipenya, di antaranya sebagai berikut: marka BL14 yang berasosiasi dengan panjang daun bendera; marka BL23 dan BL5 dengan karakter panjang lidah daun; marka BL9 dengan tinggi tanaman saat panen; marka BL7, BL13, dan BL21 dengan karakter panjang helai daun; marka BL14, BL5, dan BL17 dengan karakter ketebalan batang; marka BL24 dengan tinggi tanaman pada fase vegetatif (Tabel 5).

Asosiasi karakter fenotipe dan genotipe bertujuan mengetahui marka-marka yang dapat digunakan untuk pengujian spesifik pada galur-galur uji. Berdasarkan hasil pengujian, didapatkan beberapa karakter dengan nilai *p-value* kurang dari 0,05 yang berarti bahwa karakter tersebut berasosiasi dengan marka molekuler yang digunakan (Utami et al. 2017). Utami et al. (2017) melaporkan bahwa nilai kosegregasi dinyatakan cukup tinggi apabila nilai kosegregasi tersebut di atas 50%. Berdasarkan hasil asosiasi dan analisis kosegregasi karakter fenotipe dan genotipe (Tabel 5), diperoleh cukup banyak marka potensial yang dapat digunakan untuk analisis sifat fenotipe berdasarkan data genotipenya, di antaranya sebagai berikut: marka BL14 yang berasosiasi dengan panjang daun bendera; marka BL23 dan BL5 dengan karakter panjang lidah daun; marka BL9 dengan tinggi tanaman saat panen; marka BL7, BL13, dan BL21 dengan karakter panjang helai daun; marka BL14, BL5, dan BL17 dengan karakter ketebalan batang; marka BL24 dengan tinggi tanaman pada fase vegetatif (Tabel 5).

Marka-marka molekuler dengan nilai kosegregasi yang rendah disebabkan oleh sifat karakter yang poligenik. Poligenik merupakan pewarisan sifat yang dikode oleh beberapa gen, seperti pada karakter panjang batang dan tinggi tanaman pada fase vegetatif. Di pihak lain, marka-marka yang memiliki nilai asosiasi yang signifikan dengan tingkat kosegregasi tinggi merupakan marka potensial untuk digunakan pada seleksi karakter morfo-agronomi galur-galur calon VTE tahan penyakit blas (Utami et al. 2017).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, pada galur-galur uji Sta-8-S15-TB16, Si-28-S15-TB16, SK-59-S15-TB16, dan Sa-97-S15-TB16 telah terintrograsi gen-gen ketahanan terhadap penyakit blas yang diharapkan. Hal ini terbukti dari hasil seleksi *foreground*. Berdasarkan analisis karakter fenotipe dan seleksi *background*, galur-galur uji telah mengelompok pada tetua asal (Situ Patenggang) yang berarti memiliki kemiripan genetik yang tinggi dengan tetua pemulihnya (Situ Patenggang). Dengan demikian, galur-galur hasil uji Petak Pembandingan ini dapat dikembangkan sebagai calon VTE Situ Patenggang. Salah satu dari empat galur yang diajukan, yaitu Sta-8-S15-TB16, telah disetujui untuk dilepas sebagai varietas unggul baru padi gogo.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini terlaksana atas dukungan dana DIPA APBN BB Biogen, Balitbangtan, Kementan TA 2017–2018. Penulis mengucapkan terima kasih kepada tim pemulia dan peneliti galur harapan calon VTE Situ Patenggang atas dukungan, keterlibatan, dan kerja samanya dalam pelaksanaan penelitian ini.

KONTRIBUTOR PENULISAN

DWU: kontributor utama, penanggung jawab penelitian; MR: kontributor anggota, analisis *genotyping*; SY: kontributor anggota, penanggung jawab kegiatan lapangan; SN, AD, dan NJ: kontributor anggota, membantu analisis laboratorium dan kegiatan lapangan.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdurachman, S.H., Komalig, H. & Nainggolan, N. (2014) Penggunaan analisis komponen utama dalam penggabungan data peubah ganda pada kasus produksi pertanian dan perkebunan di wilayah Bolaang Mongondow tahun 2008. *Jurnal d'Cartesian*, 3 (2), 1–7.
- Badan Pusat Statistik (2018) *Produksi padi menurut provinsi*. [Online] Tersedia pada: <https://www.bps.go.id/subject/53/tanaman-pangan.html#subjekViewTab3> [Diakses 15 April 2018].
- Bradbury, P.J., Zhang, Z., Kroon, D.E., Casstevens, T.M., Ramdoss, Y. & Buckler, E.S. (2007) TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics*, 23 (19), 2633–2635
- Divya, B., Robin, S., Rabindran, R., Senthil, S., Raveendran, M. & Joel, A.J. (2014) Marker-assisted backcross breeding approach to improve blast resistance in Indian rice (*Oryza sativa*) variety ADT43. *Euphytica*, 200 (1), 61–77.
- Haydar, A., Ahmed, M.B., Hannan, M.M. & Razvy, M.A. (2007) Analysis of genetic diversity in some potato varieties grown in Bangladesh. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 2 (3–4), 143–145.
- Heni, A.T. (2016) *Outlook komoditas pertanian: Padi*. Jakarta, Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian, Kementerian Pertanian.
- Hospital, F. (2009) Challenges for effective marker-assisted selection in plants. *Genetica*, 303–310.
- 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., Davidson, R.M., Lin, H., Quesada-Ocampo, L., Vaillancourt, B., Sakai, H., Lee, S.S., Kim, J., Numa, H., Itoh, T., Buell, C.R. & Matsumoto, T. (2013) Improvement of the *Oryza sativa* Nipponbare reference genome using next-generation sequence and optical map data. *Rice* 6, 4. doi:10.1186/1939-8433-6-4.
- Kharisma, S.D., Cholil, A. & 'Aini, L.Q. (2013) Ketahanan beberapa genotipe padi hibrida (*Oryza sativa* L.) terhadap *Pyricularia oryzae* Cav. penyebab penyakit blas daun. *Jurnal HPT*, 1 (2), 19–27.
- Koga, H. (2001) Cytological aspects of infection by the rice blast fungus *Pyricularia oryzae*. In: Sreenivasaprasad, S. & Johnson, R. (eds.) *Major fungal diseases of rice: Recent advances*. Dordrecht, Springer Netherlands.
- Narzary, D., Verma, S., Mahar, K.S. & Rana, T.S. (2015) A rapid and effective method for isolation of genomic DNA from small amount of silica-dried leaf tissues. *National Academy Science Letters*, 38 (5), 441–444.
- Santoso & Nasution, A. (2009) Pengendalian penyakit blas dan penyakit cendawan lainnya. Dalam: Inovasi Teknologi Produksi Padi. Buku 2. Sukamandi, Balai Besar Penelitian Tanaman Padi, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Kementerian Pertanian.
- UPOV (2002) *General introduction to the examination of distinctness, uniformity, and stability and the development of harmonized descriptions of new varieties of plants*. [Online] Available from: https://www.upov.int/export/sites/upov/publications/en/tg_rom/pdf/tg_1_3.pdf [Accessed 26 April 2018].
- Utami, S., Widyastuti, U., Utami, D., Rosdianti, I. & Lestari, P. (2017) Molecular marker-assisted selection of rice grain quality on rice (*Oryza sativa* L.) lines tolerant to Fe toxicity stress. *Journal of Tropical Life Science*, 7 (3), 268–276.
- Vasudevan, K., Gruissem, W. & Bhullar, N.K. (2015) Identification of novel alleles of the rice blast resistance gene *Pi54*. *Scientific Reports*, 5, 1–12. doi:10.1038/srep15678.
- Wahab, M.I., Satoto, Ridwan, R., Guswara, A. & Suharna (2017) *Deskripsi varietas unggul baru padi*. Sukamandi, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Kementerian Pertanian.