

Perakitan Varietas Padi Toleran Keracunan Besi

Breeding for Rice Variety Tolerant to Iron Toxicity

Yudhistira Nugraha* dan Indrastuti Apri Rumanti

Balai Besar Penelitian Tanaman Padi
Jl. Raya 9 Sukamandi, Subang, Jawa Barat, Indonesia
*E-mail: ynugraha@outlook.com

Naskah diterima 7 April 2017, direvisi 11 Juni 2017, dan disetujui diterbitkan 13 Juni 2017

ABSTRACT

Excess of reduced iron (Fe^{2+}) in the soil affects plant growth of some crops. Iron toxicity is physiological disorder which occurs mostly under flooded condition, where rice is predominantly cultivated. In order to contribute information to the rice breeding program, we review the physiological, genetic and breeding of rice tolerance to iron toxicity. Some rice genotypes were identified as having tolerance to iron toxicity with different mechanism-types. Most of the tolerance variations are local varieties which had adapted to the harsh environment of their origin. Those genotypes needed to be improved to be widely adopted by farmers in the targeted areas. Selection for iron toxicity tolerance genotypes faces problems due to the fact that the targeted areas are in remote areas which are difficult to access. It is important to develop effective and efficient screening technique that able to copy the real field condition. Identification tolerance-type of the genotypes is also very important to develop basic of more precise physiological-breeding program. A number of elite lines have been developed in some rice research institution in Indonesia. The genes regulating for iron toxicity tolerance in rice are very complex that it makes difficult to accelerate the selection using molecular marker. An approach to develop technique of molecular marker based breeding to iron toxicity tolerance in rice was outlined.

Keywords: Rice, iron toxicity, genotype tolerance, breeding.

ABSTRAK

Besi tereduksi (Fe^{2+}) di dalam tanah pada kondisi berlebih bersifat meracun terhadap pertumbuhan tanaman. Keracunan besi sering terjadi pada tanah tergenang seperti pada padi di tanah sawah. Makalah ini membahas aspek fisiologi dan genetika dalam perakitan padi toleran keracunan besi. Beberapa genotipe padi telah teridentifikasi memiliki sifat toleran keracunan besi melalui berbagai mekanisme toleransi. Genotipe yang teridentifikasi toleran terhadap keracunan besi pada umumnya varietas lokal, yang perlu diperbaiki karakter lainnya sehingga produktivitasnya meningkat. Diperlukan metode penapisan plasma nutfah padi toleran keracunan Fe yang efektif dan efisien. Metode skrining telah dikembangkan dan reaksi keracunan besi di rumah kaca mendekati keadaan di lapang. Diperlukan pula identifikasi tipe toleransi varietas yang diinginkan, sehingga dapat dirancang program pemuliaan tanaman berbasis fisiologi yang lebih terarah. Varietas dan galur harapan padi toleran keracunan Fe telah diidentifikasi. Kompleksitas gen pengatur toleransi keracunan besi menyulitkan seleksi menggunakan marka molekuler. Jalan keluar disarankan untuk mengatasi masalah tersebut dan dibahas dalam makalah ini.

Kata kunci: Padi, keracunan besi, genotipe toleran, perakitan varietas.

PENDAHULUAN

Padi merupakan tanaman semi-aquatik, dapat hidup pada lahan kering dan kondisi tergenang air. Untuk memudahkan pengendalian gulma dan pemupukan pada lahan sawah umumnya petani menanam padi dengan menggenangi lahan mulai fase bibit hingga menjelang panen (Sharma and de Datta 1986). Sistem budidaya ini mengakibatkan lahan menjadi anaerob, karena oksigen dalam air berdifusi lebih rendah 10.000 kali dibanding di atmosfer (Armstrong *et al.* 1991). Dalam kondisi seperti ini terjadi reduksi sejumlah mineral tanah oleh mikroba anaerob (Gao *et al.* 2002), di antaranya Fe^{3+} oksida yang awalnya tidak tersedia menjadi Fe^{2+} yang lebih larut dan tersedia bagi tanaman (Sousa and de Oliveira 2011).

Besi tergolong hara esensial mikro yang penting dalam pembentukan klorofil, proses fotosintesis, respirasi, fiksasi nitrogen, sintesis DNA, dan kofaktor sejumlah enzim penting (Briat *et al.* 1995). Pada konsentrasi yang berlebih, besi mengakibatkan keracunan bagi tanaman. Gejala keracunan besi pada tanaman padi ditandai oleh bintik kecokelatan pada daun yang disebut gejala bronzing, pembungaan terhambat, proses sintesis asimilat terhenti, tanaman mengerdil, pada bagian akar terjadi penebalan berwarna cokelat, kasar, dan memendek, terjadi pembusukan batang dan daun (Dobermann and Fairhurst 2000). Ketidaknormalan pertumbuhan tersebut menurunkan hasil padi 15-30%, bahkan dapat gagal panen pada tingkat keracunan besi yang berat (Audebert dan Sahrawat 2000). Oleh karena itu penanganan masalah ini dapat memberikan jaminan kepada petani dalam budi daya padi pada lahan kelebihan besi.

Gejala tanaman padi yang mengalami keracunan besi sering kali ditemukan pada lahan kaya mineral besi, terutama di lahan pasang surut, lahan masam, lahan sawah bukaan baru, dan cekungan antarbukit (Sahrawat 2004, Becker and Asch 2005). Keracunan besi menjadi masalah utama budi daya padi pada lahan rawa pasang surut karena adanya lapisan pirit (FeS) yang apabila tereduksi menjadikan larutan tanah kaya akan Fe^{2+} (Muhrizal *et al.* 2006). Luas areal pertanaman padi lahan pasang surut di Indonesia diperkirakan 657 ribu ha (Wahyunto 2009). Data luas pertanaman padi yang berpotensi keracunan besi pada jenis lahan lainnya belum diketahui. Namun demikian, lahan bermasalah ini kemungkinan akan bertambah luas dengan adanya program ekstensifikasi ke daerah suboptimal, seperti lahan rawa pasang surut dan lahan masam.

Keparahan gejala keracunan besi selain disebabkan oleh kondisi lahan dan lingkungan (adanya penggenangan dan drainase buruk) juga dapat disebabkan oleh penanaman varietas yang peka terhadap keracunan besi.

Manipulasi lingkungan dengan teknik budi daya dapat mengurangi pengaruh negatif keracunan besi pada tanaman padi. Tindakan budi daya yang dianjurkan untuk mengatasi keracunan besi antara lain melalui pengaturan tata air (Yang *et al.* 2004), pemupukan berimbang (Ramirez *et al.* 2002, Sahrawat *et al.* 2000), pemberian bahan organik (Muhrizal *et al.* 2006), kapur (Jena *et al.* 2008), dan ameliorasi tanah (Nozoe *et al.* 2010). Namun pengaturan tata air (penggenangan dan drainase) di lahan sawah sering kali sukar dilaksanakan. Di samping itu petani umumnya kurang mampu melaksanakan pemupukan, pengapuran, dan ameliorasi lahan dengan cara dan dosis yang ditentukan untuk mengatasi masalah keracunan besi. Oleh karena itu penggunaan varietas toleran atau beradaptasi baik pada lahan keracunan besi dan berpotensi hasil tinggi merupakan cara yang paling mudah.

Beberapa genotipe padi telah teridentifikasi tumbuh baik pada kondisi konsentrasi besi tinggi, sebagian besar merupakan varietas lokal yang tumbuh dan telah beradaptasi lama di lahan dengan kandungan besi tinggi, seperti lahan pasang surut. Genotipe tersebut biasanya memiliki karakter agronomi yang kurang baik, berumur panjang, dan sensitif terhadap fotoperiode. Untuk memindahkan karakter toleran keracunan besi dari genotipe toleran diperlukan metode pemuliaan spesifik yang efektif dan efisien. Sehubungan dengan hal tersebut diperlukan cara dan alat penyaring genotipe yang mudah, murah, dan cepat yang dapat membedakan antara varietas toleran dengan varietas peka terhadap keracunan besi, mengetahui karakter utama yang menentukan tipe toleransi, dan informasi karakter genetik yang menentukan tersebut. Makalah ini merieview hasil penelitian keracunan besi meliputi aspek fisiologi, genetika dan pemuliaan tanaman yang telah dipublikasi di dalam dan luar negeri, serta hasil perakitan varietas unggul padi toleran keracunan besi.

Faktor Penyebab Keracunan Besi

Besi merupakan penyusun utama hampir semua jenis tanah. Mineral besi banyak dijumpai pada jenis tanah geonite (FeOOH), hematite (Fe_2O_4), pyrite (FeS), siderite (FeCO_3), dan magnetite (Fe_3O_4) (Fageria *et al.* 2008). Akibat tempaan iklim, materi induk tanah melepaskan sejumlah ion, termasuk besi. Pada kondisi tanah tergenang, difusi oksigen 10.000 kali lebih rendah (Armstrong *et al.* 1991) yang mengakibatkan aktifnya mikroba anaerob dalam tanah yang memanfaatkan sumber elektron NO_3^- , Mn^{4+} , Fe^{3+} , dan SO_4^{2-} (Emerson and Moyer 1997). Proses ini menyebabkan berubahnya Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} yang kelarutannya lebih tinggi, yang dalam keadaan berlebih mengakibatkan keracunan bagi tanaman.

Tabel 1. Karakteristik lahan dengan masalah keracunan besi dalam tiga kluster.

Karakteristik	Kluster 1	Kluster 2	Kluster 3
Lokasi	Rawa pasang surut	Tanah masam tua dan rawa dataran tinggigunung	Daerah cekungan lereng
Jenis tanah	Sulfat masam	Ultisol, histosol	Latosol
Kandungan besi tanah	500-2500	300-900	20-600
Kandungan besi di jaringan tanaman	500-2000	300-900	20-600
Fase Pertumbuhan	Bibit sampai panen	Bibit sampai panen	Fase vegetative awal
Musim kejadian	Musim kemarau dan hujan	Musim kemarau dan hujan	Musim hujan
Distribusi spasial	Seluruh lahan	Tersebar tidak merata	Pada sisi bukit
Kehilangan hasil	40-100	15-50	30-70
Contoh negara	Indonesia, Sinegal, Thailand	Indonesia, Filipina, Madagaskar	Guinea, Srilanka, Pantai Gading

Sumber: Becker dan Asch (2005).

Keracunan besi biasanya disertai oleh kondisi tanah dengan status hara rendah, kemasaman tanah tinggi, dan kapasitas tukar kation rendah (Benckiser *et al.* 1982). Konsentrasi Fe^{2+} pada sawah irigasi bervariasi antara 10 - > 2000 mg/l (Becker and Asch 2005). Tingkat keracunan besi pada tanaman padi dipengaruhi oleh beberapa faktor yang terkait dengan kondisi tanah, kandungan mineral tanah, jumlah ion Fe yang dapat dipertukarkan, dan pH tanah. Becker dan Asch (2005) membagi tiga kluster tanah yang memiliki kerawanan yang berbeda, yaitu kluster 1 merupakan tanah sulfat masam, memiliki konsentrasi Fe^{2+} pada larutan tanah, berkisar antara 500-2.500 mg/kg; kluster 2 merupakan daerah liat masam kaya besi dengan konsentrasi berkisar antara 300-900/kg; dan kluster 3 merupakan tanah yang menerima aliran air dari lereng yang memiliki sedimen batu induk tua dengan konsentrasi berkisar 20-600/kg (Tabel 1).

Tindakan yang dianjurkan untuk mengatasi keracunan besi antara lain melalui kultur teknis dan penanaman varietas toleran. Perbaikan kultur teknis di antaranya perbaikan drainase, pemberian bahan organik, pengapuran, ameliorasi tanah, dan pemupukan. Pemberian pupuk N, P, K, S, dan Zn dapat mengurangi pengaruh buruk keracunan besi pada tanaman padi (de Dorlodot *et al.* 2005). Namun pengaruh pupuk lebih disebabkan oleh perbaikan proses fisiologi. Sebagai contoh, K dapat meningkatkan eklusi Fe melalui reaksi redok pada larutan tanah (Onaga *et al.* 2013a). Kondisi tanah jenuh besi, terutama pada tanah masam, biasanya diikuti oleh rendahnya status hara P, K dan Zn. Oleh karena itu, pemupukan berimbang dapat mengurangi efek negatif besi. Pengaruh pupuk tidak memberikan perbedaan pada status hara N, P, K pada dalam jaringan tanaman padi varietas peka dan tahan keracunan besi (de Dorlodot *et al.* 2005; Onaga *et al.* 2013b). Bahkan pada jaringan tanaman varietas padi peka adanya akumulasi besi oksida pada akar memudahkan absorpsi

P pada akar maupun tajuk yang tinggi (Zhang *et al.* 1999; da Silvieira *et al.* 2007). Hal ini menunjukkan keracunan besi yang disebabkan oleh pengaruh racun akibat berlebuhnya besi pada tanaman lebih dominan dibandingkan dengan kekurangan atau pengaruh unsur hara lainnya.

PENYERAPAN BESI OLEH TANAMAN PADI

Ketersediaan besi bagi tanaman bergantung pada kondisi lingkungan tempat tumbuh dan mekanisme tanaman dalam menyerap besi. Tanaman padi mampu menyerap besi dibandingkan dengan tanaman lainnya karena padi dibudidayakan pada kondisi anaerob (Emerson and Moyer 1997). Setelah besi diserap menuju bagian kortek akar, Fe^{2+} memasuki xilem secara simplas yang sebelumnya menembus benang kasparian, atau Fe^{2+} memasuki xilem secara langsung melalui apoplas (Marschner 1995). Teknik budi daya tanam pindah pada fase bibit yang umum dilakukan petani mengakibatkan kerusakan pada akar sehingga terjadi transportasi besi lebih cepat secara akropetal melalui transpor jarak panjang berbarengan dengan transpirasi (Becker dan Asch 2005).

Pergerakan besi di antara sel terjadi karena adanya katalisasi terbentuknya reactive oxygen species (ROS) seperti superoxide, radikal hydroxyl, dan H_2O_2 melalui reaksi Haber-Weiss: $\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{O}_2^{\cdot-} + \text{Fe}^{3+}$ atau $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^\cdot$ (Winterbourn 1995). Reaksi tersebut semakin meningkat dengan bertambahnya ketersediaan besi di tanah yang mengakibatkan terjadinya pembentukan radikal bebas yang merusak jaringan tanaman, seperti radikal feril yang bersama asam lemak membentuk asam lemak peroksida (Bode *et al.* 1995, Becana *et al.* 1998).

Mekanisme perolehan Fe oleh tanaman berbeda antara spesies, yang dapat digolongkan menjadi dua, yaitu

strategi I pada tanaman nongraminae dan strategi II pada tanaman graminane, seperti yang diungkap Kobayashi dan Nishizawa (2012). Proses utama pada strategi II adalah reduksi kelat ferric pada permukaan akar dan daerah absorpsi yang mengubah ion ferro pada sepanjang plasma membran akar. Gen utama yang berperan dalam regulasi ini yaitu ferric-chelate reductase oxidase (FRO2) dan iron-regulated transporter (IRT1) (Kobayashi and Nishizawa 2012). Proses lainnya yang terlibat dalam sistem I adalah eksersi proton dan senyawa fenol oleh akar ke daerah rizosfer, yang kemungkinan berperan dalam meningkatkan kelarutan ion ferric atau mensupor kapasitas reduksi ferric pada permukaan akar, misalnya pada *Arabidopsis* AHA2 (Thomine and Vert 2013).

TIPE TOLERANSI TANAMAN TERHADAP KERACUNAN BESI

Beberapa peneliti melaporkan sejumlah genotipe padi dapat hidup pada tanah dengan kandungan besi tinggi tanpa penurunan hasil yang berarti (Audebert and Fofana 2009, Onaga *et al.* 2013b, Stein *et al.* 2014, Nugraha *et al.* 2017). Dalam menghadapi lingkungan dengan besi berlebih, tanaman padi memiliki tipe adaptasi yang berbeda untuk dapat bertahan hidup (Gambar 1), yaitu:

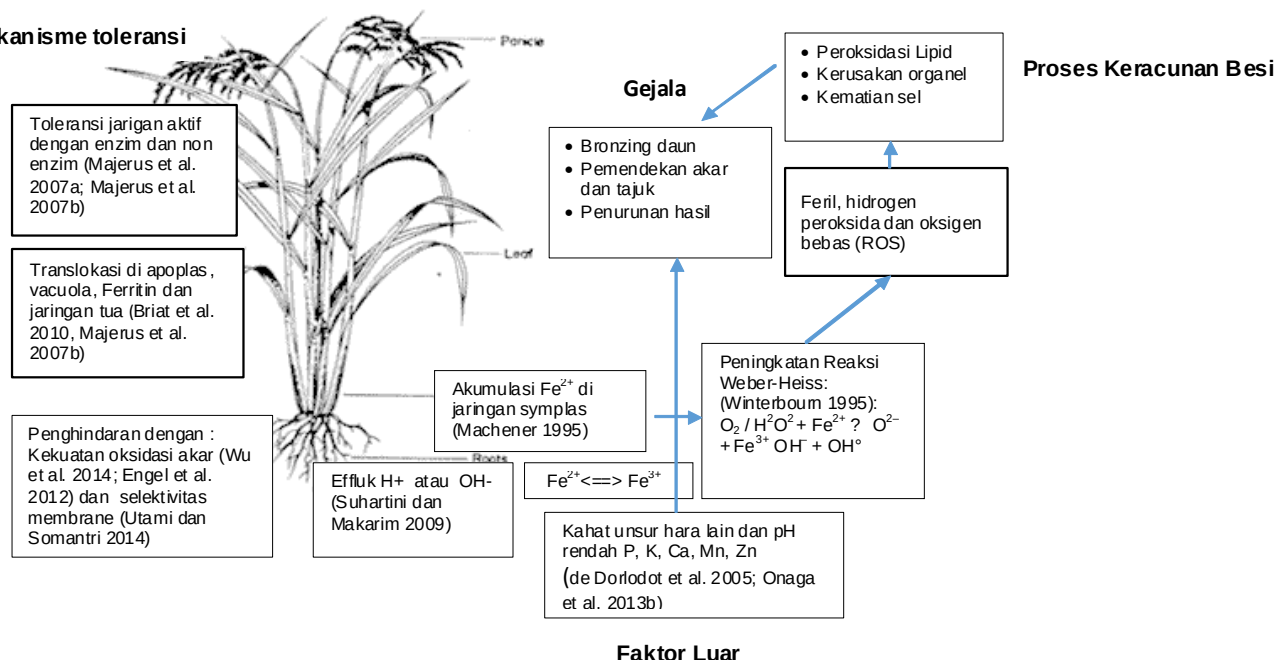
1. Eksklusi penghindaran, di mana akar membuang besi sehingga tanaman terhindar dari kerusakan jaringan tajuk dengan cara oksidasi pada zona rizosfer atau

melalui mekanisme selektivitas akar terhadap ion (Wu *et al.* 2014, Engel *et al.* 2012a), atau meningkatnya pH larutan tanah dengan effluk OH⁻ sehingga menurunkan aktivitas Fe²⁺ (Suhartini and Makarim 2009).

2. Inklusi penghindaran, di mana besi diserap oleh akar tetapi kerusakan di jaringan tanaman mungkin dapat dihindari dengan jalan kompartemensi (mobilisasi ke daerah pembuangan) seperti daun-daun yang sudah tidak aktif berfotosintesis (Audebert and Sahrawat 2000) atau disimpan pada vakuola sel, protein penyimpan besi atau *Ferritin* (Briat *et al.* 2010, Majerus *et al.* 2007b)
3. Inklusi toleran, di mana tanaman mampu mentoleransi masuknya besi ke dalam jaringan tajuk dengan cara mendetoksifikasi secara enzimatik pengaruh buruk besi (Majerus *et al.* 2007a, Majerus *et al.* 2007b)
4. Selektivitas membrane melalui protein transporter *Iron Regulated Transporter* (Utami dan Somantri 2014).

Sejumlah genotipe padi memiliki kandungan besi rendah pada jaringan tajuk namun tinggi di daerah perakaran (Engel *et al.* 2012a, Nugraha *et al.* 2017). Strategi ini dilakukan dengan cara menolak besi masuk ke dalam jaringan tajuk dan menahannya di daerah rizosfer melalui kekuatan akar mengoksidasi besi sebelum diserap akar (Begg *et al.* 1994). Besi yang tersedia dalam bentuk Fe²⁺ teroksidasi menjadi Fe³⁺ yang ditandai oleh

Mekanisme toleransi



Gambar 1. Proses keracunan besi pada tanaman padi, gejala, faktor luar, dan mekanisme toleransinya.

terbentuknya plak besi oksida yang terdeposit pada permukaan akar (St-Cyr *et al.* 1993).

Tanaman mengembangkan mekanisme untuk beradaptasi pada kondisi media tumbuh anaerobik dengan membentuk jaringan aerenkima yang dapat memfasilitasi terhubungnya oksigen (dan gas lainnya) dari atmosfer menuju ke bagian akar (Armstrong 1979). Jaringan ini juga berperan dalam proses oksidasi Fe^{2+} menjadi oxyhydroxide (FeOOH) (Mendelson *et al.* 1995). Akar tanaman padi yang terendam air memiliki volume jaringan aerenkima 20-50% dari total volume akar (Armstrong *et al.* 1991). Nugraha *et al.* (2017) melaporkan perbedaan pembentukan jaringan aerenkima di antara genotipe pada konsentrasi besi tinggi larutan hara. Justin dan Armstrong (1991) melaporkan adanya peran hormon etilen dalam pembentukan aerenkima pada tanaman padi. Selain itu aktivitas biosintesis etilen yang tinggi juga ditemukan pada genotipe padi yang toleran keracunan besi (Majerus *et al.* 2007a, Harahap *et al.* 2014).

Jaringan aerenkim mengalami pengembangan daerah pangkal akar dengan terbentuknya penghalang kehilangan oksigen akar atau *radial oxygen loss* (ROL) (Colmer 2003). ROL juga berperan dalam pembentukan plak besi dan dapat digunakan sebagai indikator adanya difusi O_2 ke akar (Doran *et al.* 2006). ROL terbentuk karena adanya suberinisasi dan lignifikasi dinding bagian luar akar (Armstrong *et al.* 2000). ROL juga berperan dalam pembentukan plak besi dan menghambat masuknya ion arsenic (Wu *et al.* 2014), sulfida (Smolders and Roelofs 1996, Armstrong dan Armstrong 2005), dan cadmium (Liu *et al.* 2007). Perubahan reduksi Fe^{2+} menjadi Fe^{3+} pada kedalaman 2,5-12,5 cm zona perakaran padi dapat digunakan sebagai indikator adanya difusi O_2 di akar (Doran *et al.* 2006). ROL yang termasuk dalam kelas gen leucine-rich repeat protein (LRR) telah dilaporkan melalui studi ekspresi gen sebagai gen yang mengontrol terbentuknya suberinisasi dan lignifikasi pada aerenkima (Fleck *et al.* 2011).

Tipe lain adaptasi tanaman padi terhadap kelebihan besi adalah dengan membiarkan besi memasuki jaringan melalui apoplas akar mengikuti arus transpirasi via xilem menuju tajuk (Marschner 1995). Pada saat transpor jarak panjang, Fe dimobilisasi dan didepositkan pada jaringan yang tidak aktif berfotosintesis seperti batang dan daun. Imobilisasi ini dihipotesiskan melalui protein penyimpanan besi ferritin (Briat *et al.* 2010, Briat and Lobréaux 1997). Kelebihan konsentrasi Fe^{2+} tinggi pada simplas mengakibatkan terjadi katalisasi pembentukan reactive oxygen species (ROS) (Bode *et al.* 1995, Becana *et al.* 1998, Majerus *et al.* 2007a). Enzim antioksidasi (superoxide dismutase isoenzymes, catalases, dan peroxidases) dan nonenzim seperti askorbat dan

glutathione berperan dalam pemulungan (*scavenging*) dan melindungi jaringan dari cekaman oksidatif (Becana *et al.* 1998; Majerus *et al.* 2007a). Sejauh ini belum diketahui peran ROS dalam memberi sinyal untuk toleransi terhadap keracunan besi, bahkan Stein *et al.* (2009) melaporkan tidak ada kaitan akumulasi besi dalam ferritin dalam sel tanaman dengan cekaman keracunan besi. Di sisi lain Arnaud *et al.* (2006) melaporkan senyawa nitrit oxide (NO) berperan dalam sinyal transduksi untuk mengaktifkan pembentukan ferritin ketika cekaman kelebihan besi pada tanaman arabidopsis.

Di samping itu telah dilaporkan peran etilen sebagai sinyal dalam meningkatkan aktivitas enzim peroksidase yang menurunkan keparahan gejala bronzing daun tanaman padi yang diberi perlakuan Fe^{2+} berlebih (Peng and Yamauchi 1993). Hal ini menunjukkan etilen di samping berperan sebagai pemberi sinyal untuk menginduksi pembentukan aerenkim juga sebagai sinyal dalam pembentukan antioksidan sebagai mekanisme toleran keracunan besi. Penelitian tentang produksi etilen pada tanaman yang dikaitkan dengan adanya cekaman biotik maupun abiotik telah banyak dilakukan. Gen yang mengatur respon tanaman terhadap cekaman lingkungan adalah ethylene response factors (ERFs) (Pegoraro *et al.* 2013). Nakano *et al.* (2006) melaporkan 122 ERF pada tanaman arabidopsis dan 137 ERF pada tanaman padi. Namun untuk ERFs yang berhubungan dengan kondisi anaerob dan keracunan besi hanya tujuh dan tidak ditemukan promotor spesifik khusus untuk meregulasi gen tersebut (dos Santos *et al.* 2013).

Sebagian besar cekaman abiotik terhadap tanaman mengakibatkan menurunnya kandungan air di tanaman akibat pengaruh langsung maupun tidak langsung (Levitt 1980). Untuk mempertahankan turgor sel, tanaman memproduksi senyawa sekunder dengan mengatur potensial air agar lebih rendah dibandingkan dengan air yang tersedia pada zona perakaran. Majerus *et al.* (2007a) melaporkan terjadi penurunan potensial air dan adanya produksi senyawa osmolite dan prolin pada tajuk genotipe toleran dan peka. Pada akar genotipe peka terjadi peningkatan potensial air yang menunjukkan kerusakan akar sehingga tidak mampu menjaga potensial air. Namun hubungan antara tipe toleransi dengan produksi senyawa osmolite seperti prolin belum pernah diteliti.

Senyawa lain yang berperan dalam menjaga potensial air adalah polyamin. Majerus *et al.* (2007b) melaporkan adanya senyawa sekunder polyamin yang meningkat pada tajuk genotipe toleran dibandingkan dengan tajuk tanaman peka. Hal tersebut diduga polyamin selain sebagai pengatur potensial air juga berperan pemulung radikal bebas dan stabilisasi membran (Velikova *et al.* 1998).

Hubungan antara konsentrasi besi dalam jaringan tanaman dengan tingkat toleransinya terhadap keracunan besi telah dilaporkan oleh sejumlah peneliti. Engel *et al.* (2012a) melaporkan pada sejumlah genotipe padi berdasarkan kemunculan gejala dan intensitas bronzing daun menunjukkan konsentrasi Fe pada daun tidak selalu berkorelasi dengan skor gejala yang rendah. Sebagai contoh genotipe CK73 dan TOX3107, dengan skor bronzing daun rendah memiliki konsentrasi besi tinggi pada jaringan tajuk (>12 mg/g). Hal ini menunjukkan adanya perbedaan antara gejala visual dengan konsentrasi Fe pada daun, yang lebih lanjut dapat membedakan genotipe apakah adaptif terhadap kondisi Fe⁺ berlebih karena menolak (avoidance) atau mengakumulasi Fe pada daun.

Sebagian besar unsur besi pada tanaman disimpan dalam kloroplast, sehingga kelebihan besi menyebabkan terpengaruhnya organel tersebut. Besi juga berperan sebagai penyusun light harvesting complex (LHC) (Yadavalli *et al.* 2012). Peningkatan fotoinhibition pada tanaman kacang hijau akibat adanya perlakuan besi berlebih yang mempengaruhi proses fotosintesis (Pereira *et al.* 2013). Kelebihan zat besi menimbulkan peningkatan yang signifikan pada sitokrom b6/f dalam tilakoid, yang mengarah kepada kepekaan pada fotosistem II yang menurunkan laju fotosintesis dan produksi O₂ (Suh *et al.* 2002). Keracunan besi juga mengakibatkan menurunnya permeabilitas membran sel penjaga yang mengatur pembukaan stomata (Pereira *et al.* 2013).

GENETIK DAN REGULASI GEN UNTUK TOLERAN KERACUNAN BESI

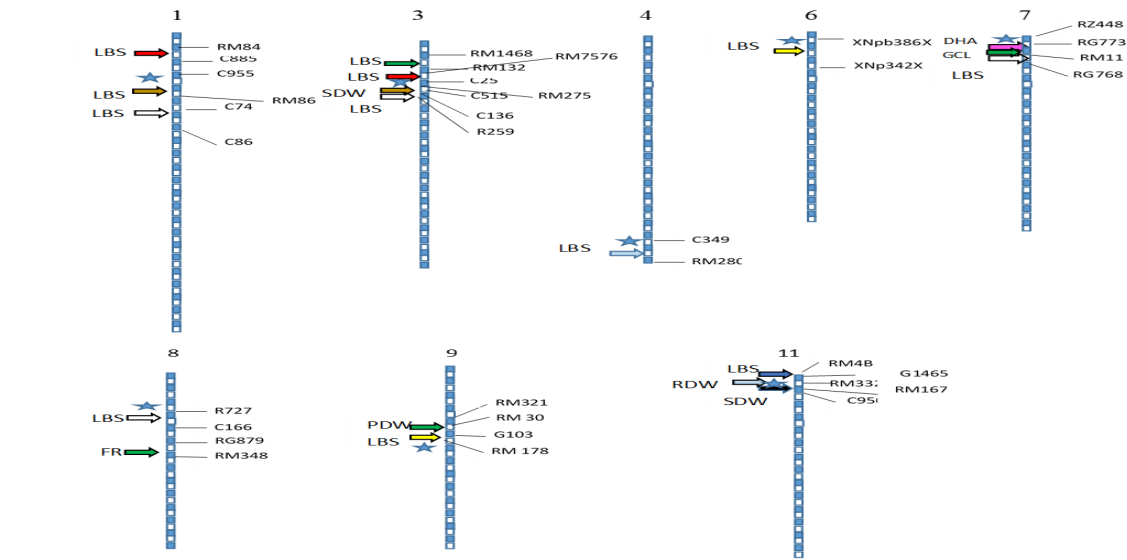
Toleransi tanaman padi terhadap keracunan besi merupakan karakter yang kompleks yang dikontrol oleh banyak gen. Suhartini *et al.* (1996) melaporkan pengaruh gen aditif, dominan, dan adanya interaksi alelik sangat nyata terhadap karakter toleran keracunan Fe. Suhaimi (1992) melaporkan efek gen-gen aditif maupun nonaditif pada persilangan varietas Kapuas, Batang Ombilin dan Tuntang. Abifarin (1986) melaporkan gen pengendali karakter toleran keracunan besi pada varietas Gissi 27 bersifat resesif. Heritabilitas karakter agronomi dan hasil padi dari persilangan tetua tahan (Pokkali and Mahsuri) dengan tetua peka (Inpara 5) pada kondisi tercekam dan normal juga dilaporkan rendah (Nugraha *et al.* 2016d). Studi pewarisan sifat di rumah kaca menggunakan larutan hara dengan cara skoring digital menunjukkan bronzing daun merupakan karakter kuantitatif yang memiliki heritabilitas kecil-sedang (Nugraha *et al.* 2016c). Informasi genetik ini penting bagi pemulia untuk pemilihan tetua, menentukan metode seleksi dan tahapan seleksi guna mendapatkan varietas toleran keracunan besi dengan karakter lain yang diinginkan.

Studi genetik menggunakan pemetaan gen melalui analisis QTL yang berkaitan dengan tipe toleransi terhadap keracunan Fe juga telah banyak dilakukan, dengan berbagai marka dan menggunakan populasi yang berbeda (Gambar 2). Pengembangan marka molekuler yang lebih efektif dalam mengidentifikasi gen target terus dilakukan, di antaranya Single nucleotide polymorphisms (SNPs). SNP merupakan perubahan satu basa nukleotida pada satu sekuen gen target yang melimpah dan terdistribusi pada genom makhluk hidup, termasuk tanaman padi (Mc Couch *et al.* 2010). SNP menjadi pilihan untuk dapat mengidentifikasi gene target karena melimpahnya polimorfisme dan memiliki kestabilan yang tinggi (Ganal *et al.* 2009), sehingga dapat digunakan sebagai alat seleksi yang cepat dan efektif (Collard and Mackill 2008). Gambar 2 menjelaskan ko-lokalisasi sejumlah QTL yang terletak pada kromosom 1,3,4,6,8,9, dan 11 dan berdekatan dengan sejumlah marka SNP berbasis Golden-Gate Illumina assay (Nugraha *et al.* 2016b).

Identifikasi ekspresi gen dari rangkaian metabolisme yang menyebabkan tanaman toleran terhadap keracunan besi akan membantu dalam memahami respon biokimia tanaman dan gen yang meregulasi karakter tersebut. Quinet *et al.* (2012) melaporkan adanya perbedaan transkripsi gen menggunakan teknik micro array setelah 3 hari perlakuan kelebihan besi, yaitu kluster gen dalam pembentukan senyawa karbon, transpor oksigen, dan elektron serta sinyal transduksi. Ricachenevsky *et al.* (2010) melaporkan adanya regulasi gen OsWRK80 pada daun, batang, dan akar tanaman padi yang diberi cekaman besi berlebih. Divol *et al.* (2012) telah melaporkan tanaman arabidopsis dua transporter besi, YELLOW STRIPE1-LIKE, YSL4 dan YSL6 berperan dalam pengaturan kelebihan besi pada kloroplas. Inaktivasi kedua gen tersebut menyebabkan tanaman peka terhadap keracunan besi.

Kelebihan besi pada sel tanaman yang bersifat meracun dapat dihindari dengan mengakumulasi ke dalam protein penyimpan besi, ferritin. Protein ini dapat menyimpan lebih dari 4.500 atom besi dan dapat berperan sebagai bufer dalam sel tanaman (Harrison and Arosio 1996). Majerus *et al.* (2007b) melaporkan sintesis ferritin yang tinggi pada padi Afrika *O. glaberrima* yang menyebabkan lebih toleran terhadap keracunan besi. Stein *et al.* (2009) melaporkan adanya perbedaan regulasi gen ferritin, OsFER1 dan OsFER2, dimana aktivitas mRNA dan OsFER2 ditemukan lebih tinggi pada daun bendera ketika diberikan perlakuan kelebihan besi dan dapat diinduksi menggunakan asam absisic bebas (ABA-independent).

Tanaman padi dalam mengatasi kekurangan besi menggunakan strategi II, yaitu melibatkan enzim 2'-



- ➡ 135 DH persilangan *Azucena/IR64* – kultur hara, Zeijang, China (Wu et al. 1998)
 - ➡ 96 BC₁F₉ I persilangan *Nipponbare/Kasalath//Nipponbare* – Kultur hara, Nanjing, China (Wan et al. 2003a),
 - ➡ 66 CSSLs persilangan *Asominori/IR24* – Kultur hara, Nanjing, China, (Wan et al. 2003b)
 - ➡ F3 persilangan *Gimbozu/Kasalath*— Kultur hara, Tokyo, Japan, (Shimizu 2009)
 - ➡ 164 RILs persilangan *Azucena/IR64* –Lapang, Burkina Faso (Dufey et al. 2012a)
 - ➡ 164 RILs persilangan *Azucena/IR64* – Kultur hara, phytotron, (Dufey et al. 2009)
 - ➡ 40 RILs persilangan *Azucena/IR64* – Kultur hara, greenhouse in Belgium (Dufey et al. 2012a)
 - ➡ 220 BC₃DH persilangan interspecific *MG12/Caiapo//Caiapo* – nutrient solution, (Dufey et al. 2015).
 - ➡ 121 RILs persilangan *IR29/Pokkali* – nutrient solution, greenhouse (Wu et al. 2014)
- Markah Asosiasi SNPs 18 genotipe di rumah kaca dan lapang (Nugraha et al. 2016b)

Gambar 2. Ko-lokalisasi assosiasi marker-karakter terkait toleransi terhadap keracunan besi yang telah dilaporkan sejumlah peneliti. Lokasi QTLs didasarkan pada posisi kromosom yang dihimpit oleh marker. Satu strip (biru dan putih) merepresentasikan 1 Mb. Panah merepresentasikan posisi QTL berdasarkan pemetaan menggunakan populasi biparental, bintang merepresentasikan posisi marker hasil assosiasi m. LBS, leaf bronzing, SDW, shoot dry weight, DHA, dehydrate ascorbate activity, RDW, root dry weight, PDW, panicle dry weight, GCL, growth cycle length, FR, fertility.

deoxymugineic acid (DMA) untuk menkelat Fe^{2+} pada zona perakaran. Sejumlah gen yang terlibat dalam proses tersebut di antaranya OsNAS1, OsNAS2, OsNAS3, OsNAAT1, dan OsDMAS1 atau transporter yang terinduksi ketika kekurangan besi yaitu OsYSL2, OsYSL15, dan OsIRT1 (Kobayashi and Nishizawa 2012). Padi umumnya ditanam pada kondisi anaerob (sawah) yang ketersediaan besi melimpah, sehingga memungkinkan transfer langsung menggunakan transporter Fe^{2+} , seperti OsIRT1 (Bugchio et al. 2002) dan OsIRT2 (Ishimaru et al. 2006) seperti pada strategi I penyerapan besi. Di samping itu dilaporkan tanaman padi dapat mengambil langsung Fe^{3+} dengan bantuan ferric-chelate reductase oxidase gene OsOFR1 dan OsOFR7. Over ekspresi gen tersebut juga berperan meningkatkan toleransi tanaman terhadap berbagai stres

abiotik seperti temperatur dan kegaraman tinggi (Wang et al. 2013). Belum ada laporan tentang manipulasi ekspresi gen melalui over ekspresi atau penghentian gen yang berkaitan dengan regulasi homeostatis besi untuk mengurangi penyerapan Fe^{2+} pada kondisi berlebih yang menyebabkan keracunan.

METODE SKIRINING PADI TOLERAN KERACUNAN BESI

Penelitian keracunan besi di lapang sulit dikontrol karena kondisi lingkungan yang beragam, sehingga gejala keracunan besi pada varietas toleran tidak dapat dibedakan dengan yang peka (Nozoe et al. 2008). Seleksi

genotipe toleran keracunan besi atau untuk mempelajari fisiologi penyerapan besi perlu percobaan yang lebih terkontrol di rumah kaca menggunakan media larutan hara tertentu. Penggunaan larutan hara untuk identifikasi genotipe toleran yang berkaitan dengan cekaman kelebihan atau kekurangan ion tertentu biasa dilakukan. Penambahan konsentrasi besi dalam larutan hara sering kali terjadi pretisipasi ion ferro (Fe^{2+}) yang mudah teroksidasi menjadi ion ferri (Fe^{3+}) yang kurang larut dan tidak tersedia bagi tanaman. Beberapa metode untuk menurunkan presipitasi ion besi telah dilakukan sejumlah peneliti, di antaranya dengan menurunkan temperatur hingga di bawah 20°C (Shimizu *et al.* 2005), pemberian kelator gas N_2 (de Dorlodot *et al.* 2005; Dufey *et al.* 2009), media cair dan agar pada tabung silikon (Asch *et al.* 2005), penambahan 0,1% dan 0,2% agar (Wang *et al.* 2008,

Nugraha *et al.* 2016a), dan penggunaan Fe-EDTA (Elec *et al.* 2013). Di antara metode tersebut, penggunaan media agar cair menjadi pilihan terbaik karena viskositas agar memberikan kestabilan potensial redok dan pH pada media serta perkembangan akar yang mendekati kondisi lingkungan tumbuh di tanah dibandingkan dengan larutan media tanpa agar (Wang *et al.* 2008). Nugraha *et al.* (2016a) memperbaiki metode skrining menggunakan agar dengan menaikkan konsentrasi agar menjadi 0,2% selama 10 hari, di mana hasil skrining sejumlah varietas memiliki reaksi yang sama dengan laporan hasil sebelumnya dengan korelasi $r = 0,67^{**}$. Perbedaan reaksi beberapa varietas terhadap keracunan besi di lapang dan rumah kaca memiliki reaksi yang berbeda yang kemungkinan disebabkan oleh perbedaan metode pengujian (Tabel 2).

Tabel 2. Perbandingan reaksi beberapa varietas padi terhadap keracunan besi di lapang dan rumah kaca.

Genotipe	Agroekosistem dan asal galur	Reaksi terhadap keracunan besi	
		Pustaka	Studi di lap dan rumah kaca*
IR64	padi sawah, IRRI ^a	Sensitif	Sensitif
IPB107F-5-1-1	Padi rawa, IPB ^b	No data ^d	Sensitif
Inpara5	padi sawah, IRRI	Sensitif ^{f,g}	Sensitif
Fatmawati	padi sawah, BBPADI ^c	No data ^g	Sensitif
Batu Tegi	Padi gogo, BBPADI	No data ^g	Moderat
IPB Kapuas 7R	Padi rawa, IPB	Toleran ^e	Moderat
IPB Batola 6R	Padi rawa, IPB	No data ^e	Moderat
A. Tenggulung	Padi rawa, BBPADI	Toleran ^g	Moderat
Indragiri	Padi rawa, BBPADI	Toleran ^{g,hj}	Moderat
B13100-2-MR-2	Padi rawa, BBPADI	Toleran ⁱ	Moderat
IPB Batola 5R	Padi rawa, IPB	No data ^e	Moderat
Inpara 3	Padi rawa, BBPADI	Moderat ^{g,j}	Moderat
Limboto	Padi rawa, BBPADI	No data ^g	Moderat
IPB1 R Dadahup	Padi gogo, IPB	No data ^g	Moderat
Mahsuri	Padi rawa, Lokal	Toleran ^e	Toleran
Mesir	Padi rawa, Lokal	Toleran ^k	Toleran
Inpara 2	Padi sawah, BBPADI	No data ⁱ	Toleran
Margasari	Padi rawa, BBPADI	Toleran ^g	Toleran
B13144-1-MR-2	Padi rawa, BBPADI	Toleran ^g	Toleran
Cilamaya	Padi rawa, BBPADI	Toleran ^k	Toleran
Kapuas	Padi sawah, BBPADI	Toleran ^g	Toleran
Pokkali	Padi rawa, Lokal	Toleran ^m	Toleran
Awan Kuning	Padi sawah, Lokal	Toleran ^o	Toleran
Siam Saba	Padi rawa, Lokal	Toleran ^o	Toleran

* Studi dilapang dilakukan di KP Taman Bogo dan di rumah kaca menggunakan larutan hara Yoshida dengan agar 0,2% menggunakan konsentrasi besi 400 mg/l (Nugraha *et al.* 2016a).

^a International Rice Research Institute; ^b Institute Pertanian Bogor.

^c Balai Besar Penelitian Tanaman Padi; ^d Rekomendasi varietas cek sensitif untuk keracunan besi (Suhartini and Makarim 2009);

^e Varietas yang dilepas IPB (http://dri.ipb.ac.id/PDF_file/Buku_varietas_3%Feb%202014.pdf)

^f NILs dari IR64 membawa gen Sub1 dengan IRRI kode IR84194-139 (Septiningsih *et al.* 2015).

^g Varietas yang dilepas oleh kementerian Pertanian (<http://bbpadi.litbang.pertanian.go.id/index.php/publikasi/buku/content/item/150-deskripsi-varietas-padi-2013>)

^h Dilaporkan toleran pengujian di Sumatera Selatan (Harahap *et al.* 2014)

ⁱ Galur harapan dengan hasil tinggi di uji daya hasil padi rawa (Nugraha *et al.* 2012)

^j Tetua toleran keracunan besi (Suhartini *et al.* 1996)

^k Varietasb (Suhartini and Makarim 2009)

^l Varietas lokal dari Kalimantan (Suhartini 2004)

^m Varietas toleran dengan tipe toleransi ekskluder (Engel *et al.* 2012a) dan toleran terhadap salinitas (Gregorio *et al.* 2002)

Selain menggunakan larutan hara, metode seleksi cepat untuk membedakan varietas toleran dan peka dapat dikombinasikan dengan indentifikasi cara invivo (Engel *et al.* 2012b). Foto digital memanfaatkan indeks RGB (red, green, blue) untuk menghindari subjektivitas dalam menentukan skor toleransi (Nugraha *et al.* 2016c). Cara sederhana, cepat dan murah tersebut dilakukan menggunakan pewarnaan invivo 2,22 bipyridine yang diaplikasikan dengan pencelupan tanaman selama 24 jam. Perbaikan metode ini telah dilakukan oleh Nugraha *et al.* (2017) dengan penetesan larutan yang sama dengan konsentrasi 10 mM pada preparat sampel sebelum diamati di bawah mikroskop. yang dapat menduga tipe toleransi sejumlah varietas tanaman padi. Kedua penelitian tersebut mampu menduga tipe toleransi varietas Pokkali bertipe excluder, sedangkan sebagian besar varietas padi lainnya bertipe includer.

PLASMA NUTFAH PADI TOLERAN KERACUNAN BESI

Secara umum varietas lokal yang mendominasi plasma nutfah padi yang toleran keracunan Fe di antaranya Sigiliti, Mesir, Angkong, Pontianak, *Oryza rufifogon*, *O. barthii*, dan *O. glumaepatula* (Suhartini 1999). Pembagian klaster toleransi terhadap cekaman besi pada varietas padi lokal menjadi empat kelompok berdasarkan SNP-OSIRT1 (Utami dan Sumantri 2014). Hal ini menunjukkan perbedaan genetik dan mekanisme toleransi yang berbeda di antara plasma nutfah padi yang telah diuji. Peluang untuk mendapatkan varietas toleran keracunan Fe dengan sifat-sifat agronomi penting yang baik menjadi lebih besar. Dari penelitian lain juga teridentifikasi varietas unggul padi sawah toleran besi seperti IR36, IR42, IR74, IR70, Tondano, Kelara, dan Semeru (Ismunadji 1990) dan Cilamaya Muncul, Batang Ombilin, Way Seputih, Ciliwung, Bengawan Solo, dan Cibodas (Suhartini 1999). Varietas-varietas tersebut dapat dianjurkan untuk ditanam pada lahan keracunan Fe.

STATUS PERAKITAN VARIETAS TOLERAN KERACUNAN BESI DI INDONESIA

Tujuan pemuliaan tanaman adalah meningkatkan mutu genetik yang diinginkan dan atau meminimalkan sifat yang tidak diinginkan. Perbaikan varietas padi toleran keracunan Fe telah dilakukan sejak tahun 1970-an terutama pada agroekosistem lahan rawa pasang surut (Ismunadji 1990). Namun adopsi varietas toleran keracunan Fe masih sangat rendah dan yang mendominasi pertanaman padi lahan pasang surut adalah

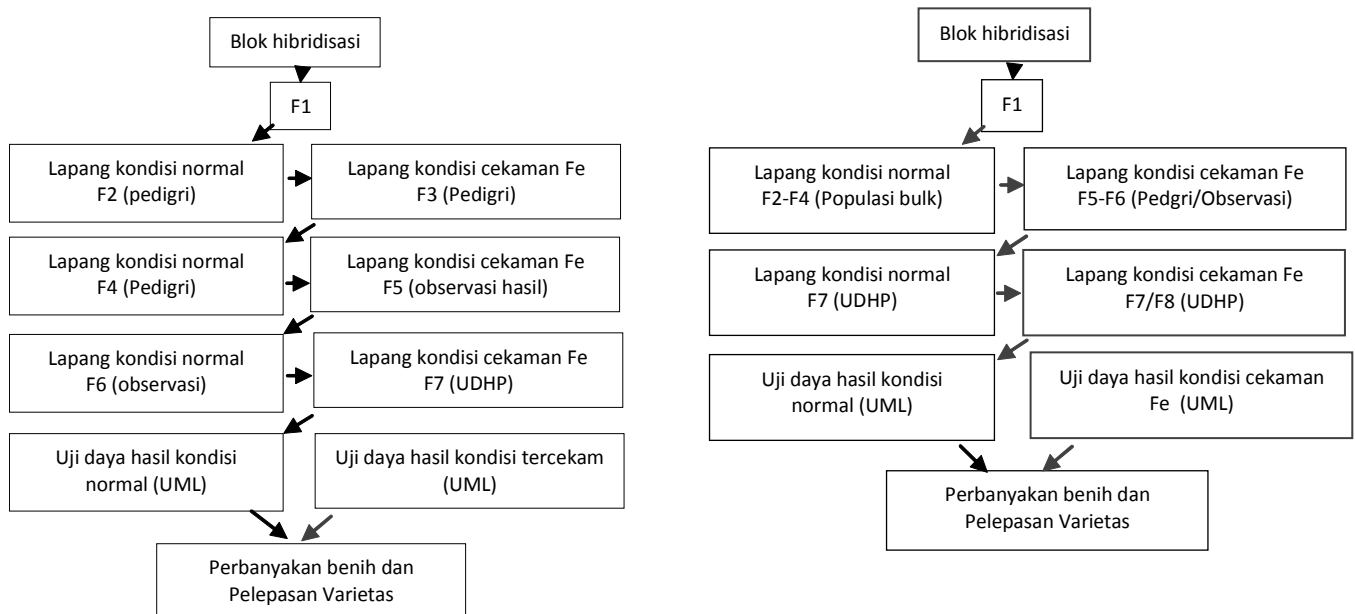
varietas lokal berumur dalam (5-6 bulan) dengan hasil rendah (Ruskandar *et al.* 2008). Varietas unggul yang dihasilkan selain toleran keracunan Fe juga perlu memiliki sifat-sifat penting lain seperti potensi hasil tinggi dan tahan terhadap hama/penyakit utama, dan mutu beras sesuai dengan preferensi petani (Suhartini and Makarim 2009)

Untuk mendapatkan varietas unggul padi toleran Fe dan memiliki karakter baik lainnya, perlu dirancang program perakitan padi toleran keracunan Fe. Kegiatan yang berkaitan dengan perbaikan varietas meliputi (1) evaluasi plasma nutfah padi toleran keracunan Fe, (2) pembentukan bahan populasi melalui persilangan, dan (3) seleksi galur/varietas terhadap keracunan Fe, bentuk tanaman ideal dengan tinggi tanaman sedang hingga pendek, umur sedang hingga genjah (100-115 hari), mutu beras baik, tahan hama dan penyakit utama, serta potensi hasil tinggi. Selain melalui persilangan, perbaikan varietas juga dilakukan melalui pengujian galur-galur introduksi. Melalui kerja sama dengan IRRI diperoleh galur toleran keracunan Fe. Beberapa galur introduksi yang menunjukkan sifat-sifat baik dapat dikembangkan lebih lanjut setelah melalui proses seleksi dan uji adaptasi. Karakter hasil dan toleransi terhadap Fe memiliki heritabilitas rendah, oleh karena itu Nugraha *et al.* (2017) menyarankan penggunaan model seleksi *shuttle breeding* untuk memperoleh varietas yang mampu beradaptasi di lingkungan tercekam Fe maupun lingkungan normal (Gambar 3A). Dengan pertimbangan penanganan materi yang banyak pada generasi awal dan terbatasnya sumber daya maka dilakukan modifikasi model *shuttle breeding* dalam hal waktu dan metode seleksi (Gambar 3B). Modifikasi ini dikembangkan di Balai Besar Tanaman Padi untuk menyeleksi galur unggul padi rawa.

GALUR HARAPAN DAN VARIETAS UNGGUL BARU TOLERAN BESI

Pada tahun 2013-2015 telah dilakukan pengujian multilokasi di enam lokasi rawa pasang surut maupun lebak. Semua galur yang diuji toleran terhadap keracunan besi dengan skor 1-2 (toleran), kecuali galur IR83835-95-1-1-3 yang memiliki skor 5 (moderat sensitif) (Tabel 3). Beberapa galur memiliki toleransi terhadap keracunan aluminium seperti AGH43-1-2, IR84941-12-1-2, BMIP-46-4-1, AGH42-2-3 dan GH137-7-SKI-B, sehingga galur-galur tersebut prospektif dikembangkan pada lahan pasang surut.

Varietas unggul yang memiliki toleransi terhadap keracunan besi umumnya padi rawa. Sejak tahun 2008 telah dilepas 14 varietas unggul padi untuk lahan rawa yang berasal dari BB Padi dan IPB (Tabel 4). Varietas

Gambar 3. Model *shuttle breeding* (A) dan modifikasi *shuttle breeding* yang dikembangkan di BB Padi (B).

Tabel 3. Galur harapan padi toleran keracunan Fe .

Galur harapan	Rata-rata hasil (t/ha)	Kisaran hasil (t/ha)	Skor Fe	Skor rendeman	RPA (AI skor)
IR84941-12-1-2	4,05	3,20–5,78	1 (T)	S	0,66 (MT)
IR83835-95-1-1-3	4,45	3,80–5,39	5 (MS)	S	0,61 (S)
BMIP-46-4-1	3,86	2,24–5,48	2 (T)	S	0,63 (MT)
AGH42-2-3	3,81	2,69–4,96	2 (T)	S	0,67 (MT)
AGH43-1-2	3,78	2,61–5,15	1 (T)	S	0,87 (T)
GH137-7-SKI-B	3,79	2,60–5,10	1 (T)	S	0,64 (MT)
B11377F-MR-34-2	4,74	4,13–6,02	2 (T)	T	0,46 (S)
B11586F-MR-11-2-2	4,16	3,08–5,63	1 (T)	S	0,44 (S)
B10891B-MR-3-KN-4	3,95	2,43–5,48	2 (T)	S	0,47 (S)
IR42	4,02	2,99–5,54	5 (MS)	S	0,47 (S)
Inpara 2	4,33	2,96–5,89	3 (MT)	S	0,37 (S)
Martapura	3,22	0,70–4,74	2 (T)	S	0,65 (S)
Mahsuri (Cek keracunan besi)			1 (T)	-	
IR64 (Cek Peka keracunan besi)			7 (S)	-	
FR13A (Cek toleran rendaman)			-	T	

Sumber: Rumanti *et al.* (2016).

unggul padi rawa tersebut ternyata memiliki reaksi yang berbeda terhadap keracunan besi, meskipun secara umum menunjukkan reaksi toleran. Varietas Inpara 5 peka keracunan Fe (Nugraha *et al.* 2016b) karena berasal dari galur (NILs) padanan IR64 yang juga peka terhadap keracunan besi (Suhartini 1999). Varietas Inpara 5 memiliki gen SUB1 yang toleransi terhadap genangan (Septiningsih *et al.* 2015). Penambahan gen SUB1 pada varietas Inpara 5 tidak memberikan berkontribusi terhadap toleransi keracunan besi.

PROSPEK PERAKITAN PADI TOLERAN BESI

Mekanisme toleransi varietas padi terhadap keracunan besi cukup beragam (Gambar 1). Perbedaan mekanisme tersebut terlihat saling bebas dan kemungkinan dikendalikan oleh gen yang berbeda. Oleh karena itu terbuka peluang untuk memperbaiki varietas toleran yang hanya memiliki satu mekanisme menjadi dua mekanisme toleransi, sehingga toleransinya meningkat. Diketahuinya mekanisme toleransi tanaman padi yang bersifat inkluder

Tabel 4. Varietas padi rawa yang dilepas sejak tahun 2008 yang memiliki perbedaan toleransi keracunan Fe dan karakteristik unggul lainnya.

Nama varietas ^a	Tahun dilepas	Rata-rata hasil	Potensi hasil (t/ha)	Fe	AC	WBC	HDB	Blas	AI	Ren ^b
Inpara 1	2008	5,65	6,47	T	27,9	AT (1,2)	AT (III)	AT	T	P
Inpara 2	2008	5,49	6,08	T	22,0	AT (2)	AT	AT	T	P
Inpara 3	2008	4,60	5,60	AT	28,2	AT (3)	P	T	AT	AT
Inpara 4	2010	4,70	7,60	AT	29,0	AT (3)	T	-	-	T
Inpara 5	2010	4,50	7,20	P ^c	25,2	AR (3)	T	AT	P	T
Inpara 6	2010	4,70	6,00	T	24,0	R (1,2)	AT (IV)	-	-	P
IPB Batola 1R	2010	4,10	4,70	T	23,0	AT(1)	AT(IV)	T	T	P
IPB Batola 2R	2010	4,2	5,10	T	20,0	AT(2,3)	-	T	-	P
Inpara 7	2012	4,50	5,10	AT	20,0	R (1,2)	-	AT	AT	P
Inpara 8	2014	4,70	6,00	T	28,5	AR (1,2)	T (III)	AT	T	T
Inpara 9	2014	4,20	5,60	T	25,2	AR (1,2)	T (III)	AT	T	P
IPB Batola 5R	2014	4,30	5,30	-	24,9	T(1)	T(III)	1	-	P
IPB Batola 6R	2014	4,20	4,90	-	26,3	AR (1,2)	AT (III)	AR (IV)	-	P
IPB Kapuas 7R	2014	4,50	5,1	T	21,5	AT(1)	-	AT	T	P

Fe, reaksi terhadap keracunan besi, AC, Kadar amilosa, WBC, wereng batang coklat, HDB, hawar daun bakteri, AI, Aluminium, Ren, Rendaman, T, toleran, AT, Agak toleran, AR, agak sensitif, P, peka.

^aVarietas yang berasal dari BB Padi. (<http://bbpadi.litbang.pertanian.go.id/index.php/publikasi/buku/content/item/150-deskripsi-varietas-padi-2013>) dan IPB (http://dri.ipb.ac.id/PDF_file/Buku_varietas_3%20Feb%202014.pdf)

^bYualianida *et al.* (2014) and Nugraha *et al.* (2013).

memungkinkan pembentukan varietas yang dapat mengakumulasi Fe tanpa menyebabkan keracunan terhadap pertumbuhan tanaman. Konsentrasi besi yang tinggi pada tajuk tanpa menyebabkan kerusakan pada jaringan tanjak merupakan syarat untuk dapat diakumulasikannya besi pada gabah. Masuda *et al.* (2012) menggunakan rekayasa genetika dengan membuat over ekspresi kemampuan jaringan dalam mengakumulasi besi di akar, tajuk, dan endosperma. Varietas Inpara 2, memiliki toleransi jaringan terhadap kondisi besi tinggi (Nugraha *et al.* 2016b), sehingga dianjurkan untuk tetua perakitan padi yang memiliki akumulasi besi tinggi pada gabah.

Beberapa QTL dari populasi bi-parental dari persilangan yang berasosiasi dengan karakter toleran keracunan besi memiliki koefisien keterpautan relatif rendah dan heritabilitas yang rendah, sehingga aplikasinya untuk seleksi menjadi tidak efektif (Dufey *et al.* 2009, 2012a; Shimizu 2009; Shimizu *et al.* 2005; Wan *et al.* 2003a, b; Wu *et al.* 1997, 1998; Wu *et al.* 2014; Dufey *et al.* 2012b; Dufey *et al.* 2014). Oleh karena itu metode identifikasi marka terpaut dengan karakter toleransi keracunan besi dilakukan dengan pendekatan lain, yaitu dengan asosiasi berdasarkan populasi nonbiparental dengan memanfaatkan fenomena *linkage disequilibrium* (LD). LD merupakan allele yang berasosiasi secara nonrandom pada posisi lokus yang berbeda (Flint-Garcia *et al.* 2003). Fenomena ini mampu mengukur keterkaitan antara polymorphism suatu genotipe dengan genotipe lainnya akibat rekombinasi bersama dari tetua pendahulu. Dengan adanya *next generation sequencing* (NGS)

berbasis single nucleotide polymorphisms (SNPs), identifikasi asosiasi antara marker dengan fenotipik menjadi lebih murah, efektif, dan telah diaplikasikan pada sejumlah tanaman (Edwards and Gupta 2013). Di antara penelitian asosiasi marker-karakter juga mampu mengukur karakter yang memiliki heritabilitas rendah seperti toleran keracunan garam pada tanaman padi (Negrao *et al.* 2013), produksi pati pada gandum (Larrisa *et al.* 2004), dan defisiensi besi pada tanaman kedelai (Wang *et al.* 2008).

KESIMPULAN

Karakter toleransi keracunan besi pada tanaman padi dari aspek genetik bersifat kuantitatif dengan heritabilitas rendah. Oleh karena itu penggunaan metode seleksi yang tepat akan menentukan keberhasilan program perakitan varietas yang diinginkan. Metode *shuttle breeding* atau seleksi pada generasi akhir dengan mempertahankan keragaman genetik pada generasi awal merupakan metode yang paling baik untuk mendapatkan tanaman padi dengan karakter agronomi baik dan toleran keracunan besi.

Program pemuliaan padi toleran keracunan besi memerlukan kajian karakter fisiologi tanaman yang mempengaruhi mekanisme toleransi supaya proses seleksi tanaman yang diinginkan lebih terarah. Penggunaan teknik molekuler diharapkan dapat membantu pemulia melakukan seleksi karakter toleransi terhadap keracunan besi menjadi lebih mudah dan terarah.

Terdapat peluang peningkatan toleransi tanaman padi terhadap keracunan besi menggunakan lebih dari satu mekanisme toleran.

DAFTAR PUSTAKA

- Abifarín, A.O. 1986. Inheritance of tolerance to iron toxicity in two rice cultivars. *In: Proceeding of the International Rice Genetics Symposium*. 27-31 May 1985. Manila (PH): The International Rice Research Institute.
- Armstrong, W. 1979. Aeration in higher plants. *In: Advances in Botanical Research*, 7 (Ed. by H. W. Woolhouse), pp.225-332. Academic Press, London
- Armstrong, J. and W. Armstrong. 2005. Rice: sulfide-induced barriers to root radial oxygen loss, Fe²⁺ and water uptake, and lateral root emergence. *Ann. Bot.* 96:625–38 doi: 10.1093/aob/mci215
- Armstrong, W., D. Cousins, J. Armstrong, D.W. Turner, and P.M. Beckett. 2000. Oxygen distribution in wetland plant roots and permeability barriers to gas-exchange with the rhizosphere: a microelectrode and modelling study with *Phragmites australis*. *Ann. Bot.* 86:687-703. doi:10.1006/anbo.2000.1236
- Armstrong, W., S.H.F.W. Justin, P.M. Beckett, and S. Lythe. 1991. Root adaptation to soil waterlogging. *Aqua Bot.* 39:57-73. doi: 10.1016/0304-3770(91)90022-W
- Arnaud, N., I. Murgia, J. Boucherez, J. Briat, F. Cellier, and F. Gaymard. 2006. An Iron-induced Nitric Oxide Burst Precedes Ubiquitin-dependent Protein Degradation for Arabidopsis AtFer1 Ferritin Gene Expression. *J. Biol. Chem.* 281(33):23579–23588. doi 10.1074/jbc.M602135200
- Asch, F., M. Becker, and D.S. Kpongor. 2005. A quick and efficient screen for resistance to iron toxicity in lowland rice. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 168:764–773. doi:10.1002/jpln.200520540
- Audebert, A., and M. Fofana. 2009. Rice Yield gap due to iron toxicity in West Africa. *J. Agron. Crop Sci.* 195:66-76. doi: 10.1111/j.1439-037X.2008.00339.x
- Audebert, A., and K.L. Sahrawat. 2000 Mechanisms for iron toxicity tolerance in lowland rice. *J. Plant Nutr.* 23:1877–1885. doi: 10.1080/01904160009382150
- Becana, M., J.F. Moran, and I. Iturbe-Ormaetxe. 1998. Iron-dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: toxicity and antioxidant protection. *Plant Soil* 201:137–147. doi: 10.1023/a:1004375732137
- Becker, M. and F. Asch. 2005. Iron toxicity in rice—conditions and management concepts. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 168:558–73. doi: 10.1002/jpln.200520504
- Begg, C.B.M., G.J.D. Kirk, A.F. Mackenzie, and H.U. Neue. 1994. Root-induced iron oxidation and pH changes in the lowland rice rhizosphere. *New Phytol.* 128:469-477. doi: 10.1111/j.1469-8137.1994.tb02993.x
- Benckiser, G., J.C.G. Ottow, S. Santiago, and I. Watanabe. 1982. Physiochemical Characterization of Iron-Toxic Soils in Some Asian Countries. IIRI Research Paper Series No. 85. Manila (PH): The International Rice Research Institute. pp. 11.
- Bode, K., O. Dçring, L. Liithje, H.U. Neue, and M. Bçttger. 1995. The role of active oxygen in iron tolerance of rice (*Oryza sativa* L.). *Protoplasma* 184:249-255. doi:10.1007/bf01276928
- Briat, J.F., I. Fobis-Loisy, N. Grignon, S. Lobréaux, N. Pascal, G. Savino, S. Thoiron, N. von Wirn, and O. van Wuytswinkel. 1995. Cellular and molecular aspects of iron metabolism in plants. *Biol. Cell.* 84:69-81. doi:10.1016/0248-4900(96)81320-7
- Briat, J.F. and S. Lobréaux. 1997. Iron transport and storage in plants. *Trend Plant Sci.* 2(5):187-193. doi:10.1016/S1360-1385(97)85225-9
- Briat, J.F., K. Ravet, N. Arnaud, C. Duc, J. Boucherez, B. Touraine, F. Cellier, and F. Gaymard. 2010. New insights into ferritin synthesis and function highlight a link between iron homeostasis and oxidative stress in plants. *Annals Bot.* 105:811–822. doi:10.1093/aob/mcp128
- Bughio, N., H. Yamaguchi, N.K. Nishizawa, H. Nakanishi and S. Mori. 2002. Cloning an iron-regulated metal transporter from rice. *J. Exper. Bot.* 53(374):1677-1682. doi:10.1093/jxb/erf004
- Collard, B.C.Y, and D.J. Mackill. 2008. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 363:557–572. doi:10.1098/rstb.2007.2170.
- Colmer, T.D. 2003. Aerenchyma and an inducible barrier to radial oxygen loss facilitate root aeration in upland, paddy and deep-water rice (*Oryza sativa* L.). *Ann. Bot.* 2:301–309. doi:10.1093/aob/mcf114
- da Silveira, V.C., A. de Oliveira, R.A. Sperotto, L.S. Espindola, L. Amaral, J.F. Dias, C.B. da Cunha, and J.P. Fett. 2007. Influence of iron on mineral status of two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Braz. J. Plant Physiol.* 19(2):127-139. doi:10.1590/S1677-04202007000200005
- de Dorlodot, S., S. Lutts, and P. Bertin. 2005. Effects of ferrous iron toxicity on the growth and mineral composition of interspecific rice. *J. Plant Nutr.* 28(1):1-20. doi:10.1081/PLN-200042144
- Divol, F., D. Couch, G. Conéjéro, H. Roschztardt, S. Mari, and C. Curie. 2013. The arabidopsis yellow stripe like 4 and 6 transporters control iron release from the chloroplast. *Plant Cell* 25(3):1040-1055. doi:10.1105/tpc.112.107672
- Dobermann, A., and T.H. Fairhurst. 2000. Nutrient disorders and nutrient management. Manila (PH):The International Rice Research Institute. p.191.
- Doran, G., P. Eberbach, and S. Helliwell. 2006. The impact of rice plant roots on the reducing conditions in flooded rice soil. *Chemosphere* 63:1892–1902. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.10.027

- dos Santos, R.S., M.M. Krüger, and C. Pegoraro. 2013. Transcriptional regulation of seven ERFs in rice under oxygen depletion and iron overload stress. *Trop. Plant Biol.* 6:16–25. doi:10.1007/s12042-013-9117-1
- Dufey, I., M. Anne-Sophie, X. Draye, and S. Lutts. 2014. Construction of an integrated map through comparative studies allows the identification of candidate regions for resistance to ferrous iron toxicity in rice. *Euphytica*. 203:59–69. doi: 10.1007/s10681-014-1255-5
- Dufey, I., X. Draye, S. Lutts, M. Lorieux, C. Martinez, and P. Bertin. 2012b. QTL mapping for resistance to ferrous iron toxicity in rice using an interspecific backcross *Oryza sativa* x *Oryza glaberrima*. In: Dufey I Genetic determinism of resistance mechanisms to ferrous iron toxicity in rice. Ph.D. thesis, Université catholique de Louvain (UCL), Louvain-La-Neuve, Belgium, p.173.
- Dufey, I., X. Draye, S. Lutts, M. Lorieux, C. Martinez, and P. Bertin. 2015. Novel QTLs in an interspecific backcross *Oryza sativa* x *Oryza glaberrima* for resistance to iron toxicity in rice. *Euphytica* 204(3):609-625. doi: 10.1007/s10681-014-1342-7
- Dufey, I., P. Hakizimana, X. Draye, S. Lutts, and P. Bertin. 2009. QTL mapping for biomass and physiological parameters linked to resistance mechanisms to ferrous iron toxicity in rice. *Euphytica* 167:143-160. doi:10.1007/s10681-008-9870-7
- Dufey, I, M.P. Hiel, P. Hakizimana, X. Draye, and S.K. Lutts. 2012a. Multi-environment QTL mapping and constency across environments of resistance mechanisms to ferrous iron toxicity in rice. *Crop Sci.* 52:539–50 doi:10.2135/cropsci2009.09.0544
- Edwards D, and P. Gupta. 2013. Sequence based DNA markers and genotyping for cereal genomics and breeding. pp: 57-79 In: *Cereal Genomics II*. Elsevier. Amsterdam.
- Emerson, D. and C. Moyer. 1997. Isolation and characterization of novel iron oxidizing bacteria that grow at circumneutral pH. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:4032–4038.
- Elec V, C.A. Quimio, R. Mendoza , A.G. Sajise, S.E.J. Beebout, G.B. Gregorio, and R.K. Singh. 2013. Maintaining elevated Fe2+ concentration in solution culture for the development of a rapid and repeatable screening technique for iron toxicity tolerance in rice (*Oryza sativa* L). *Plant and soil* 372(1): 253-264. doi: 10.1007/s11104-013-1739-4
- Engel, K., F. Asch, and M. Becker. 2012a. Classification of rice genotypes based on their mechanisms of adaptation to iron toxicity. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 175:548–552. doi: 10.1002/jpln.201100421
- Engel, K., F. Asch, and M. Becker. 2012b. In vivo staining of reduced iron by 2,22 bipyridine in rice exposed to iron toxicity. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 175:548-552. doi:10.1002/jpln.201200096
- Fageria, N.K., A.B. Santos, M.P.B. Filho, and C.M. Guimarães. 2008. Iron toxicity in lowland rice. *J. Plant Nutri.* 31(9):1676-1697 doi: 10.1080/01904160802244902
- Fleck, A.T., T. Nye, C. Repenning, F. Stah, M. Zahn, and M.K Schenk. 2011. Silicon enhances suberization and lignification in roots of rice (*Oryza sativa*). *J. Exp. Bot.* 62:2001–11. doi: 10.1093/jxb/erq392
- Flint-Garcia, S.A., A.C. Thuillet, J.M. Yu, G. Pressoir, S.M. Romero, S.E. Mitchell, J. Doebley, S. Kresovich, M.M. Goodman, and E.S. Buckler. 2005. Maize association population, a high-resolution platform for quantitative trait locus dissection. *Plant J.* 44:1054–1064. doi:10.1111/j.1365-313X.2005. 02591.x
- Ganal, M.W., T. Altmann, and M.S. Roder. 2009. SNP identification in crop plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12:211–217. doi: 10.1016/j.pbi.2008.12.009
- Gao, S., K.K. Tanji, S.C. Scardaci, and A.T. Chow. 2002. Comparison of redox indicators in a paddy soil during rice-growing rice-growing season. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 66:805–817. doi: 10.2136/sssaj2002.8050
- Guerta
- Gregorio, G.B., D. Senadhira, R.D. Mendoza, N.L. Manigbas, J.P., and Roxas, C.Q. 2002. Progress in breeding for salinity tolerance and associated abiotic stresses in rice. *Field Crop Res.* 76(23):91–101. doi: 10.1016/S0378-4290(02)00031-X
- Harahap, S.M., M. Ghulamahdi, S.A. Aziz, A. Sutandi, and Miftahudin. 2014. Relationship of ethylene production and aerenchym formation on oxidation ability and root surfaced-iron (Fe2+) accumulation under different iron concentrations and rice genotypes. *Int. J. Appl. Sci.* 4(1):186-194.
- Harrison, P.M. and P. Arosio. 1996. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochi. Biophys. Acta* 1275:161-203. doi: 10.1016/0005-2728(96)00022-9
- Huke, R.E. and E.H. Huke 1997. Rice area by type of culture: South, Southeast, and East Asia. A Revised and Updated Data Base. Manila (PH): International Rice Research Institute. 59p.
- Ishimaru, Y., M. Suzuki, T. Tsukamoto, K. Suzuki, M. Nakazono, T. Kobayashi, Y. Wada, S. Watanabe, S. Matsushashi, and M. Takahashi. 2006. Rice plants take up iron as an Fe3+ phytosiderophore and as Fe 2+. *Plant J.* 45:335–46. Doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02624.x
- Ismunadji, M. 1990. Alleviating iron toxicity in lowland rice. *Indonesian Agric. Res.. Develop. J.* 12(4):67-72.
- Jena, D., S.C. Nayak, A.K. Dash, B. Mohanty, and B. Jena. 2008. Effect of soil amendments on yield and iron content of rice in iron toxic soil. *Asian J. Soil Sci.* 3(2):264-268.
- Justin, S.H.F.W. and W. Armstrong. 1991. Evidence for the involvement of ethene in aerenchyma formation in adventitious roots of rice (*Oryza sativa* L.). *New Phytol.* 118:49–62. doi: 10.1111/j.1469-8137.1991.tb00564.x
- Kobayashi, T., and N.K. Nishizawa. 2012. Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63:131-152. doi: 0.1146/annurev-arplant-042811-105522

- Larissa MW, S.R. Whitt, M. Ibanez, T.R. Rocheford, M.M. Goodman, and E.S. Buckler. 2004. Dissection of maize kernel composition and starch production by candidate gene association. *Plant Cell*. 16: 2719–2733.
- Levitt, J. 1980. Responses of plants to environmental stresses. Volume I. Chilling, Freezing, and High Temperature Stresses. Academic Press. New York.
- Liu, H.J., J.L. Zhang., and F.S. Zhang. 2007 Role of iron plaque in Cd uptake by and translocation within rice (*Oryza sativa* L.) seedlings grown in solution culture. *Environ. Exp. Bot.* 59:314–320. doi: 10.1016/j.envexpbot.2006.04.001
- Majerus, V., P. Bertin, and S. Lutts. 2007a. Effects of iron toxicity on osmotic potential, osmolytes and polyamines concentrations in the African rice (*Oryza glaberrima* Steud.). *Plant Sci.* 173:96–105. doi:10.1016/j.plantsci.2007.04.003
- Majerus, V., P. Bertin, V. Swenden, A. Fortemps, S. Lobreaux, and S. Lutts. 2007b Organ-dependent responses of the African rice to short-term iron toxicity: ferritin regulation and antioxidative responses. *Biol. Planta* 51:303–331. doi: 10.1007/s10535-007-0060-6
- Marschner, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. San Diego (USA): Academic Pr.
- Masuda, H., Y. Ishimaru, M.S. Aung, T. Kobayashi, Y. Kakei, M. Takahashi, K. Higuchi, H. Nakanishi, and N.K. Nishizawa. 2012. Iron bio-fortification in rice by the introduction of multiple genes involved in iron nutrition. *Nature* 2:543. Doi: 10.1038/srep00543
- McCouch, S.R., K. Zhao, M. Wright, C.W. Tung, K. Ebana, M. Thomson, A. Reynolds, D. Wang, G. DeClerck, M.L. Ali, A. McClung, G. Eizenga, and C. Bustamante. 2010. Development of genomewide SNP assays for rice. *Breed. Sci.* 60:524–535. doi:10.1270/jsbbs.60.524
- Mendelson, I.A., B.A. Kleiss, and J.S. Wakeley. 1995. Factors controlling the formation of oxidized root channels. *Wetlands* 15(1):37–46. doi: 10.1007/BF03160678
- Muhrizal, S., T.J. Shamsuddin, I. Fauziah, and M.A.H. Husni. 2006. Changes in iron-poor acid sulfate soil upon submergence. *Geoderma* 131:110–122. doi:10.1016/j.geoderma.2005.03.006
- Nakano, T., K. Suzuki, T. Fujimura, and H. Shinshi. 2006 Genome-wide analysis of the ERF gene family in Arabidopsis and rice. *Plant Physiol.* 140:411–432. doi: 10.1104/pp.105.073783
- Negrão, S., M.C. Almadanim, I. Pires, I. Abreu, J. Maroco, B. Courtois, G. Gregorio, K.L. McNally, and M.M. Oliveira. 2013. New allelic variants found in key rice salt-tolerance genes: an association study. *Plant Biotech. J.* 11:87–100. doi: 10.1111/pbi.12010
- Nozoe, T., R. Agbisit, Y. Fukuta, R. Rodriguez, and S. Yanagihara. 2008. Characteristics of iron tolerant rice lines developed at IRRI under field conditions. *JARQ* 42(3):187–192.
- Nozoe, T., T. Shinano, M. Tachibana, and A. Uchino. 2010. Tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) and *echinocloa* weeds to growth suppression by rice straw added to paddy soil in relation to iron toxicity. *Plant Prod. Sci.* 13(3):314–318. doi: 10.1626/pp.13.314
- Nugraha, Y., Suwarno, I.A. Rumanti, Supartopo, N. Anggiani, dan M.L. Zarwazi. 2012. Laporan akhir RPTP: Perakitan Varietas Padi Rawa. Balai Besar Penelitian Tanaman Padi. pp 15 (Indonesian).
- Nugraha, Y., T.G.V. Vergara, D.J. Mackill, and A.B Ismail. 2013. Genetic parameters of some characters and their correlation with rice grain yield in relation to the plant adaptability to semi-deep stagnant flooding condition.
- Nugraha, Y., A.S. Wahyuning, M. Ghulamahdi, S. Suwarno, and H. Aswidinnoor. 2016a Nutrient culture media with agar is effective for early- and rapid- screening of iron toxicity tolerant in rice. *J. Crop Sci. Biotech.* 19(1):61–70. doi: 10.1007/s12892-015-0075-z
- Nugraha, Y., S. Wahyuning, M. Ghulamahdi, S. Suwarno, and H. Aswidinnoor. 2016b. Markers–traits association for iron toxicity tolerance in selected Indonesian rice varieties. *J. Biodiversitas* 17(2):753–763. doi:10.13057/biodiv/d170251
- Nugraha, Y., S. Wahyuning, M. Ghulamahdi, S. Suwarno, and H. Aswidinnoor. 2016c. Generation mean analysis of leaf bronzing associated with iron toxicity in rice seedlings using digital imaging methods. *SABRAO Journal of Breeding and Genetics* 48(4):453–464.
- Nugraha, Y., S. Wahyuning, M. Ghulamahdi, S. Suwarno, and H. Aswidinnoor. 2016d. Implication of gene action and heritability under stress and control conditions for selection iron toxicity tolerant in rice. *Agrivita* 38(3):282–295. doi: 10.17503/agrivita.v38i3.740.
- Nugraha, Y., I.A. Rumanti, A. Guswara, S. Wahyuning, M. Ghulamahdi, S. Suwarno, and H. Aswidinnoor. 2016. Response of selected rice varieties under excess iron condition. *Penelitian Pertanian Tanaman Pangan* 35(3):181–190.
- Onaga, G., J. Egdane, R. Edema, and I. Abdelbagi. 2013a. Morphological and genetic diversity analysis of rice accessions (*Oryza Sativa* L.) differing in iron toxicity tolerance. *J. Crop Sci. Biotech.* 16:53–62. doi:10.1007/s12892-012-0104-0
- Onaga, G., R. Edema, and G. Asea., 2013b. Tolerance of rice germplasm to iron toxicity stress and the relationship between tolerance, Fe²⁺, P and K content in the leaves and roots. *Arc. Agron. Soil Sci.* 59(2):213–229. doi:10.1080/03650340.2011.622751
- Pegoraro, C., D.R. da Farias, and L.M. Mertz. 2013. Ethylene response factors gene regulation and expression profiles under different stresses in rice. *Theor. Exp. Plant Physiol.* 25:261–274. doi: 10.1590/S2197-00252013000400004
- Peng, X.X. and M. Yamauchi. 1993 Ethylene production in rice bronzing leaves induced by ferrous iron. *Plant Soil* 149:227–234. doi:10.1007/BF00016613
- Pereira, EG., M.A. Oliva, L. Rosado-Souza, G.C. Mendes, D.S. Colares, C.H. Stopato, and A.M. Almeida. 2013. Iron excess affects rice photosynthesis through

- stomatal and non-stomatal limitations. *Plant Sci.* 201-202:81–92. doi: 10.1016/j.plantsci.2012.12.003
- Quinet, M., D. Vromman, A. Clippe, P. Bertin, H. Lequeux, I. Dufey, S. Lutts, and I. Lefèvre. 2012. Combined transcriptomic and physiological approaches reveal strong differences between short- and long-term response of rice (*Oryza sativa* L.) to iron toxicity. *Plant Cell Environ.* 1-10. doi: 10.1111/j.1365-3040.2012.02521.x.
- Ramirez, LM., N. Claassen., A.A. Ubiera, H. Werner, and A.M. Moawad. 2002. Effect of phosphorus, potassium and zinc fertilizers on iron toxicity in wetland rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Soil* 239:197–206. doi: 10.1023/a:1015099422778
- Ricachenevsky, F.K., R.A. Sperotto, P.K. Menguer, and J.P. Fett. 2010. Identification of Fe-excess-induced genes in rice shoots reveals a WRKY transcription factor responsive to Fe, drought and senescence. *Mol. Biol. Rep.* 37:3735–3745. doi: 10.1007/s11033-010-0027-0.
- Rumanti, I.A., Y. Nugraha, R.N. Wening, Z.J.C. Gonzaga, Suwarno. A. Nasution, D. Kusdiamana, and E.S. Septiningsih 2016. Development of high-yielding rice varieties suitable for swampy lands in Indonesia. *J. Crop Sci. and Plant Breeding* 4(4):413-425. doi:10.9787/PBB.2016.4.4.413
- Ruskandar, A., T. Rustiati, and P. Wardana. 2008. Adoption of new-improve rice varieties and its economic benefit in swampy tidal area. In: National Seminar in Rice Research. Sukamandi (ID): Balai Besar Penelitian Padi. (Indonesian).
- Sharma, P.K. and S.K. De Datta. 1986. Physical Properties and Processes of Puddled Rice Soils. In Stewart .B.A(Ed) *Advances in Soil Science*. Vol 5. Springer. pp : 139-178.
- Sahrawat, K.L., S. Diatta, and B.N. Singh. 2000. Reducing iron toxicity in lowland rice through an integrated use of tolerant genotypes and plant nutrient management. *Oryza* 37:44-47.
- Sahrawat, K.L.. 2004. Iron toxicity in wetland rice and the role of other nutrients. *J. Plant Nutr.* 27:1471–504. Doi:10.1081/PLN-200025869
- Septiningsih, E.M., N. Hidayatun, D.L. Sanchez, Y. Nugraha, C. Jerome, P. Alvaro, B.C.Y. Collard, A.M. Ismail, and D.J. Mackill. 2015. Accelerating the development of new submergence tolerant rice varieties: the case of Ciherang-Sub1 and PSB Rc18-Sub1. *Euphytica* 202(2):259-268. doi: 10.1007/s10681-014-1287-x
- Septiningsih, E.M., A.M. Pamplona, D. Sanchez, C.N. Neeraja, G.V. Vergara, S. Heuer, A.M. Ismail, and D.J. Mackill. 2009. Development of submergence-tolerant rice cultivars: The Sub1 locus and beyond. *Ann. Bot.* 103:151–60. doi: 10.1093/aob/mcn206
- Shimizu, A., C.Q. Guerta, G.B. Gregorio, and H. Ikehashi. 2005. Improved mass screening of tolerance to iron toxicity in rice by lowering temperature of culture solution. *J. Plant Nutr.* 28(9):1481-1493. doi:10.1080/01904160500201352
- Shimizu, A. 2009. QTL analysis of genetic tolerance to iron toxicity in rice (*Oryza sativa* L.) by quantification of bronzing score. *J. New Seeds* 10:171–179 doi:10.1080/15228860903064989
- Smolders, J.P. and J.G.M. Roelofs. 1996. The roles of internal iron hydroxide precipitation, sulphide toxicity and oxidizing ability in the survival of *Stratiotes aloides* roots at different iron concentrations in sediment pore water. *New Phytol.* 133:253–260. doi:10.1111/j.1469-8137.1996.tb01892.x
- Sousa, R.O. and C.A. de Oliveira. 2011. Root Responses to Major Abiotic Stresses in Flooded Soils. In: de Oliveira CA., Varshney RK (ed). *Root Genomics* 158-178. Springer-Verlag Berlin Heidelberg doi:10.1007/978-3-540-85546-0_7
- St-Cyr, L., D. Fortin, and P.G.C. Campbell. 1993. Microscopic observations of the iron plaque of a submerged aquatic plant (*Vallisneria spiralis* L.). *Aquat. Bot.* 46:155–167. doi:10.1016/0304-3770(93)90043-V
- Stein, J.R., S.I.G. Lopes, and J.P. Fett. 2014. Iron toxicity in field-cultivated rice: contrasting tolerance mechanisms in distinct cultivars. *Theor. Exp. Plant Physiol.* 26:135–146. Doi: 10.1007/s40626-014-0013-3
- Stein, R.J., F.K. Rachenevsky, and J.P. Fett. 2009. Differential regulation of the two rice ferritin genes (OsFER1 and OsFER2). *Plant Sci.* 177:563–9. doi 10.1016/j.plantsci.2009.08.001
- Suh, H.J., C.S. Kim, J.Y. Lee, and J. Jung. 2002. Photodynamic effect of iron excess on photosystem II function in pea plants. *Photochem. Photobiol.* 75:513–518. doi: 10.1562/0031-8655(2002)
- Suhaimi, S. 1992. Pewarisan toleransi keracunan Fe pada tanaman padi. Disertasi Program Pascasarjana, Universitas Pajajaran Bandung. (Tidak dipublikasi)
- Suhartini, T and M.A. Makarim. 2009. Selection technique for rice genotypes tolerant to iron toxicity. *J. Panelit. Pertan. Tanam. Pang.* 28:125–30.
- Suhartini, T., Suwarno, dan Safaruddin. 1996. Genetics parameters of iron toxicity tolerance in rice using diallel analysis. *Zuriat* 7(1):33-40 (Indonesian).
- Suhartini, T. 2004. Breeding rice variety tolerant to iron toxicity. *Bull Plasm Nutr.* 10 (1): 1-11 (Indonesian).
- Suhartini, T. 1999. Penelitian perbaikan toleransi padi sawah terhadap keracunan Fe. Laporan Penelitian Proyek PAATP, Balai Penelitian Padi, Badan Litbang Pertanian 1999/2000.
- Thomine, S. and G. Vert. 2013. Iron transport in plants: better be safe than sorry. *Curr Opin Plant Biol.* 6:1–6. doi:10.1016/j.pbi.2013.01.003
- Utami, D.W. and I.H. Somantri. 2014. Field evaluation and molecular identification of rice germplasms for Fe toxicity. *J. Agro Biogen* 10:9–17. (Indonesian).
- Velikova, V.B., I.T. Yordanov, K.M. Georgieva, T.D. Tsoney, and V. Goltsev 1998. Effects of exogenous polyamines

- applied separately and in combination with stimulated acid rain on functional activity of photosynthetic apparatus. *J. Plant Physiol.* 153:299–307. doi: 10.1016/S0176-1617(98)80155-7
- Wahyunto. 2009. Lahan sawah di Indonesia sebagai pendukung ketahanan pangan nasional. *Inform. Pertan.* 18(2):133-152.
- Wan, J.L., H.Q. Zhai, J.M. Wan, H. Yasui, and A. Yoshimura. 2003a. Mapping QTL for traits associated with resistance to ferrous iron toxicity in rice (*Oryza sativa* L.), using japonica chromosome segment substitution lines. *Yi Chuan Xue Bao* 30: 893–8.
- Wan, J.J., H. Zhai, J.J. Wan, and H. Ikehashi. 2003b. Detection and analysis of QTLs for ferrous iron toxicity tolerance in rice, *Oryza sativa* L. *Euphytica* 131:201–6. Doi:10.1023/A:1023915710103 :
- Wang, G.F., W.Q. Li, W.Y. Li, G.L. Wu, C.Y. Zhou, and K.M.C. Wang. 2013. Characterization of rice nadph oxidase genes and their expression under various environmental conditions. *Int. J. Mol. Sci.* 14:9440-9458. doi:10.3390/ijms14059440
- Wang, Y., M. Frei, and M. Wissuwa 2008. An agar nutrient solution technique as a screening tool for tolerance to zinc deficiency and iron toxicity in rice. *Soil Sci. Plant Nutr.* 54: 744-750. doi: 10.1111/j.1747-0765.2008.00302. x
- Winterbourn, C.C. 1995. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol. Lett.* 83:969–974. doi: 10.1016/0378-4274(95)03532-X
- Wu, L., M.Y. Shhadi, G. Gregorio, E. Matthus, M. Becker, and M. Frei. 2014. Genetic and physiological analysis of tolerance to acute iron toxicity in rice. *Rice* 7(8):1–12. 10.1186/s12284-014-0008-3
- Wu, P., A. Luo, J. Zhu, J. Yang, N. Huang, and D. Senadhira. 1997. Molecular markers linked to genes underlying seedling tolerance for ferrous iron toxicity. *Plant Soil* 196(2):317–320.
- Wu, P., B. Hu, C.Y. Liao, J.M. Zhu, Y.R. Wu, D. Senadhira, and A.H. Paterson. 1998. Characterization of tissue tolerance to iron by molecular markers in different lines of rice. *Plant Soil* 203:217–226. Doi: 10.1023/A:1004321218387
- Yadavalli, V., S. Neelam, A.S.V.C. Rao, A.R. Reddy, and R. Subramanyam. 2012. Differential degradation of photosystem I subunits under iron deficiency in rice. *J. Plant Physiol.* 169:753–759. doi: 10.1016/j.jplph.2012.02.008
- Yang, C., L. Yang, Y. Yang, and Z. Ouyang. 2004. Rice root growth and nutrient uptake as influenced by organic manure in continuously and alternately flooded paddy soils. *Agri. Water Manag.* 70:67–81. doi:10.1016/j.agwat.2004.05.003
- Yualianida. 2014. Rice (*Oryza sativa* L.) genotypes tolerance to flash flooding and stagnant flooding stress. MS Thesis. Bogor Agricultural University.
- Zhang, X., F. Zhang, and D. Mao. 1999. Effect of iron plaque outside roots on nutrient uptake by rice (*Oryza sativa* L.): phosphorus uptake. *Plant Soil* 209(2):187–192. doi: 10.1023/A:1004505431879