

Pemanfaatan Teknologi Asosiasi Lintas Genom (*Genome Wide Association Study*) dalam Pemuliaan Tanaman

Dwinita W. Utami

Balai Besar Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Jln. Tentara Pelajar 3A, Bogor, 16111.

Email : dnitawu@windowslive.com

Abstract

Plant breeding technology has been developed in line with the process of green revolution that is applied at the end of the year' 60s. This technology has proven to endorse the productivity of food crops that was on rice it was able to fulfill food basic consumes at that time. Nevertheless, along with an increasing the population, in current progress, there has been no significant technology which is increasing rice productivity. Then lastly, there were new trend that molecular marker technology was used to support plant breeding program. The utilization of molecular markers technology in plant breeding is potentially to speed up and increase the precision of selection process. One of the application molecular markers technology are on linkage study between the genes and potential traits in the segregation of rice population, so that the gene target could be localized on definitive genetic map in rice genome. Based on genetic map information, the selection process could be precise focused on the target regions of the rice lines. The similar basic approach was used also in Genome Wide Association Study (GWAS). Gene mapping technology is the development of which prerequisite the genotype and the phenotype data. Different with the conservative genetic mapping study, GWAS technology may be conducted in hundreds of the accession of germplasm without segregation's population. Through the GWAS application, the diversity of rice germplasm could be more intelligible as genetic resources for crop improvement.

Keywords: Genome Wide Association Mapping; Plant breeding; Crop improvement

Abstrak

Teknologi pemuliaan tanaman berkembang seiring dengan kemajuan teknologi revolusi hijau yang diterapkan pada akhir tahun 60-an. Teknologi ini terbukti mampu mendongkrak produktivitas tanaman padi hingga mampu memenuhi kebutuhan pangan nasional. Namun seiring dengan peningkatan jumlah penduduk, dalam perkembangannya belum ada teknologi yang mampu memenuhi swasembada kebutuhan pangan. Akhir-akhir ini teknologi pemuliaan mendapat dukungan inovasi biologi molekuler. Pemanfaatan teknologi marka molekular dalam pemuliaan berpotensi mempercepat dan meningkatkan presisi seleksi. Teknologi ini antara lain diaplikasikan untuk menganalisis keterpautan dengan sifat penting pada populasi segregasi, sehingga gen target dapat terpetakan dalam genom tanaman. Studi asosiasi genom (*Genome Wide Association Study/GWAS*) adalah pengembangan dari teknologi pemetaan gen yang analisisnya memerlukan data genotipe dan fenotipe. Berbeda dengan studi pemetaan gen, GWAS dapat dilakukan pada ratusan aksesi plasma nutfah tanpa memerlukan populasi segregasi hasil silangan antara dua tetua. Melalui teknologi GWAS, keragaman plasma nutfah dapat diungkap lebih detail sebagai sumber genetik untuk perbaikan varietas.

Katakunci: *Genome Wide Association Mapping*; pemuliaan tanaman; perbaikan varietas

Pendahuluan

Indonesia sebagai salah satu Negara yang mempunyai keanekaragaman hayati yang tertinggi di dunia, merupakan modal strategis yang potensial dalam rangka meningkatkan produktifitas, kualitas serta daya saing komoditas tanaman. Melalui kegiatan pemuliaan, dapat dihasilkan beragam kultivar baru yang selain memiliki tingkat produktifitas tinggi, juga memiliki beberapa karakter lain yang mendukung upaya peningkatan kualitas dan daya saing. Pemuliaan tanaman sendiri diartikan sebagai serangkaian kegiatan penelitian dan pengembangan genetik tanaman untuk merakit kultivar / varietas unggul yang berguna bagi kehidupan manusia. Dalam UU RI nomor 29 Tahun 2000 tentang Perlindungan Varietas Tanaman disebutkan bahwa pemuliaan tanaman adalah rangkaian kegiatan penelitian dan pengujian atau kegiatan penemuan dan pengembangan suatu varietas, sesuai dengan metode baku untuk menghasilkan varietas baru dan mempertahankan kemurnian benih varietas yang dihasilkan.

Pada dasarnya pemuliaan tanaman sudah dilakukan petani sejak beberapa abad yang lalu, yaitu semenjak mereka menerapkan sistem budi daya menetap. Mereka telah mengembangkan varietas yang sesuai untuk memenuhi kebutuhannya melalui seleksi yang didasarkan pada naluri dan pengalamannya. Sejalan dengan perkembangan dan kemajuan ilmu genetika, pemuliaan berkembang sebagai ilmu pengetahuan dan juga seni untuk mengubah tanaman berdasarkan fakta genetik untuk memperbaiki keturunan tanaman demi kemsalahatan manusia (Allard, 1960; Sleper dan Poehlman, 2006). Di Indonesia pemuliaan tanaman padi (dikenal sebagai pemuliaan konvensional) diawali dengan seleksi populasi varietas lokal, kemudian diikuti dengan pembentukan populasi persilangan dan pengembangan sistem seleksi untuk beberapa karakter

unggul. Pemuliaan tanaman konvensional telah menghasilkan berbagai varietas unggul, terutama dari segi produktifitas yang tinggi, ketahanan dan toleransi terhadap cekaman bitik dan abiotik, umur genjah dan kualitas gabah yang lebih baik. Namun pemuliaan konvensional dihadapkan pada beberapa kendala, seperti terbatasnya sumber gen dalam plasma nutfah padi budidaya, waktu seleksi yang relatif panjang serta kompleksitas seleksi fenotipe suatu karakter tertentu karena pengaruh faktor lingkungan (Somantri, 2013). Untuk kendala yang terakhir ini nampaknya merupakan kendala terberat mengingat perubahan iklim saat ini sudah melanda di berbagai belahan dunia.

Perkembangan teknologi molekuler membuka lembaran baru dalam membantu memecahkan masalah yang dihadapi oleh pemuliaan konvensional. Melalui aplikasi marka molekuler dalam pemuliaan dimungkinkan untuk meningkatkan presisi hasil seleksi dari program pemuliaan yang dikembangkan. Beberapa varietas padi unggul yang dirakit melalui seleksi menggunakan marka molekuler telah dihasilkan, antara lain ialah varietas unggul Angke dan Conde (SK Mentan : 635/Kpts/TP.240/12/2001), yang masing-masing memiliki gen ketahanan terhadap penyakit Hawar Daun Bakteri, *Xa5* dan *Xa7*; Varietas Inpari-Blas (SK No:3920/Kpts/SR.120/3/2013) dan Varietas Inpari-HDB (SK No :3916/Kpts/SR.120/3/2013). Keduanya merupakan varietas unggul turunan dari spesies padi liar *Oryza rufipogon* (Utami *et al*, 2008). Dihasilkannya varietas-varietas unggul tersebut merupakan bukti sukses dari pemanfaatan marka molekuler dalam mendukung perakitan varietas unggul. Dengan demikian teknologi marka molekuler telah memberi andil nyata dan mendukung ketahanan pangan nasional. Pengembangan sistem seleksi berbasis marka molekuler saat ini telah diotomatisasi dengan kapasitas volume besar (*highthroughput*), sehingga dapat mempercepat proses seleksi lebih efisien. Dengan mesin *iScan-Illumina* menggunakan teknik *GoldenGate genotyping assay* dapat dideteksi puluhan hingga

ratusan genotype menggunakan 384 atau 1536 marka molekuler dalam satu kali reaksi (*running*) (Utami *et al*, 2013). Makalah ini akan menguraikan salah satu pengembangan teknologi marka molekuler terkini, yaitu teknologi asosiasi lintas genom (*Genome Wide Association Study/GWAS*) dan pemanfaatannya dalam perakitan varietas unggul.

Kegiatan Pemuliaan Tanaman

Hakekat dari kegiatan pemuliaan tanaman ialah pengembangan suatu metode yang secara sistematis memanfaatkan keragaman genetic plasma nutfah untuk menghasilkan varietas baru yang lebih baik dari sebelumnya. Sedangkan dalam kaitannya dengan aspek molekuler, kegiatan pemuliaan tanaman ialah kegiatan mengubah susunan basa nukleotida melalui suatu persilangan dari suatu individu atau populasi tanaman untuk tujuan tertentu. Pemuliaan tanaman kadangkala disamakan dengan penangkaran tanaman yaitu kegiatan memelihara tanaman untuk memperbanyak dan menjaga kemurniannya. Selain melakukan penangkaran, pemuliaan juga berupaya memperbaiki mutu genetik sehingga diperoleh tanaman yang lebih bermanfaat. Dalam kaitan dengan kegiatan pemuliaan, terdapat suatu istilah yaitu ‘domestikasi’. Domestikasi merupakan pengadopsian tumbuhan atau hewan dari kehidupan liar ke dalam lingkungan sehari-hari manusia. Dalam arti yang sederhana, domestikasi merupakan proses ‘penjinakan’ yang dilakukan terhadap spesies liar. Perbedaannya apabila penjinakan dilakukan pada individu, sedangkan domestikasi melibatkan populasi, seperti seleksi, pemuliaan (perbaikan keturunan), serta perubahan perilaku/sifat dari organisme yang menjadi obyeknya (Wikipedia, 2014). Suatu tanaman dikatakan telah terdomestikasi apabila sejumlah penampilannya mengalami perubahan akibat campur tangan manusia dalam pertumbuhan dan perbanyakannya (Hirst, 2013).

Para petani pada masa awal pertanian selalu menyimpan sebagian benih untuk pertanaman berikutnya dan tanpa sengaja melakukan pemilihan (seleksi) terhadap tanaman yang kuat karena hanya tanaman yang kuat mampu bertahan hingga panen (Zohary dan Hopf, 2000).

Proses domestikasi alami yang telah terjadi selama sekian banyak generasi pada suatu spesies dapat digunakan untuk mendeteksi lokasi keterpautan gen yang terbentuk secara alami. Lokasi inilah yang kemudian dikenal sebagai *LD (Linkage Disequilibrium) region*. Apabila 2 gen atau karakter atau lokus bersifat LD maka kedua gen atau karakter atau lokus tersebut bersegregasi secara bersama (*co-segregation*) atau terpaut pada posisi genetik yang sangat dekat (Morton, 2005). Keterpautan antar dua gen atau karakter atau lokus inilah merupakan hasil dari proses domestikasi yang telah terjadi selama beberapa generasi.

Pemanfaatan Marka Molekuler dalam Pemuliaan Tanaman

Pemuliaan tanaman berbasis marka molekuler dikembangkan pada tahun 80-an sejalan dengan perkembangan teknologi marka DNA (Moeljopawiro, 2012). Penemuan struktur *deoxyribonucleic acid* (DNA) mendasari pengembangan marka DNA (Watson dan Crick, 1953). Marka molekuler adalah penanda suatu gen pengendali sifat tertentu yang dikembangkan berdasarkan sekuen pengapit dari gen-gen yang ditargetkan (Wikipedia, 2014). Pengembangan marka molekuler sejalan dengan perkembangan bidang ilmu Bioteknologi, khususnya dalam pengungkapan sekuen genom dari plasma nutfah tertentu. Marka molekuler dapat digunakan untuk menandai gen target pada sejumlah aksesori plasma nutfah, sehingga memungkinkan untuk menyeleksi sejumlah aksesori plasma nutfah atau introgresi progeninya sesuai dengan tujuan yang diinginkan. Dalam tinjauan yang lebih luas, pengembangan marka molekuler memungkinkan untuk mengungkap potensi manfaat keragaman plasma nutfah atau yang dikenal dalam upaya bioprospeksi. Bioprospeksi

sendiri berasal dari kata *biodiversity* dan *prospecting* yang bermakna proses pencarian sumber daya genetik untuk kepentingan komersial (Moeljopawiro, 1999; Muchtar,2001). Dengan demikian marka molekuler merupakan *tools* dalam bioprospeksi plasma nutfah.

Perkembangan teknologi marka DNA memungkinkan untuk aplikasi teknologi berbasis genomik dalam program pemuliaan. Aplikasi teknologi genomik ini dapat mendasari dalam berbagai aktivitas pemuliaan yang meliputi (a) memahami gen yang mengatur karakter kuantitatif sehingga pemuliaan lebih efektif, (b) introgresi karakter sederhana secara cepat melalui silang balik sehingga mengurangi jumlah silang balik yang harus dilakukan, (c) seleksi dini, secara tidak langsung dan mudah, terhadap karakter yang dikendalikan gen tetapi tidak mudah dideteksi secara dini seperti gen untuk lisin dan triptofan pada jagung, dan (d) tujuan yang tidak dapat dicapai dengan pemuliaan konvensional, seperti gen-gen ketahanan terhadap penyakit tertentu yang tidak dapat dibedakan secara fenotipik tetapi diperankan oleh gen yang berbeda.

Pemanfaatan sumber daya genetik dapat dimulai dari pencarian gen sampai seleksi karakter untuk menghasilkan varietas yang bernilai tambah. Terhadap sumber daya genetik yang sudah diketahui karakternya dilakukan identifikasi gen dengan membuat populasi galur inbrida rekombinan, galur isogenik, atau mutan. Dari populasi tersebut dilakukan pemetaan lokus pengatur sifat kuantitatif maupun genomik fungsional untuk mendapatkan gen-gen kandidat. Selain itu juga dapat dikembangkan teknologi pencarian alel potensial (*allele mining*) melalui pengembangan disain marka molecular berdasarkan urutan (*sequence*) basa nukleotida dari gen target (Biselli *et al*, 2014). Marka yang terdisain selanjutnya digunakan sebagai pelacak dalam genom plasma nutfah yang kita miliki baik berupa varietas lokal ataupun spesies/kerabat liar padi, sehingga didapatkan alel terkait dengan karakter yang diinginkan.

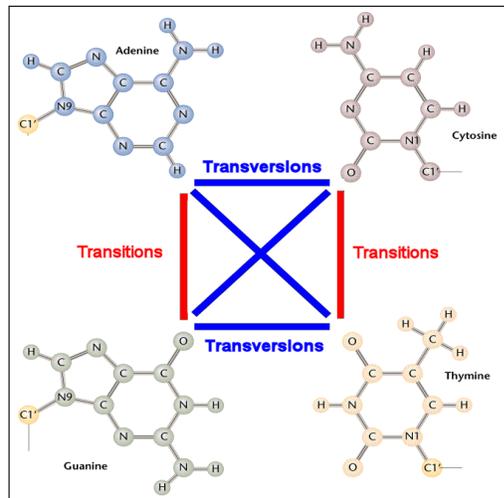
Teknologi Genome dalam Pemuliaan Tanaman

Teknologi pemetaan gen (mapping gene technology)

Pemetaan genetik merupakan suatu usaha untuk mengetahui lokus atau posisi suatu gen/penanda genetik (marka molekuler) secara relatif terhadap gen-gen atau penanda genetik lainnya. Pemetaan genetik merupakan tahapan yang penting dalam teknologi genomika. Hasil yang diperoleh ialah suatu urutan posisi sejumlah lokus pada suatu kelompok pautan (*linkage group*). Kelompok pautan dapat dianggap sebagai bagian dari suatu kromosom. Peta genetik yang komprehensif digunakan sebagai acuan dalam pemanfaatan marka molekuler yang memiliki kelompok pautan dengan sifat unggul tertentu yang menjadi target pemuliaan.

Peta genetik menggunakan teknologi RFLP telah diinisiasi oleh McCouch *et al.* (1991) dan Yu *et al.* (1991). Perkembangan teknologi marka selanjutnya ialah marka *Simple Sequence Repeat* (SSR) yang merupakan sekuen DNA bermotif pendek dan berulang secara tandem dengan 2-5 unit nukleotida yang tersebar dan meliputi seluruh genom terutama pada organisme eukariotik (Powell *et al.* 1996). Saat ini marka SSR telah banyak digunakan untuk karakterisasi dan pemetaan genetik tanaman (Mc Couch *et al.* 2002, Powell *et al.* 1996; Wang *et al.* 2006).

Marka molekuler terkini yang banyak diaplikasikan dalam teknologi genomika ialah marka SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), yaitu marka molekuler yang dikembangkan berdasarkan variasi basa nukleotida yang terdapat pada suatu genom. Secara umum kode genetik makhluk hidup disusun oleh 4 basa nukleotida, yaitu A (*adenine*), C (*cytosin*), T (*thymine*) dan G (*guanine*). Keempat basa di atas dapat saling menggantikan melalui suatu mekanisme *transisi* (terjadi pada basa dengan struktur cincin yang sama) atau *transversi* (terjadi pada basa nukleotida dengan struktur cincin yang berbeda) (Gambar 1).



Gambar 1. Variasi SNP yang terjadi karena proses transisi dan transversi. (Rafalsky, 2002).

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 perbedaan terkecil dalam gen target dari individu atau populasi yang dianalisis atau yang berkontribusi nyata pada fenotipe dapat terdeteksi (Utami *et al.* 2010). Pemanfaatan marka SNP dalam studi pemetaan telah banyak dilakukan dengan pendekatan yang berbeda, yaitu :

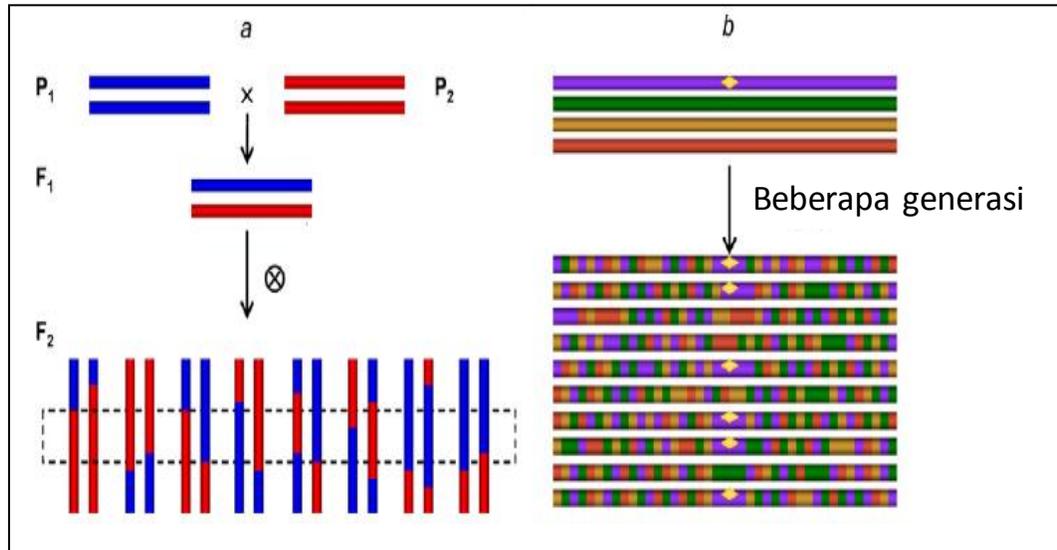
a. Teknologi pemetaan dengan populasi persilangan (*Linkage equilibrium mapping*)

Untuk memahami mekanisme yang menyebabkan sebuah populasi berevolusi, diperlukan upaya menjaga kondisi agar suatu populasi tidak berevolusi. Asas Hardy-Weinberg menyatakan bahwa frekuensi alel (variasi pada sebuah gen) pada sebuah populasi yang cukup besar akan tetap konstan jika faktor peubah yang terdapat pada populasi tersebut hanyalah penataan ulang alel secara acak selama pembentukan gamet dan kombinasi acak sel genetik ini selama penyerbukan. Populasi seperti ini tidak berevolusi dan dikatakan sebagai dalam populasi

keseimbangan Hardy-Weinberg atau populasi keseimbangan pautan (*Linkage equilibrium / LE*) (Kerry, 2007). Dalam kaitan dengan pemetaan kelompok pautan maka populasi LE terbentuk dari populasi pemetaan hasil persilangan 2 tetua. Pada kondisi ini alel/lokus bersifat random (*random association*). Jika 2 alel/lokus berada dalam kondisi LE, maka kedua alel atau lokus tersebut diwariskan secara bebas (*independent inherited*) (Bovenhuis dan Meuwissen, 1996).

b. Teknologi pemetaan dengan populasi alami (*Linkage disequilibrium mapping*).

Perkembangan teknologi genomik yang meliputi pemetaan QTL (*Quantitative Trait Locus*), penemuan gene (*gene discovery*), dan tersedianya sekuen genom secara lengkap telah memungkinkan untuk mencari alel-alel yang berguna dalam koleksi plasma nutfah padi untuk perbaikan varietas melalui suatu strategi yang disebut dengan *allele mining*. Pemetaan LD (*linkage disequilibrium*) dilakukan 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). Jika 2 alel/lokus berada dalam LD, maka kedua alel/lokus diwariskan secara bersama (*dependent inherited*) (Bovenhuis dan Meuwissen, 1996). Skema populasi LE dan LD seperti digambarkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Skema perbandingan analisis keterpautan dengan disain populasi pemetaan dan pemetaan LD dan analisis asosiasi menggunakan beragam koleksi sampel. (Zhu *et al*, 2008).

Teknologi pemetaan asosiasi genome (Genome Wide Association Study / GWAS) pada tanaman

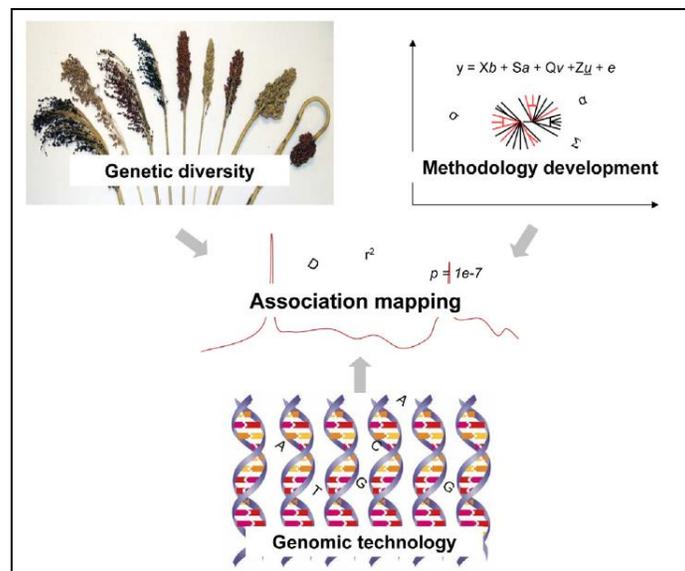
Pada awalnya, studi asosiasi lintas genom dikembangkan dari genom manusia dan saat ini banyak diperoleh hasil terutama dengan terdeteksinya beberapa gen fungsional yang terkait dengan penyakit utama pada manusia yang sebelumnya belum diketahui (*The Welcome Trust Case Control Consortium*, 2007). Saat ini, strategi yang sama juga telah banyak dikembangkan pada beberapa spesies tanaman. Pengertian tentang GWAS merujuk pada aktivitasnya dalam mendeteksi variasi genetik dalam jumlah banyak yang terdapat pada beragam individu yang berbeda. Aktivitas selanjutnya selanjutnya adalah pengembangan teknik analisis asosiasi untuk melihat apakah varian yang ada terkait dengan suatu karakter yang ditargetkan. GWAS biasanya berfokus pada analisis asosiasi antara keragaman (*polymorphism*) nukleotida tunggal (*Single Nucleotide Polymorphism/SNP*) dengan dan sifat-sifat penting seperti komponen hasil atau ketahanan/toleransi terhadap cekaman biotik atau abiotik.

Pendekatan analisis asosiasi dalam GWAS pada dasarnya setara dengan analisis keterpautan dalam studi pemetaan genetik, yang hanya melibatkan 2 genotipe sebagai tetua dari populasi persilangan yang digunakan. Variasi fenotipe dari karakter yang kompleks pada umumnya dikontribusikan oleh *multiple Quantitative Trait Loci (QTLs)* yang dipengaruhi oleh interaksi dengan faktor lingkungan. Melalui analisis keterpautan dapat terpetakan QTLs dengan interval 10-20 cM. Hal ini karena terbatasnya jumlah rekombinan dari populasi persilangan yang dibentuk (Doerge, 2002; Holland, 2007). Di sisi lain, melalui pendekatan analisis asosiasi, memungkinkan terdeteksinya variasi karakter kompleks sampai pada level sekuen dengan melacak asal usul evolusi rekombinasi dari beragam plasma nutfah yang memiliki latar belakang genom yang berbeda-beda (Nordborg dan Tavare, 2002; Risch dan Merikangas, 1996).

Kemajuan dalam teknologi *high-throughput genotyping* dan *genome sequencing* telah membuka lembaran baru dalam pemanfaatan teknologi pemetaan asosiasi lintas genom, di antaranya dalam hal (Yu dan Buckler, 2006; Zhu *et al.* 2008; McNally *et al.* 2006) :

1. Analisis kandidat gen melalui pemetaan asosiasi untuk melacak posisi gen target dalam genom beserta fungsinya terkait dengan proses biokimia atau *regulation pathway*.
2. Ketersediaan sekuen genom pada beberapa spesies model dan dukungan aplikasi beberapa teknologi genomika, seperti sequencing, genotyping, gene expression profiling, comparative genomics, bioinformatics, linkage analysis, mutagenesis dan biokimia untuk mengetahui sekuen kandidat gen-gen fungsional dari beragam karakter quantitative pada beragam plasma nutfah.
3. Ketersediaan sekuen genom dan teknologi resequencing juga memungkinkan untuk menemukan ratusan bahkan ribuan SNP yang fungsional yang dikembangkan sebagai marka molekuler fungsional pada beragam plasma nutfah terkait dengan karakter yang

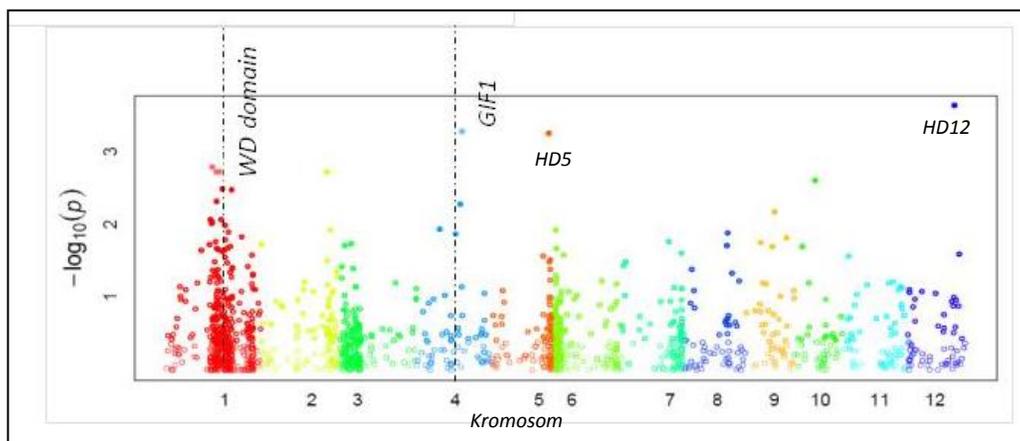
diinginkan. Penggunaan marka SNP yang bersifat *bi-allelic* lebih mudah untuk analisis genotyping dan asosiasi. Untuk mendapatkan hasil yang optimal, perlu diperhatikan pemilihan marka SNP yang akan digunakan, yaitu harus memenuhi kriteria (1) *High quality* SNP (memiliki data hilang < dari 4,5%), (2) Setiap 1 marka SNP mewakili 10kb dan tersebar merata di seluruh kromosom dalam genom spesies yang dianalisis, (3) SNP memiliki tingkat polimorfik yang tinggi, dengan nilai MAF (*Minor Allele Frequency*) ≥ 0.05 , karena SNP dengan MAF yang rendah pada umumnya tidak informatif. Keragaan aktivitas pemetaan LD dan analisis asosiasi seperti ditampilkan pada Gambar 3.



Gambar 3. Pemetaan LD dan analisis asosiasi. Teknologi genomika terkini secara *high-throughput*.
Sumber : Zhu *et al*, 2008.

Perkembangan terkini dari penelitian pemetaan LD dan analisis asosiasi telah diaplikasikan pada banyak spesies tanaman untuk beragam karakter target. Seperti pada tanaman jagung untuk karakter umur berbunga (Thornsberry *et al.* 2001; Andersen *et al.* 2005; Camus-Kulandaivelu *et*

al.2006; Salvi, 2007), sorgum dan *wheat* untuk karakter kualitas benih (Casa *et al.* 2008; Breseghello and Sorrells, 2006); kentang untuk karakter ketahanan terhadap penyakit late blight (Malosetti, *et al.* 2007) dan tebu untuk karakter ketahanan penyakit (Wei *et al.* 2006). Pada padi GWAS juga sudah diaplikasikan untuk beberapa karakter penting, seperti *glutinous phenotype* (Olsen and Purugganan, 2002), kandungan pati (Bao *et al.* 2006), komponen hasil (Agrama *et al.* 2007). Diantara hasil analisis GWAS yang telah dilakukan pada 467 aksesori plasma nutfah padi Indonesia ialah seperti pada Gambar 4.



Gambar 4. Diantara hasil analisis GWAS yang dilakukan pada 467 aksesori plasma nutfah padi Indonesia

Pada Gambar 4 menunjukkan sebaran sejumlah marker SNP di setiap kromosom (ditunjukkan dengan warna yang berbeda). Marka-marka yang tersebar paling atas (memiliki nilai $-\log p$ value paling besar) menunjukkan bahwa marka tersebut bersifat signifikan berasosiasi dengan karakter target. Sebagai contoh, di kromosom 1 (warna merah) marka yang tersebar paling atas bersifat signifikan terhadap karakter umur genjah pada plasma nutfah padi dan marka ini menandai gen *WD domain*. Gen ini diketahui turut berperan dalam mengatur waktu pembungaan. Demikian juga di kromosom 5 dan 12 terdapat marka SNP yang menandai berturut-turut gen *HD5* dan *HD12*. Hal

ini ditunjukkan oleh sebaran marka yang ada di bagian atas (memiliki $-\log P$ value paling besar). Selain itu juga terdeteksi marka yang menandai gen *GIFI*, di kromosom 4. Gen ini berperan dalam karakter pengisian butir malai padi. Berdasarkan hasil ini maka marka-marka yang terdeteksi bersifat signifikan dapat dimanfaatkan dalam membantu proses seleksi dalam program pemuliaan.

Dengan demikian melalui pengembangan analisis GWAS memungkinkan untuk melacak asosiasi antara variasi genetik pada beragam aksesori plasma nutfah (lintas genom) yang mungkin selama ini belum banyak dimanfaatkan. Namun demikian analisis GWAS perlu didukung dengan beragam pendekatan yang tepat, di antaranya ialah pengembangan model untuk analisis statistiknya.

Model Statistik untuk Kontrol Koreksi Hasil Analisis Asosiasi

Sesuai dengan uraian sebelumnya, bahwa GWAS adalah pendekatan standar untuk mempelajari genetika variasi alami. Namun struktur populasi yang beragam dan juga *inbreeding lines* pada sampel-sampel yang dianalisis dapat membiaskan hasil analisis GWAS. Penghitungan efek keterpautan acak dapat menyebabkan ketidakakuratan hasil analisis karena tidak adanya faktor koreksi *non independence (linkage disequilibrium)* antar lokus yang dianalisis (Platt *et al.* 2010; Kang *et al.* 2010; Price *et al.* 2010). Beberapa metode statistik yang banyak digunakan dalam analisis gabungan data genotipe dan fenotipe sekaligus menghitung efek random yang berpengaruh pada pendekatan pemetaan LD ini adalah analisis PCA (*Principle Component Analysis*) dengan linear regresi, GBLUP, EMMAX dan MLMM (Korte *et al.* 2012).

Sementara itu Zhao *et al.* (2011) menyebutkan bahwa terdapat pengaruh yang nyata dari factor struktur populasi sampel-sampel yang digunakan. Untuk itu Zhao *et al.* (2011) telah menguji 2 model analisis statistik, yaitu model *naïve* dan *mixed*. Model *neive* adalah model analisis statistik

yang dikembangkan tanpa menyertakan faktor struktur populasi yang berbeda-beda dari sampel-sampel yang digunakan (*no population structure adjustment*). Sebaliknya model *mixed* adalah model analisis statistik yang menyertakan faktor struktur populasi sampel-sampel yang berbeda-beda dalam analisisnya. Hasil dari pengujian tersebut diperoleh hasil bahwa model *naïve* lebih sesuai diaplikasikan apabila tidak ada alel yang bersegregasi antar populasi pada sampel-sampel yang digunakan dalam analisis. Sedangkan model *mixed* akan memberikan hasil yang optimal apabila terdapat alel-alel yang bersegregasi pada populasi sampel-sampel yang digunakan.

Kesimpulan dan Saran

Teknologi GWAS dapat mengungkap potensi keragaman genetik serta variasi fenotipe yang terdapat pada beragam plasma nutfah padi Indonesia. Pemanfaatan teknologi GWAS dalam pemuliaan padi dapat membuka peluang untuk pemanfaatan plasma nutfah padi secara lebih akurat, efektif, efisien dan berkelanjutan sehingga dapat mendukung program pemuliaan padi. Namun demikian teknologi ini perlu didukung dengan pengembangan teknologi terkait seperti standarisasi teknik seleksi dalam pemuliaan, pengembangan marka molekuler yang fungsional, analisis statistika yang aplikatif serta pengembangan teknologi bioinformatika untuk mendukung analisis data yang diperoleh sehingga diperoleh hasil yang optimum. Dengan mengingat bahwa teknologi GWAS perlu dukungan dana yang besar maka pengembangan kerjasama khususnya dalam bentuk konsorsium nasional merupakan salah satu pilihan dimasa mendatang.

Daftar Pustaka

- Agrama, H.A., G.C. Eizenga, and W. Yan. 2007. Association mapping of yield and its components in rice cultivars. *Mol. Breed.* 19:341–356.
- Allard, R.W. 1960. *Principles of Plant Breeding*. John Wiley and Sons, Inc. New York, London, Sidney.
- Andersen, J.R., T. Schrag, A.E. Melchinger, I. Zein, and T. Lübberstedt. 2005. Validation of *Dwarf8* polymorphisms associated with flowering time in elite European inbred lines of maize (*Zea mays* L.). *Theor. Appl. Genet.* 111:206–217.
- Bao, J.S., H. Corke, and M. Sun. 2006. Microsatellites, single nucleotide polymorphisms and a sequence tagged site in starch-synthesizing genes in relation to starch physicochemical properties in nonwaxy rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 113:1185–1196.
- Biselli, C., D. Cavalluzzo, R. Perrini, A. Gianinetti, P. Bagnaresi, S. Urso, G. Orasen, F. Desiderio, E. Lupotto, L. Cattivelli and G. Valè. 2014. Improvement of marker-based predictability of Apparent Amylose Content in japonica rice through GBSSI allele mining. *Rice Journal*, 7:1. Springer Open Journal (<http://www.thericejournal.com/content/7/1/1>).
- Bovenhuis, H. and T.H.E. Meuwissen. 1996. Detection and mapping of quantitative trait loci. Animal Genetics and Breeding Unit. UNE. Armidale. Australia. ISBN1863893237.
- Breseghele, F., and M.E. Sorrells. 2006b. Association mapping of kernel size and milling quality in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Genetics* 172:1165–1177.
- Camus-Kulandaivelu, L., J.B. Veyrieras, D. Madur, V. Combes, M. Fourmann, S. Barraud, P. Dubreuil, B. Gouesnard, D. Manicacci, and A. Charcosset. 2006. Maize adaptation to temperate climate: Relationship between population structure and polymorphism in the *Dwarf8* gene. *Genetics* 172:2449–2463.
- Casa, A.M., G. Pressoira, P.J. Brown, S.E. Mitchell, W.L. Rooney, M.R. Tuinstra, C.D. Franks, and S. Kresovitch. 2008. Community resources and strategies for association mapping in sorghum. *CropSci.* 48:30–40.
- Doerge, R.W. 2002. Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. *Nat.Rev.Genet*3:43-52.
- 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. 2003. Structure of linkage disequilibrium in plants. *J. Annu.Rev. Plant.Biol.* 54:357-374.
- Hirst, K.K. 2013. Plant Domestication. Artikel pada archeology.about.com (http://archeology.about.com/od/domestications/a/plant_domestic.htm).
- Holland, J.B. 2007. Genetic architecture of complex traits in plants. *Curr.Opin.Plant Biol.* 10: 156-161.
- Kang, H.M., J.H. Sul, S.K. Service, N.A. Zaitlen, S. Kong, N.B. Freimer, C. Sabatti, E. Eskin. 2010. Variance component model to account for sample structure in genome-wide association studies. *Nature Genet.* 42:348-354. [PubMed:20208533]

- Kerry, B. 2007. Cause of evolution. Teach Evaluation and Make It Relevant. National Science Foundation (<http://www.evolved.org/lessons/speciation.htm>). Diakses tanggal 30 Desember 2012.
- Korte, A., B.J. Vilhjalmsson, V.Segura, A. Platt, Q. Long, M. Nordborg. 2012. A mixed-model approach for genome-wide association studies of correlated traits in structured population. *Nat,Genet*, 44(9):1066-1071.
- Price, A.L., N.A. Zeitlen, D. Reich, N. Patterson. 2010. New approach to population stratification in genome-wide association studies. *Nature Rev. Genet*, 11:459-463.
- Malosetti, M., C.G. van der Linden, B. Vosman, and F.A. van Eeuwijk. 2007. A mixed-model approach to association mapping using pedigree information with an illustration of resistance to phytophthora infestans in potato. *Genetics* 175:879–889.
- McCouch, S.R., M.I. Abenes, R. Angeles, G.S. Khush, S.D. Tanksley. 1991. Molecular tagging of resecive genes xa-5 for resistance to bacterial blight of rice. *Rice Genet. Newsl.* 8: 143-145.
- McCouch, S.R., L.Teytelman, Y.Xu, K.B.Lobos, K.Clare, M.Walton, B.Fu, R.Maghirang, Z.Li, Y.Xing, Q.Zhang, I. Kono, M. Yano, R. Fjellstrom, G. DeClerck , D. Schneider, S. Cartinhour, D. Ware, and L.Stein. 2002. Development and Mapping of 2240 New SSR Markers for Rice (*Oryzasativa* L.). *DNA Research* 9:199–207.
- McNally, K.L., R. Bruskiewich, D. Mackill, C.R. Buell, J.E. Leach, H. Leung. 2006. Sequencing multiple and diverse rice varieties. Conecting whole-genome variationwith phenotypes. *Plant Physiol.*141:26-31.
- Moeljopawiro, S. 2012. Dukungan Pemuliaan Molekuler dan Sumber Daya Genetik dalam Meningkatkan Produksi Padi. Naskah Orasi Pengukuhan Profesor Riset, Bidang Bioteknologi Pertanian. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian Kementerian Pertanian.
- Morton, N.E. 2005. Linkage disequilibrium and association mapping. *J. Clin. Invest.* 115:1425-1430.
- Nordborg, M and S. Tavare. 2002. Linkage disequilibrium : What history has to tell us. *Trends Genet*, 18:83-90.
- Olsen, K.M., and M.D. Purugganan. 2002. Molecular evidence on the origin and evolution of glutinous rice. *Genetics* 162:941–950.
- Platt, A., B.J. Vilhjalmsson, M. Nordborg. 2010. Conditions under which genome-wide association studies will be positively misleading. *Genetics*, 186:1045-52 [PubMed:20813880].
- Powell,W., G.C. Macharay, J. Provan. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci* 1:215-222.
- Risch, N. and K. Marikangas. 1996. The future of genetics studies of complex human disease. *Science* 273:1516-1517.
- Salvi, S. 2007. Conserved non-coding genomic sequences associated with a flowering-time quantitative trait locus in maize. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* 104:11376–11381.
- Sleper, D.A. and J.M. Poehlman. 2006. *BreedingField Crop*. Edisi ke-5. Wiley-Blackwell, Hal 3.
- Somantri, I.H. 2013. Percepatan Perakitan Varietas Unggul Padi dengan Bantuan Pemuliaan Non Konvensional. Naskah Orasi Pengukuhan Profesor Riset, Bidang Bioteknologi Pertanian. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian Kementerian Pertanian.
- The Welcome Trust Case Control Consortium. 2007. Genome-wide association study of 14.000 cases of seven common diseases and 3000 shared controls. *Nature* 447:661-678.

- Thornsberry, J.M., M.M. Goodman, J. Doebley, S. Kresovich, D. Nielsen, and E.S. Buckler. 2001. Dwarf8 polymorphisms associate with variation in flowering time. *Nat. Genet.* 28:286–289.
- Utami, D.W., S. Moeljopawiro, I.S. Hanarida and D. Tharreau. 2008. Fine Mapping of rice blast QTL from *Oryza rufipogon* and IR64 by SNP markers. *SABRAO Journal of Breeding and Genetics* 40(2):105-115.
- Utami, D.W., E.M. Septiningsih, T.S. Kadir, Fatimah dan S. Yuriyah. 2010. Pencarian Alel untuk Identifikasi Gen Ketahanan Penyakit Hawar Daun Bakteri, Xa7 pada Plasma Nutfah Padi Lokal Indonesia. *Jurnal Agrobiogen* 6(1):1-9.
- Utami, D.W., I. Rosdianti, P. Lestari, D. Satyawan, H. Rijzaani and I M. Tasma. 2013. Development and application of 1536-plex Single Nucleotide Polymorphism Marker Chip for genome Wide Scanning of Indonesian rice germplasm. *Indonesian Journal of Agricultural Science*. Vol.14,No.2, p.45-86.
- UU nomor 29 Tahun 2000 tentang Perlindungan Varietas Tanaman
- Wang, J.P., H.Raman, G.P.Zhang, N.Mendham, dan M.X.Zhou. 2006. Aluminum tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.): physiological mechanism, genetics, and screening methods. *Zhejiang Univ Science B* 7(10):769-787.
- Watson, J.D. and F.H.C. Cricks. 1953. A structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*, 171: 737.
- Wei, X.M., P.A. Jackson, C.L. McIntyre, K.S. Aitken, and B. Croft . 2006. Associations between DNA markers and resistance to diseases in sugarcane and effects of population substructure. *Theor. Appl.Genet.* 114:155–164.
- Wikipedia, 2014. Penanda Genetik. http://id.wikipedia.org/wiki/Penanda_genetik. Diakses pada tanggal 25 Agustus 2014.
- Yu, Z.H., D.J. Mackill, J.M. Bonman, S.D. Tanksley.1991. Tagging genes for blast resistance in rice via linkage to RFLP markers. *Mol. Breed.* 1:375-387.
- Yu, J. and E.S. Buckler. 2006. Genetic association mapping and genome organization of maize. *Curr.Opin. Biotechnol*, 17:155-160.
- Zhao, K., C.W. Tung, G.C. Eizenga, M.H. Wright, M.L. Ali, A.H. Price, G.J. Norton, M.R. Islam , A. Reynolds, J. Mezey, A. McClung, C.D. Bustamante, S.R. McCouch. 2011. Genome-wide association mapping reveals a rich genetic architecture of complex traits in *Oryza sativa*. *Nature* 2:467.
- Zohary, D. and M. Hopf. 2000. Domestication of plants in the Old World. Oxford Univ. Press. London.
- Zhu, C., M. Gore, E.S. Buckler, J. Yu. 2008. Status and prospects of association mapping in plants. *The Plant Genome*, 1: 5-20.