

**VARIASI ALEL BARU UNTUK GEN KETAHANAN
PENYAKIT HAWAR DAUN BAKTERI, *Xa7* PADA PLASMA
NUTFAH PADI LOKAL INDONESIA, PAREKALIGOLARA**

Dwinita W. Utami¹, Endang M. Septiningsih¹, Triny S. Kadir², Fatimah¹,
dan S. Yuriyah¹

¹Balai Besar Penelitian Bioeknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian
² Balai Besar Penelitian Tanaman Padi

ABSTRACT

The New Allele Variation of Bacterial Blight Resistance Gene, *Xa7*, on Indonesian Local Rice Germplasm, Parekaligolara. The abundance of genetic variation existing in germplasm collections is the foundation for variety improvement in plant breeding program. Nevertheless, studies on the Indonesian genetic diversity of rice germplasm using molecular markers are still limited. Recent advances in utilizing simple sequence repeat (SSR) in QTL mapping and the availability of the whole rice genome sequences have provided wealth of data to accelerate research on genetic diversity of rice germplasm. Based on these advance technologies, a research has been done to discover some novel alleles at important gene loci that can be used for rice improvement. This approach is called allele mining. On this study the target gene is the resistance gene for bacterial leaf blight pathogen, *Xa7*. This study was started by identifying the genetic diversity of 96 accessions of the Indonesian local rice germplasm. Next, the *Xa7* allele mining was done by designing SNP (*single nucleotide polymorphism*) primers based on the DNA sequence around the gene target. The significant LD mapping was then detected by the association mapping between phenotype and SNP genotyping data of the selected germplasm having superior performance on BLB resistance and representing one cluster of the genetic diversity analysis results. The results showed that *Xa7* allele variation were found in Parekaligolara (Indica, 15141) and Gajahmada (Indica, 15141), which were resistant to BLB races IV and VIII on generative stage and field condition. The significant *Xa7*-SNP8 and *Xa7*-SNP11 markers were associated with the LD map position of *Xa7* gene on 28,05–28,1 Mb of chromosome 6 in rice genome. The insertion-deletion allele variation was found in the 300 total nucleotide PCR product of co-segregation marker RM20589 in local rice Parekaligolara (Indica, 15141). This variation was different to *Xa7* allele variation in the isogenic lines of *Xa7* gene, IRBB7. Therefore, this is the novel of *Xa7* allele variation from Indonesian local rice.

Key words: *Xa7*, allele mining, Indonesian local rice germplasm.

ABSTRAK

Keragaman variasi genetik yang terpelihara dalam koleksi plasma nutfah adalah modal dasar dalam program pemuliaan tanaman. Namun demikian penelitian tentang keragaman genetik plasma nutfah padi berbasis pada aplikasi marka molekuler masing terbatas. Perkembangan teknologi genomik, yang meliputi: pemetaan QTL (*Quantitative Trait Loci*), penemuan gene (*gene discovery*), dan tersedianya sekuens genom secara lengkap telah memungkinkan untuk mencari alel-alel yang berguna dalam koleksi plasma nutfah padi untuk perbaikan varietas melalui strategi yang disebut dengan *allele mining*. Dalam penelitian ini teknologi *allele mining* diaplikasikan untuk identifikasi gen ketahanan terhadap penyakit Hawar Daun Bakteri (HDB), *Xa7* sebagai gen target. Penelitian ini diawali dengan identifikasi keragaman genetik 96 aksesi plasma nutfah padi lokal Indonesia. Kemudian dilanjutkan dengan mendesain marka SNP (*single nucleotide polymorphism*) berdasarkan sekuens DNA disekitar gen target. Fragmen LD map yang signifikan diperoleh dengan uji gabungan antara fenotipe dengan data SNP *genotyping*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa variasi alel *Xa7* terdapat pada plasma nutfah Parekaligolara (*Indica*, 15141) and Gajahmada (*Indica*, 15141), yang bersifat tahan terhadap HDB ras IV and VIII pada stadia generatif dan pengujian di lapangan. Marka molekuler *Xa7*-SNP8 dan *Xa7*-SNP11 menandai LD map pada posisi 28,05-28,1 Mb dari kromosom 6 dalam genom padi. Hasil analisis sekuens total 300 basa nukleotida menunjukkan adanya variasi insersi-delesi. Sedangkan analisis PCR menggunakan marka yang bersegregasi bersama dengan sifat ketahanan, yaitu marka RM20589 bersifat polimorfis antara plasma nutfah Parekaligolara (*Indica*, 15141) dengan galur isogenik *Xa7*, IRBB7. Variasi ini mengindikasikan bahwa variasi alel *Xa7* pada plasma nutfah padi lokal Parekaligolara (*Indica*, 15141) merupakan variasi alel baru untuk gen *Xa7*.

Kata kunci: *Xa7*, *allele mining*, plasma nutfah padi lokal Indonesia.

PENDAHULUAN

Hakekat dari kegiatan pemuliaan tanaman yang telah terjadi selama ratusan tahun yang lalu, pada dasarnya adalah memilih alel-alel yang menguntungkan pada lokus-lokus yang penting. Hal ini dilakukan secara tidak langsung dengan memilih tanaman berpenampilan terbaik berdasarkan fenotipenya. Dasar dari kegiatan pemuliaan tanaman ini adalah melimpahnya keragaman genetik yang tersimpan dalam koleksi plasma nutfah di seluruh dunia. Kekayaan keragaman genetik ini merupakan bahan dasar untuk memperbaiki berbagai karakter

tanaman, khususnya pada tanaman penting seperti padi. Kesulitan yang dihadapi dalam memanfaatkan keberlimpahan plasma nutfah tersebut adalah bagaimana alel-alel menguntungkan yang cukup langka itu dapat ditemukan secara efisien diantara ribuan aksesori padi. Masalah ini menjadi lebih terasa ketika seleksi berdasarkan fenotipe saja sering tidak mampu menemukan alel terbaik. Dengan pendekatan teknik pemetaan gen (*quantitative trait loci* - QTL) diketahui bahwa alel-alel yang menguntungkan tersebut sering “tersembunyi” dan hanya dapat dideteksi dengan marka molekuler yang dapat secara langsung terpaut dengan alel target yang menguntungkan (Tanksley dan McCouch 1997).

Perkembangan teknologi genomik, yang meliputi pemetaan QTL (*quantitative trait loci*), penemuan gene (*gene discovery*), dan tersedianya sekuens genom secara lengkap telah memungkinkan untuk mencari alel-alel yang berguna dalam koleksi plasma nutfah padi untuk perbaikan varietas melalui strategi *allele mining*. Secara umum, strategi tersebut bertujuan untuk menggunakan teknologi molekuler terkini dalam mendapatkan alel-alel yang menguntungkan dalam koleksi plasma nutfah. Definisi yang lebih spesifik dari istilah tersebut adalah proses mendesain primer-primer PCR berdasarkan sekuens DNA untuk suatu gen kandidat pada suatu varietas bahkan juga dari kerabat liar dari koleksi plasma nutfah yang ada. Alel-alel tersebut kemudian disekuens, dan kemudian dibandingkan untuk menentukan perbedaan polimorfismenya. Dengan proses ini, berbagai alel dari suatu lokus dapat diisolasi (Latha *et al.* 2004; Rangan *et al.* 1999). Namun apabila gen kandidat belum tersedia, harus ditempuh pendekatan lain, salah satu alternatifnya adalah menggunakan pendekatan pemetaan LD (*linkage disequilibrium*) untuk mendapatkan daerah genom yang sempit yang mengandung alel yang diinginkan (Morton 2005). Berlainan dengan pemetaan QTL, yang menggunakan populasi yang dikembangkan dari dua tetua saja, pemetaan LD dapat menggunakan secara langsung beberapa sampai ratusan aksesori yang berbeda untuk membuat peta tanpa harus melakukan persilangan (Flint-Garcia *et al.* 2003). Salah satu keunggulan dari teknologi pencarian alel (*allele mining*) ini yaitu kita dapat memilih daerah genom yang relatif kecil dengan lebih akurat menggunakan marker yang berpaut ketat dengan sifat penting yang diinginkan, sehingga dapat mengurangi atau bahkan meniadakan adanya segregasi yang tidak diinginkan (*negative linkage drag*). Di samping itu, teknologi ini memungkinkan untuk memilih secara langsung alel yang kita inginkan pada suatu lokus, melalui proses pemilihan alel secara langsung (*direct allele selection*) (<http://smallgrains.cit.cornell.edu/about.html>). Analisis gen kandidat dapat dilakukan dengan DNA *sequencing* dan *SNP genotyping*. Marka SNP mempunyai keunggulan dalam mendeteksi ada tidaknya polimorfisme dibanding marka yang lain, karena marka ini dapat mendeteksi perbedaan hingga 1 nukleotida saja (Feltus *et al.* 2004). Hal ini sangat penting karena yang menjadi obyek penelitian dalam pencarian alel adalah daerah genom yang sudah sangat kecil, yaitu QTL atau gen. Dengan demikian, perbedaan terkecil dalam QTL atau gen yang memberikan kontribusi yang nyata pada fenotipe dapat terdeteksi.

Penyakit hawar daun bakteri (HDB) disebabkan oleh bakteri patogen *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*, merupakan salah satu penyakit utama tanaman padi yang dapat menyebabkan kehilangan hasil cukup signifikan setiap tahunnya, yaitu mencapai 15–25% (Yamamoto *et al.* 1977), bahkan dapat mencapai 30–40% (Triny *et al.* 2007). Hasil pengujian tahun-tahun sebelumnya menunjukkan bahwa gen ketahanan terhadap penyakit HDB *Xa7*, belum “terpatahkan” oleh beberapa patotipe HDB yang dominan berada di daerah endemik HDB di Indonesia (data *unpublished*). Oleh karena itu, gen *Xa7* potensial sebagai kandidat gen pengendali penyakit HDB di Indonesia, sehingga untuk mendapatkan sumber donor gen ini perlu dilakukan pencarian alel gen *Xa7* pada aksesi-aksesi plasma nutfah padi lokal Indonesia. Padi lokal adalah salah satu sumber genetik padi yang keberadaannya saat ini sudah terdesak oleh varietas unggul (Crowder 1997). Di lain pihak, karakterisasi keunggulan genetik dari plasma nutfah padi lokal tersebut masih belum terungkap (Silitonga *et al.* 1995). Berkaitan dengan hal tersebut tujuan dari penelitian ini adalah mengidentifikasi alel gen *Xa7* pada beberapa aksesi plasma nutfah padi lokal Indonesia dengan pendekatan *allele mining* menggunakan marka molekuler SNP (*single nucleotide polymorphism*) yang spesifik untuk *Xa7*.

BAHAN DAN METODE

Material Genetik dan Evaluasi Tingkat Ketahanan HDB

Material genetik yang digunakan adalah 96 nomor aksesi plasma nutfah padi lokal yang keragaman genetiknya telah teridentifikasi berdasarkan 30 marka SSR (Tabel 1). Beberapa aksesi tersebut termasuk ke dalam kelompok subspecies *Indica* dan *Tropical japonica* (Utami *et al.* 2006). Isolat HDB yang digunakan dalam penelitian ini adalah 3 strain HDB yang dominan di beberapa lokasi endemik HDB di Indonesia, yaitu strain III, IV, dan VIII dan 1 isolat koleksi BB Biogen yang secara relatif bersifat spesifik untuk gen *Xa7*, yaitu isolat IXO93-068 (Utami *et al.* 2007). Evaluasi tingkat ketahanan dari 96 nomor aksesi plasma nutfah terhadap 4 isolat HDB tersebut dilakukan di rumah kaca dan lapangan.

Inokulasi buatan penyakit HDB di rumah kaca dilakukan dengan metode inokulasi pengguntingan terhadap 5–10 rumpun tanaman contoh dari masing-masing nomor aksesi plasma nutfah. Sedangkan metode inokulasi buatan infeksi penyakit HDB di lapangan dilakukan dengan pengguntingan 5–10 rumpun tanaman di 5 titik pada salah satu diagonal dari setiap petak pengujian dari masing-masing nomor aksesi. Skoring tingkat serangan dilakukan berdasarkan skala intensitas serangan dan skala skor, sesuai dengan SES IRRI (1996).

Tabel 1. Akses plasma nutfah padi lokal yang digunakan untuk evaluasi tingkat ketahanan penyakit HDB dan identifikasi alel *Xa7*

No.	Plasma nutfah	No.reg.	Subspesies	No.	Plasma nutfah	No.reg.	Subspesies
1.	Hawara_Bunar	19285	Indica	51.	Rumbay	20968	Indica
2.	P_Timai	19974	Indica	52.	Pae_Gudo	6332	Indica
3.	Mashuri		Indica	53.	Sampang	5737	Indica
4.	Getik	5643	Indica	54.	Mendalet	5742	Indica
5.	Menta	5758	Indica	55.	Manggar	5744	Indica
6.	Gendjah_Mada	5856	Indica	56.	Ganefo	5648	Indica
7.	Pudak_Kuning	6204	Indica	57.	Pketan_Alay	C82	Indica
8.	Djedah	6601	Indica	58.	PBelanda	C98	Indica
9.	Tjere_Bandung	6858	Indica	59.	PA'gan	C116	Indica
10.	Komas_a	6877A	Indica	60.	PBa'an	C119	Indica
11.	Utri_Deli	5730	Indica	61.	PJata	C159	Indica
12.	Markuti	5754	Indica	62.	Sibau	19780	Trop.japonica
13.	Mutu	5758	Indica	63.	Padi_Jawa	19732	Trop.japonica
14.	Gemas	7072	Indica	64.	Melaya	19736	Trop.japonica
15.	Kruet_Sintang	8146	Indica	65.	Semirit	19839	Trop.japonica
16.	Rias	8244	Indica	66.	Gundil	12348	Trop.japonica
17.	Suling	21290	Indica	67.	Pare_Lambeun	15153	Trop.japonica
18.	Siretek	8194	Indica	68.	Ciganjur	21177	Trop.japonica
19.	Gondok	12571	Indica	69.	Pandan	21242	Trop.japonica
20.	Buban	13152	Indica	70.	Bumbuy_Inih	21244	Trop.japonica
21.	Bulang	13160	Indica	71.	Pulut_Timuru	21248	Trop.japonica
22.	Kartuna	13270	Indica	72.	Dupa		Trop.japonica
23.	Padi_Lungkai	14716	Indica	73.	PHitam	C2	Trop.japonica
24.	Ileuy	14785	Indica	74.	Ppulut_Saleng	C6	Trop.japonica
25.	Jerai	14964	Indica	75.	Ppulut_Longbanga	C13	Trop.japonica
26.	Nippon	14997	Indica	76.	Pketan_Merah	C18	Trop.japonica
27.	Pare_Kaligo_Lara	1514	Indica	77.	PPuti	C20	Trop.japonica
28.	Padi_Banten	15195	Indica	78.	PTimai	C28	Trop.japonica
29.	IR54	21165	Indica	79.	PImban	C37	Trop.japonica
30.	Batanghari	21174	Indica	80.	PAtok	C41	Trop.japonica
31.	Indragiri	21175	Indica	81.	Plong_Liyo	C47	Trop.japonica
32.	Lima_Bulan_Kamang	12399	Indica	82.	PMayun	C50	Trop.japonica
33.	Padi_Belanak_K	12674	Indica	83.	Ppulut_Jangan	C60	Trop.japonica
34.	Puteh_Gaca	12992	Indica	84.	Pubek_Bala	C68	Trop.japonica
35.	Teratai	13102	Indica	85.	Pketan_Sit	C75	Trop.japonica
36.	Pulut_Pagae	13163	Indica	86.	PSekrit	C107	Trop.japonica
37.	Inceklabu	13194	Indica	87.	PKrayan	C109	Trop.japonica
38.	Kuntu_AmeH_Sirandah_Hitam_Ekor	13222	Indica	88.	Pbat_Kanjat	C122	Trop.japonica
39.		13232	Indica	89.	PKelawit	C126	Trop.japonica
40.	Lantiak	13236	Indica	90.	PKendanggang	C131	Trop.japonica
41.	Padi_Tinggi	13253	Indica	91.	PPui	C135	Trop.japonica
42.	Bintang_Ladang	13284	Indica	92.	PSeribu	C142	Trop.japonica

43. Ketupat	14657	Indica	93. PKley	C146	Trop.japonica
44. Condong	14732	Indica	94. PTelengusan	C150	Trop.japonica
45. Arias_Halus	14749	Indica	95. PSiam	C166	Trop.japonica
46. Sipulut_Merah_A	14834A	Indica	96. PLibang	C182	Trop.japonica
47. Nuri_Bura	14895	Indica	97. TN1		Kontrol peka
48. Pare_Bakatokaka	15138	Indica	98. IRBB7		Kontrol Xa7
49. Pare_Mangata	15148	Indica			
50. Pulut_Namang	21256	Indica			

Data hasil pengujian fenotipe di atas selanjutnya dianalisis statistik dengan metode analisis gerombol (*Principal Component Analysis* - PCA). Analisis ini dilakukan untuk mengelompokkan data berdasarkan kemiripan sifat tingkat ketahanan ke-96 nomor aksesori plasma nutfah yang diuji berdasarkan metode pautan rata-rata (*average linkage*) (Karson 1982). Tujuan dari analisis PCA ini adalah untuk memperoleh subsampel representatif dari aksesori-aksesori yang bersifat superior tahan ataupun yang bersifat peka (sebagai kontrol negatif untuk alel *Xa7*). Subsampel aksesori-aksesori plasma nutfah yang terpilih selanjutnya digunakan dalam analisis *Xa7*-LD dan *Xa7*-SNP *genotyping*.

Desain primer *Xa7*-LD dan *Xa7*-SNP berdasarkan analisis gen kandidat dan DNA sequencing

Target dari penelitian *allele mining* ini adalah alel dari gen ketahanan HDB, *Xa7*. Gen ketahanan ini pada genom padi terdapat di kromosom 6 dengan ukuran ~1.200 Kb. Untuk mengidentifikasi gen sebesar ini maka didesain 60 pasang PCR primer, yang ditandai dengan nama primer *Xa7*-LD. Primer-primer *Xa7*-LD di atas tersebar dari contig AP004744 (pada posisi genom: 27.221.015–27.221.432 bp) sampai dengan contig AP004797 (pada posisi genom: 28.409.251–28.409.822 bp). Desain primer dilakukan berdasarkan *overlapping* sekuens sepanjang 800 bp untuk setiap kali sekuens. Hasil sekuens dengan primer *Xa7*-LD di atas selanjutnya dilakukan *multiple alignment* ke *rice genome database* (subspesies *Japonica*: <http://rgp.dna.affrc.go.jp> dan subspesies *Indica*: <http://www.genomics.org.cn>). Setiap hasil sekuens dari masing-masing produk PCR *Xa7*-LD yang diperoleh, selanjutnya digunakan untuk mengidentifikasi situs SNP, yaitu adanya polimorfisme 1 basa nukleotida (*single nucleotide polymorphism*) antara genom *Indica* dan genom *Japonica*. Berdasarkan situs SNP yang diperoleh selanjutnya didesain primer SNP, yang ditandai dengan nama *Xa7*-SNP dengan kriteria primer yang berakhir satu basa sebelum lokasi SNP yang diminati. Target primer *Xa7*-SNP adalah produk PCR sebesar 700–800 pb (pasang basa), di setiap 20–30 Kb daerah genom di sekitar dan dalam lokus gen-gen *Xa7*. Primer *Xa7*-SNP ini selanjutnya digunakan untuk kegiatan *Xa7*-SNP *genotyping* pada aksesori-aksesori plasma nutfah terpilih menggunakan *Beckman SNP primer extension kit*. Total primer *Xa7*-SNP yang digunakan adalah 12 primer yang tersebar di beberapa contig sekitar gen target *Xa7* (Tabel 2).

Tabel 2. Dua belas primer Xa7-SNP yang didesain dan digunakan untuk kegiatan Xa7-SNP *genotyping*

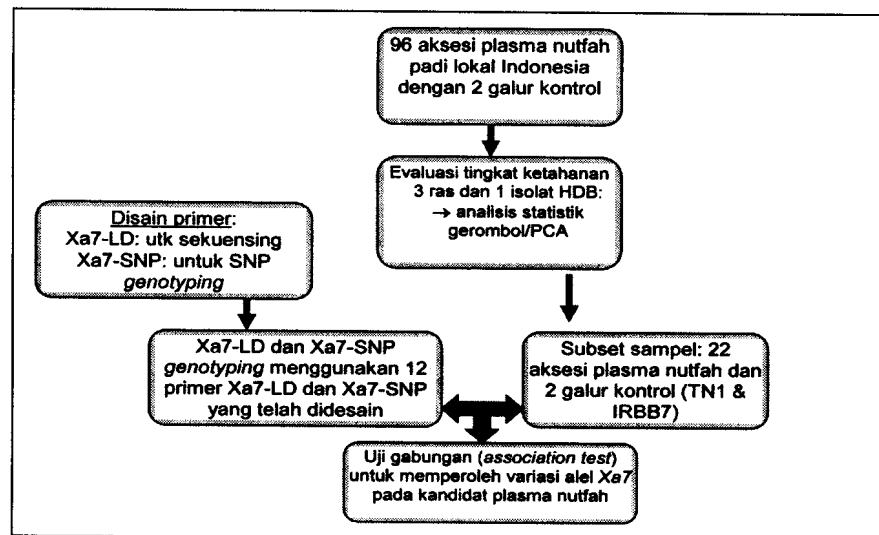
No. aksesori Contig	Lokus TIGR	Primer Xa7-LD	Primer Xa7-SNP	Posisi SNP (pb)	Motif SNP	Panjang (bp)	Deskripsi gen XaLD
AP004744	LOC_Os06g45120.1 (TIGR_LOCUS ID)	Xa7-LD 3	Xa7-SNP1	746	C/T	25	V-type ATPase, A subunit
AP003633	LOC_Os06g45560.1 (TIGR_LOCUS ID)	Xa7-LD16	Xa7-SNP2	664	G/A	30	Hypothetical protein
AP003633	LOC_Os06g45590.1 (TIGR_LOCUS ID)	Xa7-LD17	Xa7-SNP3	100	G/A	35	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, type I, putative
AP003628	LOC_Os06g45480.1 (TIGR_LOCUS ID)	Xa7-LD 13	Xa7-SNP4	582	C/T	40	HyuC-like protein [imported] - Arabidopsis thaliana
AP006454	LOC_Os06g46120.1 (TIGR_LOCUS ID)	Xa7-LD 34	Xa7-SNP5	633	G/T	45	Polyubiquitin, putative
AP003628	LOC_Os06g45500.1 (TIGR_LOCUS ID)	Xa7-LD 14	Xa7-SNP6	669	T/C	50	Copper-translocating P-type ATPase, putative
AP003628	LOC_Os06g45510.1 (TIGR_LOCUS ID)	Xa7-LD 15	Xa7-SNP7	418	G/A	55	Thioredoxin, putative
AP004989	LOC_Os06g46330.1 (TIGR_LOCUS ID)	Xa7-LD 42	Xa7-SNP8	342	C/T	60	Protein kinase domain, putative
AP003728	LOC_Os06g46370.1 (TIGR_LOCUS ID)	Xa7-LD 43	Xa7-SNP9	583	C/T	65	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, putative
AP003728	LOC_Os06g46380.1 (TIGR_LOCUS ID)	Xa7-LD 44	Xa7-SNP10	709	A/T	70	Protein prenyltransferase alpha subunit repeat, putative
AP004989	LOC_Os06g46310.1 (TIGR_LOCUS ID)	Xa7-LD 40	Xa7-SNP11	705	T/C	75	Metal transporter nramp1 (atnramp1)
AP004744	LOC_Os06g45350.1 (TIGR_LOCUS ID)	Xa7-LD 9	Xa7-SNP12	309	A/G	80	Expressed protein

Genotyping Xa7-SNP pada aksesi-aksesi terseleksi

Genotyping Xa7-SNP dilakukan pada 22 aksesi-aksesi plasma nutfah yang bersifat superior tahan berdasarkan analisis statistik untuk data hasil uji fenotipe di rumah kaca dan lapangan ditambah 2 galur kontrol, yaitu TN1 sebagai galur kontrol peka dan IRBB7 sebagai galur isogenik kontrol untuk gen Xa7. DNA dari plasma nutfah-plasma nutfah di atas diamplifikasi dengan primer Xa7-LD, dengan komposisi PCR: 2 ml 10X buffer PCR; 0,6 ml MgCl₂; 0,6 ml dNTP mix (10 mM); 1,2 ml Xa7-LD primer (F+R) (5 mM); 0,15 ml Taq Polymerase; 2 ml DNA template (10 ng/ml). Program PCR yang digunakan sebagai berikut: 94 °C, 2 menit untuk denaturasi awal; 94 °C, 45 detik untuk denaturasi; 55 °C, 45 detik untuk annealing; 68 °C, 2 menit untuk proses pemanjangan (extension) dan total siklus yang digunakan 29 siklus, proses pemanjangan terakhir pada 72 °C selama 7 menit. Setelah dilakukan purifikasi dengan enzim exonuclease I dan shrimp alkaline phosphatase (Exo/SAP), produk Xa7-LD yang diperoleh, selanjutnya diamplifikasi dengan primer Xa7-SNP menggunakan Beckman SNP primer extension kit, untuk menandai posisi target SNP di sekitar gen Xa7. Program PCR untuk Xa7-SNP adalah sebagai berikut: 96 °C, 3 menit untuk denaturasi awal; 94 °C, 20 °C proses denaturasi; 50 °C, 11 detik untuk annealing; total siklus sebanyak 25 siklus dan proses pemanjangan akhir dilakukan pada 72 °C selama 30 detik. Hasil dari proses SNP genotyping tersebut selanjutnya di-running di mesin genetic analyzer CEQ8000 setelah dilakukan purifikasi SAP.

Uji Gabungan (*association test*)

Signifikansi korelasi antara keberadaan polimorfisme SNP dengan data fenotipe yang diperoleh di rumah kaca dan lapangan untuk sifat ketahanan terhadap penyakit HDB dianalisis dengan Uji Gabungan (*association test*) menggunakan *software* Tassel2_9_4i. Secara garis besar tahapan analisis yang dilakukan dalam penelitian ini seperti pada diagram alur pada Gambar 1.



Gambar 1. Diagram alur tahapan penelitian pencarian alel gen ketahanan terhadap penyakit HDB, *Xa7*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengujian Fenotipe Tingkat Ketahanan terhadap 4 Isolat/Ras HDB

Data hasil pengujian fenotipe tingkat ketahanan terhadap 3 isolat dominan (yaitu isolat III, IV, dan VIII) dan 1 isolat yang relatif *correspond* untuk gen *Xa7*, yaitu isolat IXO93-068 menunjukkan adanya keragaman dalam respons tingkat ketahanannya. Keragaman ini terlihat dari hasil analisis gerombol yang menunjukkan tingkat kemiripan sebesar 76,5%.

Berdasarkan hasil analisis ini menunjukkan bahwa pada pengujian fase bibit dan dewasa di rumah kaca dari 96 aksesi plasma nutfah secara berurutan mengelompok menjadi 7 dan 6 gerombol. Sedangkan berdasarkan hasil pengujian di lapangan, tingkat ketahanan terhadap penyakit HDB dari 96 aksesi plasma nutfah tersebut, mengelompok menjadi 9 gerombol (data tidak ditampilkan). Berdasarkan hasil analisis gerombol di atas selanjutnya dipilih aksesi-aksesi plasma nutfah yang termasuk dalam gerombol terbaik (bersifat superior tahan) baik pada fase bibit, dewasa ataupun di lapangan. Di antara aksesi-aksesi yang terpilih tersebut adalah Parekaligolara, Gajahmada, Inceklabu, dan Pare Lambeun. Di samping aksesi-aksesi tersebut, dipilih juga beberapa aksesi dengan penampilan terbaik di setiap gerombol, sehingga total aksesi plasma nutfah terpilih sebanyak 22 aksesi plasma nutfah ditambah 2 galur kontrol, yaitu TN1 sebagai galur kontrol peka terhadap penyakit HDB dan IRBB7 sebagai galur isogenik untuk gen *Xa7*.

Secara keseluruhan ke 24 nomor aksesi di atas beserta respons tingkat ketahanannya ditampilkan pada Tabel 3. Data pada Tabel 3 tersebut menunjukkan bahwa respons tingkat ketahanan terhadap 4 isolat HDB pada 22 nomor aksesi plasma nutfah padi lokal beserta 2 galur kontrol (TN1 dan IRBB7) bervariasi dari sangat tahan (ST) sampai dengan sangat peka (SP). Keragaman respons ketahanan pada sampel material genetik yang digunakan ini penting untuk dipertahankan dalam penentuan subsampel, karena diperlukan untuk menjamin tersedianya semua kemungkinan variasi alel agar analisis LD untuk gen target *Xa7* lebih terandal. Di samping itu, Tabel 3 juga menunjukkan bahwa galur kontrol peka TN1 bersifat peka (P), hal ini menunjukkan bahwa pengujian di atas telah optimum. Sedangkan tanaman kontrol galur isogenik *Xa7*, IRBB7 menunjukkan respons agak tahan (AT). Respons AT untuk semua isolat ras dan isolat HDB yang digunakan pada galur IRBB7 ini menunjukkan aktivasi gen *Xa7* oleh isolat 93-229 tidak optimum. Hal ini terjadi karena belum diketahuinya faktor virulensi yang terdapat pada isolat-isolat uji yang digunakan, termasuk isolat 93-229, sehingga aktivasi spesifik gen *Xa7* belum optimum.

Namun demikian, ketahanan beberapa aksesi plasma nutfah terpilih di atas menunjukkan respons tahan terhadap isolat HDB dominan baik dalam pengujian di rumah kaca ataupun di lapangan. Beberapa aksesi ini berpotensi memiliki alel ketahanan terhadap penyakit HDB. Data fenotipe di atas selanjutnya digunakan untuk analisis *Xa7*-SNP *genotyping*.

Xa7*-SNP *genotyping

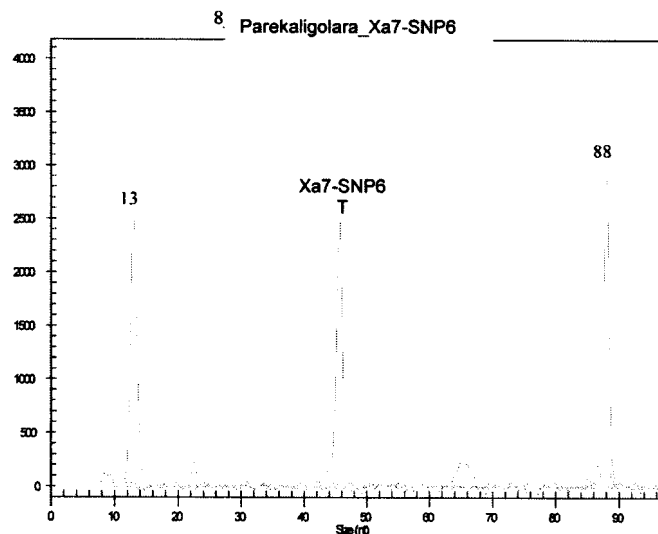
Analisis *genotyping* *Xa7*-SNP dilakukan menggunakan 12 primer SNP yang telah didesain di sekitar gen *Xa7* (Tabel 2) pada 22 sampel nomor aksesi plasma nutfah padi lokal dan 2 galur kontrol. Salah satu hasil analisis *genotyping* dengan primer *Xa7*-SNP6 yang di-*running* di mesin *genetic analyzer* CEQ8000, seperti pada Gambar 2.

Salah satu hasil *Xa7*-SNP *genotyping* pada Gambar 3 menunjukkan bahwa salah satu aksesi plasma nutfah padi yang dianalisis menggunakan primer *Xa7*-SNP6 yaitu Parekaligolara pada basa nukleotidanya ke 47 memiliki basa T (timin). Basa T pada lokus *Xa7*-SNP6 ini menunjukkan bahwa Parekaligolara mempunyai tipe *Xa7*-SNP6 yang termasuk dalam kelompok padi subspecies *Indica*. Data pada Tabel 2 mengindikasikan bahwa *Xa7*-SNP6 memiliki motif SNP T/C. Hal ini menunjukkan adanya polimorfisme basa nukleotida T (Timin) pada subspecies *Indica* dan C (Cytosin) pada subspecies *Tropical japonica*. IRBB7 sebagai tanaman kontrol isogenik gen *Xa7*, merupakan galur isogenik dari persilangan kultivar DV85 (*Indica*, asal Bangladesh) sebagai donor gen *Xa7* dengan kultivar IR24 (*Indica*, asal IRRI, sebagai tetua pemulih) (Sidhu *et al.* 1978; Ogawa *et al.* 1991), memiliki tipe *Xa7*-SNP kelompok subspecies *Indica* (data tidak ditampilkan).

Tabel 3. Respons tingkat ketahanan 21 akses plasma nutfah padi lokal terhadap 3 ras HDB dominan di lapangan, ras III, IV, dan VIII dan 1 isolat spesifik untuk gen *Xa7*, isolat 93-229

Sampel	Kel. sub-spesies	93-229	Stadia bibit			Stadia dewasa			Lapangan		
			III	IV	VIII	III	IV	VIII	III	IV	VIII
Gondok	Indica	AP	AP	AP	T	T	T	T	AT	AT	AT
Pulut Namang	Indica	P	T	T	T	AP	AP	T	AT	AT	AT
Manggar	Indica	P	ST	AP	AT	AT	AT	T	AP	AP	AP
Parekaligolara	Indica	AP	T	T	T	AT	AT	T	AT	AT	AT
P. Pui	Trop.jap	P	AT	AT	ST	AP	AT	AT	AT	AP	P
P. Kley	Trop.jap	AP	AT	T	ST	AT	AT	AT	AT	AP	P
P. Belanda	Indica	P	T	T	T	AT	AT	AT	AT	P	P
P.Puti	Trop.jap	AP	T	T	T	AP	AP	AP	AT	P	P
Sampang	Indica	AP	T	T	ST	AT	AT	AT	AT	P	P
P. Kendanggang	Trop.jap	AP	ST	AP	ST	AT	AT	AT	AT	P	P
Pae Gudo	Indica	P	T	AT	ST	T	AT	AT	AT	AT	AT
P. Siam	Trop.jap	AP	ST	AT	AP	AP	AP	AP	AT	AT	AP
Menta	Indica	AP	AT	ST	AP	AT	T	AP	AT	AP	AP
Kuntu Ameh	Indica	AP	T	T	T	T	AT	AT	AT	AT	AP
Pulut Long Banga	Trop.jap	AP	ST	AT	ST	AT	AT	AT	AT	P	P
Gajahmada	Indica	AP	AT	T	AT	AT	T	AT	AT	AT	AT
Melaya	Trop.jap	AT	AP	AP	-	T	AT	AT	AT	AP	AP
Semirit	Trop.jap	AT	AT	AT	P	P	-	-	AT	P	AP
Mahsuri	Indica	AT	AT	AT	AP	AT	AT	AT	AP	P	AP
Tjere Bandung	Indica	AT	AT	AP	-	AT	-	-	AT	P	P
Pandan	Trop.jap	AT	T	T	AP	AT	-	-	AT	P	P
IR54	Indica	AT	AT	T	T	AP	AT	AP	T	AT	AT
TN1	Japonica	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
IRBB7	Indica	AT	AT	AT	AT	AT	AT	AT	AT	AT	AT

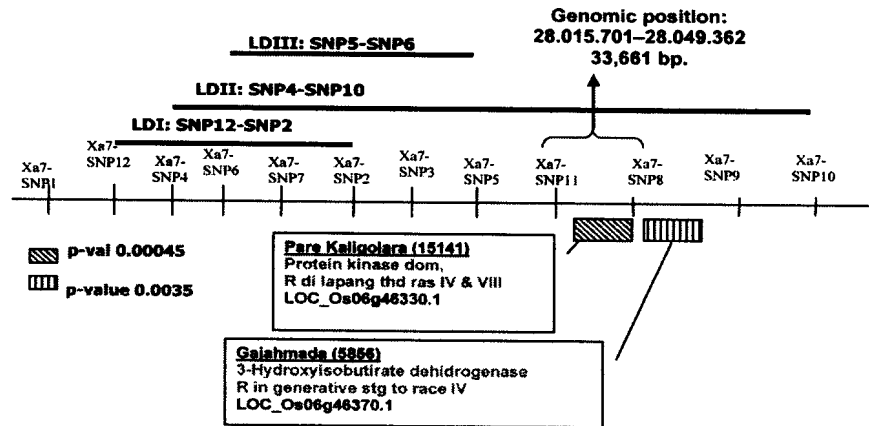
ST = Sangat tahan (0%); T = Tahan (1-5%); AT = Agak tahan (6-25%); AP = Agak peka (26-50%); P = Peka (51-75%); SR = Sangat rentan (76-100%).



Gambar 2. Genotipe salah satu sampel Parekaligolara dengan primer Xa7-SNP6. Pada lokus Xa7-SNP6, pada posisi basa ke-47 (di tengah) mempunyai basa nukleotida T (timin). Puncak di bagian kiri dan kanan adalah DNA standar yang berukuran 13 dan 88 basa nukleotida.

Berdasarkan data SNP *genotyping* dengan 12 primer Xa7-SNP di atas selanjutnya dilakukan analisis LD *mapping* gen target Xa7 dan diperoleh hasil seperti terlihat dalam Gambar 4. Hasil tersebut menunjukkan adanya 3 segmen LD dengan tingkat signifikansi polimorfis paling tinggi. Ketiga segmen LD Gen Xa7 di atas adalah LDI: SNP2 sampai SNP12 (meliputi LD16–LD9 dengan posisi contig = 27.370.133–27.541.931); LDII: SNP4 sampai SNP10 (meliputi LD13–LD44 dengan posisi contig = 27.451.531–28.100.952); dan LDIII: SNP5 sampai SNP6 (meliputi LD34–LD14 dengan posisi contig = 27.475.112–27.914.495). Posisi LDI, LDII, dan LDIII yang bersifat signifikan di atas seperti terlihat pada Gambar 3.

Untuk menentukan segmen mana yang mempunyai keterikatan dengan gen target, maka dilakukan uji gabungan (*association test*) antara data *genotyping* Xa7-SNP dengan data fenotipe. Uji lanjutan ini diperlukan untuk menentukan alel dari segmen LD mana dari lokus gen Xa7 yang berkontribusi secara nyata dalam membentuk sifat ketahanan terhadap penyakit HDB. Analisis dilakukan dengan Ujoint dan GLM *test* menggunakan program Tassel2_9_4i.

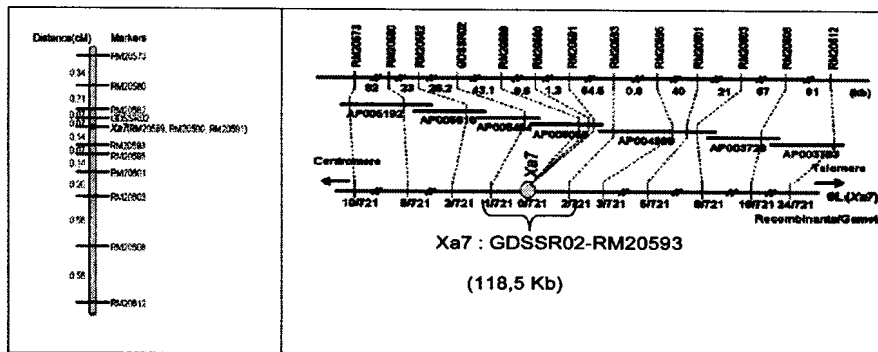


Gambar 3. Analisis Gabungan (*association test*) antara Xa7-SNP *genotyping* dengan data *phenotyping* tingkat ketahanan terhadap penyakit HDB, menggunakan ras III, IV, dan VIII, hasil pengujian di rumah kaca dan lapangan.

Hasil analisis di atas juga merupakan hasil plot LD *map* dari 12 marka Xa7-SNP yang menandai lokus alel yang berbeda untuk gen *Xa7*. Pada Gambar 3 ditunjukkan bahwa dari 12 primer Xa7-SNP yang didesain berdasarkan sekuens segmen gen *Xa7*, terdapat 2 segmen yang signifikan terhadap data fenotipe tingkat ketahanan terhadap penyakit HDB. Segmen pertama yang signifikan tersebut terdapat pada segmen antara marka Xa7-SNP11 sampai dengan Xa7-SNP8 (yaitu pada contig AP004989) dengan tingkat signifikansi P-val: 0,00045. Segmen ini terdeskripsi sebagai gen *protein kinase domain* dan ditandai dengan fenotipe tanaman yang bersifat tahan pada pengujian lapangan terhadap ras IV dan VIII. Plasma nutfah dengan penampilan seperti itu didapatkan pada Parekaligolara (no. akses 15141). Segmen yang lain ditandai antara marka Xa7-SNP8 sampai dengan Xa7-SNP9 (contig AP003728) dengan tingkat signifikansi yang lebih rendah, yaitu P-val: 0,0035. Segmen ini terdeskripsi sebagai gen *3-hydroxyisobutirate dehidrogenase* dan ditandai dengan fenotipe tanaman yang bersifat tahan pada fase dewasa terhadap ras IV. Plasma nutfah dengan penampilan seperti itu ditunjukkan oleh Gajahmada (no. akses 5856). Kedua akses, Parekaligolara dan Gajahmada termasuk kelompok subspecies *indica*. Kedua plasma nutfah ini memiliki genotipe Xa7-SNP yang sama dengan galur isogenik IRBB7 sebagai kontrol alel gen *Xa7* yang juga memiliki tipe alel *indica*. Namun demikian kedua akses plasma nutfah di atas memiliki variasi alel yang berbeda untuk gen *Xa7*. Variasi alel *Xa7* yang terdapat pada plasma nutfah Parekaligolara berkaitan dengan *protein kinase domain*, sedangkan variasi alel yang terdapat pada plasma nutfah Gajahmada berkaitan dengan protein *3-hydroxyisobutirate dehidrogenase*. Meskipun informasi ini masih perlu dikonfirmasi lebih lanjut, namun terdapat indikasi bahwa kedua akses plasma nutfah padi lokal di atas dapat dimanfaatkan sebagai sumber alel gen

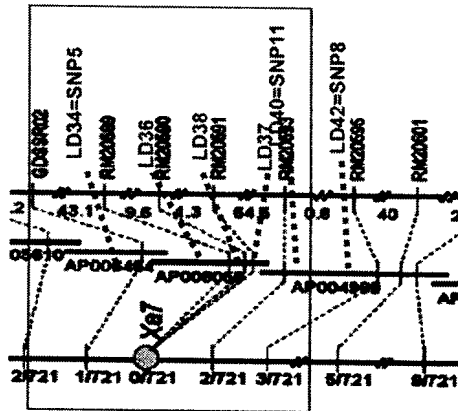
Xa7 yang selama ini belum diketahui. Berdasarkan hasil di atas, maka marka *Xa7*-SNP8 dan *Xa7*-SNP11 adalah marka yang terdekat dengan gen *Xa7* dari 12 marka *Xa7*-SNP yang didesain yang dapat digunakan untuk membantu proses seleksi plasma nutfah ataupun hasil pemuliaan sebagai marka MAS (*marker assisted selection*).

Salah satu posisi LD *map* yang signifikan di atas, yaitu LD *map* pada posisi genomik 28.015.701–28.049.362 di atas, yaitu yang terdapat pada contig AP004989, berdekatan dengan hasil pemetaan fisik melalui BAC klon gen *Xa7* pada tanaman Nipponbare yang dilakukan oleh Chen *et al.* (2002) dan Porter *et al.* (2003), yang menyebutkan bahwa gen *Xa7* terletak sepanjang contig AP005192 sampai dengan contig AP004989, yaitu posisi genomik 27.735.172–28.015.701. Sedangkan hasil penelitian terbaru pemetaan gen *Xa7* oleh Chen *et al.* (2008) diketahui bahwa gen *Xa7* terdapat pada contig AP006056 dengan posisi genomik: 27.953.543–27.976.665. Chen *et al.* (2008), menyebutkan bahwa gen ketahanan *Xa7* pada genom padi terpetakan di kromosom 6 dengan interval ukuran sebesar 118,5 Kb. Pemetaan gen *Xa7* dilakukan dengan membuat populasi F₂ dari persilangan IR42 dan NIL IRBB7. Hasil pemetaan *Xa7* oleh Chen *et al.* (2008) ini seperti yang terlihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Pemetaan gen *Xa7* oleh Chen *et al.* (2008). *Xa7* terpetakan pada posisi antara marka GDSSR02 dan RM20593 dengan jarak interval sebesar 118,5 Kb pada contig: AP006454, AP006056, dan AP004989.

Gambar 4 di atas menunjukkan bahwa di antara 5 marka yang terpaut dengan gen *Xa7*, terdapat 3 marka yang bersifat *co-segregation* dengan gen *Xa7*, yaitu RM20589, RM20590, dan RM20591, ketiganya terdapat pada contig AP006056. Berdasarkan hasil pemetaan LD pada Gambar 3 apabila dibandingkan dengan hasil pemetaan gen *Xa7* oleh Chen *et al.* (2008) pada Gambar 4, menunjukkan adanya kesamaan segmen posisi gen *Xa7*, yaitu AP006454 dan AP004989. Pada kedua segmen ini terdapat 2 marka SNP yang didesain termasuk dalam posisi peta gen *Xa7*, yaitu *Xa7*-SNP5 pada AP006454 dan *Xa7*-SNP11 pada AP004989. Secara relatif posisi marka LD dan SNP yang telah didesain seperti ditunjukkan pada Gambar 5.

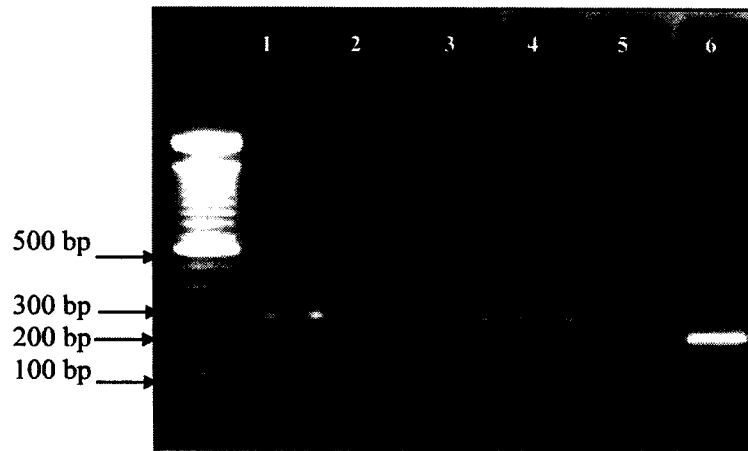


Gambar 5. Peta gen *Xa7* (kotak merah) terhadap beberapa marka *Xa7*-LD dan *Xa7*-SNP.

Gambar 5 menunjukkan bahwa marka *Xa7*-LD42 atau *Xa7*-SNP8 yang berdasarkan analisis LD bersifat signifikan ($P_{\text{val}} = 0,0035$), yaitu pada plasma nutfah Gajahmada (Gambar 3) tetapi berdasarkan hasil Chen *et al.* (2008) berada di luar posisi gen *Xa7*. Hal ini menunjukkan bahwa hasil pemetaan LD gen *Xa7* lebih luas 16,3 Kb dibandingkan dengan hasil pemetaan berdasarkan populasi persilangan. Adanya perluasan LD di sekitar lokus gen target terkait dengan proses domestikasi galur-galur padi lokal yang telah terjadi selama beberapa generasi.

Hasil analisis PCR menggunakan 3 marka yang bersifat *co-segregation* dengan gen *Xa7*, yaitu RM20589, RM20590, dan RM20591 di atas menunjukkan bahwa marka RM20589 bersifat polimorfis pada 2 aksesori terpilih, yaitu Parekaligolara dan Gajahmada dibandingkan dengan galur peka TN1 dan galur isogenik IRBB7 (Gambar 6). Sedangkan 2 marka lainnya, yaitu RM20590 dan RM20591 bersifat monomorfis (hasil tidak ditampilkan). Hasil pada Gambar 6 menunjukkan bahwa dengan primer RM20589, plasma nutfah Parekaligolara diperoleh 2 fragmen hasil PCR, yaitu berukuran sekitar 300 bp dan 500 bp.

Sedangkan pada plasma nutfah Gajahmada dan IRBB7 hanya diperoleh fragmen hasil PCR yang berukuran kurang lebih 300 bp. Pada galur peka TN1 tidak diperoleh fragmen hasil PCR. Hasil ini mengindikasikan bahwa galur Parekaligolara, Gajahmada, dan IRBB7 bersifat polimorfis terhadap galur peka TN1 yang tidak menunjukkan adanya fragmen hasil PCR tersebut.



Gambar 6. Hasil analisis PCR dua aksesori plasma nutfah terpilih beserta marka 100 bp. Urutan: 1. Parekaligolara, 2. Bio8 (galur tahan pembanding), 3. Gajahmada, 4. IRBB7 5. TN1, 6. Bio1 (galur tahan pembanding), menggunakan primer RM20589.

Untuk mengkonfirmasi lebih lanjut, fragmen hasil PCR pada salah satu plasma nutfah terpilih, Parekaligolara dan galur isogenik IRBB7 disekuens untuk dibandingkan antar-keduanya. Adapun hasil analisis basa nukleotida pada Parekaligolara dibandingkan dengan IRBB7 adalah seperti pada Gambar 7. Hasil analisis pembandingan sekuens basa nukleotida pada Gambar 8 di atas menunjukkan bahwa dari total 300 basa nukleotida yang disekuens, posisi basa 20 sampai dengan 295 memiliki tingkat kesamaan yang tertinggi, yaitu mencapai 78% dari 300 basa nukleotida yang dibandingkan. Pada posisi tersebut menunjukkan adanya beberapa *gap* dan perbedaan basa nukleotida. *Gap* basa nukleotida terdapat baik pada sekuens galur isogenik IRBB7 ataupun Parekaligolara. Terdapat 46 *gap* basa nukleotida, yang meliputi 38 *gap* terdapat pada galur Parekaligolara dan 8 *gap* pada galur isogenik IRBB7. Sedangkan perbedaan basa nukleotida bervariasi pada 1 basa atau 4 basa nukleotida yang berturutan.

```

      .....| .....| .....| .....| .....|
           10      20      30      40      50
IRBB7   TTTTGGTTGT ATCCACTGTA AAAGGAATTT GGATGTGGGG ATTGT-GTGC
Parekali CCGGGTTTGT ATCCACTGTA AA-GGAATTT G-ATGTGGTG ATTGTCTGTGC
golara

      .....| .....| .....| .....| .....|
           60      70      80      90     100
IRBB7   AAT-GATGG CAGAGATCAT TATAGTGAAG GTCTGATTAG AGTCTTCAA
Parekali AATCCGAT-G CAGAGATCAT T-TAG-GAAG GTC-GATTAG AGTCTTCAA
golara

      .....| .....| .....| .....| .....|
           110     120     130     140     150
IRBB7   AATGCGTCAT GTCAAAACCTT GAGCCCAAGG CCGAAGTTGT ACAATTCACG
Parekali GGTCCGCCAC GTC-----TT GAGCCCA--A C---GT-GT ACACCT-ACA
golara

      .....| .....| .....| .....| .....|
           160     170     180     190     200
IRBB7   T-ATACTGAG TTTGTTGGC CTATGCGGTT TTCCAAGCAA GTTGGGAGGA
Parekali TCATACTG-G TTTGTTG-- CTATGCGC-- --CCAAGCAA GTTGGGAGGA
golara

      .....| .....| .....| .....| .....|
           210     220     230     240     250
IRBB7   AAGATGAGAA GG-GCCTTAG ATGATAATGA GCTAGCTGAT CTGGAACTGT
Parekali --GATG-GAA GGC GCCTTAG GCGATA-TGA G-TGGC-G-- CGGG--CTGC
golara

      .....| .....| .....| .....| .....|
           260     270     280     290     300
IRBB7   TGCTTTCAA TG-GTGAATC TTTAAAA-GC TCATA-CAGC CATCATTTCA
Parekali -GC GCCCAA GCCGTGAA-C TACAAAAGC TCATAGCAGC CATC--TTCA
golara

```

Gambar 8. Analisis perbandingan sekuens basa nukleotida hasil PCR dengan primer RM20589 pada plasma nutfah Parekaligolara dan galur isogenik IRBB7. Basa nukleotida yang bertanda hijau menunjukkan adanya perbedaan di antara kedua galur yang dianalisis.

Dengan diperolehnya variasi basa nukleotida berdasarkan marka RM20589 yang berkosegregasi dengan gen *Xa7* pada galur isogenik IRBB7 dan Parekaligolara, mengindikasikan adanya variasi alel baru untuk gen *Xa7* yang terdapat pada galur plasma nutfah padi lokal, Parekaligolara.

KESIMPULAN

Telah diperoleh variasi alel baru gen *Xa7*, yaitu variasi alel yang berkaitan dengan protein *kinase domain*, yaitu terdapat pada plasma nutfah Parekaligolara (*Indica*, 15141), dengan fenotipe tanaman yang bersifat tahan pada pengujian lapangan terhadap ras IV dan VIII dan variasi alel yang berkaitan dengan

protein *3-hydroxyisobutirate dehidrogenase*, yang terdapat pada plasma nutfah Gajahmada (*Indica*, 5856), dengan fenotipe tanaman yang bersifat tahan pada fase dewasa terhadap ras IV.

Kedua variasi alel untuk gen Xa7 di atas terpetakan pada posisi LD map 28,05–28,1 Mb dari kromosom 6, yang ditandai dengan marka yang terpaut Xa7-SNP8 dan Xa7-SNP11. Kedua marka tersebut dapat digunakan sebagai marka MAS (*marker assisted selection*) untuk membantu proses seleksi plasma nutfah dan galur-galur hasil pemuliaan.

DAFTAR PUSTAKA

- Chen, M., G. Presting, W.B. Barbazuk, J.L. Goicoechea, B. Blackmon, G. Fang, H. Kim, D. Frisch, Y. Yu, S. Sun, S. Hgingbottom, J. Phimphilai, D. Phimphilai, S. Thurmond, B. Gaudette, P. Li, J. Liu, J. Hatfield, D. Main, K. Farar, C. Henderson, L. Barnett, R. Costa, B. WilliaAP, S. Walser, M. Atkins, C. Hall, M.A. Budiman, J.P. Tomkins, M. Luo, J. Bancroft, J. Salse, F. Regad, T. Mohapatra, N.K. Singh, A.K. Tyagi, C. Soderlund, R.A. Dean, R.A. Wing. 2002. An integrated physical and genetic map of the rice genome. *Plant Cell*, 14: 537–545.
- Chen, S., Z. Huang, L. Zeng, J. Yang, Q. Liu, X. Zhu. 2008. High resolution mapping and gene prediction of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* resistance gene Xa7. *Mol Breeding*: 11032-009-9187-1.
- Crowder, L.V. 1997. *Genetika Tumbuhan*. Gadjah Mada University Press.
- Feltus, A.F., J. Wan, S.R. Schulze, J.C. Estill, N. Jiang, A.H. Paterson. 2004. An SNP resource for rice genetics and breeding based on subspecies *Indica* and *Japonica*. *J. Genome Res.* 14: 1812–1819.
- Flint-Garcia, S.A., J.M. Thornsberry, E.S. Buckler IV. 2003. Structure of linkage disequilibrium in plants. *J. Annu.Rev. Plant.Biol.* 54: 357–374.
- IRRI. 1996. *Standard Evaluation System for Rice*. IRRI. Manila, Philipppines.
- Latha, R., L. Rubia, J. Bennett, and A.P. Swaminathan. 2004. Allele mining for stress tolerance genes in *Oryza* species and related germplasm. *Mol. Biotechnol.* 27: 101–108.
- Morton, N.E. 2005. Linkage disequilibrium and association pemetaan. *J. Clin. Invest.* 115: 1425–1430.
- Ogawa, T., T. Yamamoto, G.S. Khush, T.W. Mew. 1991. Breeding of near-isogenic lines of rice with single genes for resistance to bacterial blight pathogen (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*). *Japan J. Breed.* 41: 523–529.

- Porter, B.W., J.M. Chittoor, M. Yano, T. Sasaki, F.F. White. 2003. Development and mapping of markers linked to the rice bacterial blight resistance gene Xa7. *Crop Science*, 43(4): 1484–1492.
- Rangan, L., S. Constantino, G.S. Khush, A.P. Swaminathan. 1999. The feasibility of PCR-based allele mining for stress tolerance genes in rice. *Rice Genet. Newsletter*. 16: 43–47.
- Shidu, G.S., G.S. Khush and T.W. Mew. 1978. Genetic analysis of bacterial blight resistance in seventy-four cultivars of rice, *Oryza sativa* L. *Theor. Appl. Genet.* 53: 105–111.
- Tanskley, S.D. and S.R. McCouch. 1997. Seed banks and molecular maps; unlocking genetics potential from the wild. *Science* 277: 1063–1066.
- ThoAPon, M.J. 2004. Microsatellite Fragment Sizing on the CEQ 8000: BB-Biogen Standard Operating Procedure Series. Indonesian Center for Agricultural Biotechnology and Genetic Resources Research and Development. Bogor, Indonesia. P. 1–10.
- Triny, S.K., Hanarida I., Utami D.W., Koerniati S., Ambarwati A.D., Apriana A., Sisharmini S. 2007. Evaluasi ketahanan populasi haploid ganda silangan IR64 dan *Oryza rufipogon* terhadap hawar daun bakteri pada stadia bibit. *J. Plasma Nutfah (Submitted)*.
- Silitonga, S.T., Hifni H.R., Amir M., Kardin K., Nasution A. 1995. Evaluasi keragaman genetik plasma nutfah padi. *Dalam: Kinerja Penelitian Tanaman Pangan*. Puslitbangtan. Bogor. p. 20–23.
- Utami, D.W., E.M. Septiningsih, T.S. Kadir, Fatimah, dan S. Yuriyah. 2010. *Allele Mining* untuk identifikasi gen ketahanan penyakit hawar daun bakteri, Xa7 pada plasma nutfah padi lokal Indonesia. *Jurnal Agrobiogen* 6(1): 1–9.
- Utami, D.W., Septiningsih E.M., Nasution A., Santosa, Fatimah, Yuriyah S. 2006. Pencarian alel-alel baru untuk gen-gen penting toleran cekaman biotik dan abiotik pada padi. Struktur populasi keragaman genetik plasma nutfah padi dan evaluasi ketahanan terhadap penyakit blas (*Pyricularia grisea*) untuk pencarian alel-alel baru. Laporan Hasil Penelitian APBN. BB-Biogen, Badan Litbang Pertanian, Departemen Pertanian.
- Yamamoto, T., Hifni H.R., Machmud M., Nishizawa T., dan Tantera D.M. 1977. Variation in pathogenicity of *Xanthomonas oryzae* and resistance varieties to the pathogen. Contribution 28. *Centr. Res. Inst. Agric.* Bogor. 22 p.