

Eksplorasi Locus *Pup1* pada 55 Genotipe Padi Berdasarkan Analisis Marka Molekuler dan Sekuensing

(Exploration of the *Pup1* Locus on 55 Rice Genotypes Based on Molecular Marker and Sequencing Analysis)

Tasliah*, Ma'sumah, dan Joko Prasetyono

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111 Indonesia
Telp. (0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820; *E-mail: tasliah1@yahoo.co.id

Diajukan: 22 Agustus 2016; Direvisi: 4 Oktober 2016; Diterima: 25 November 2016

ABSTRACT

Phosphorus (P) is an essential nutrient for rice growth. The scarcity of rock phosphate, the main source of P fertilizer, has prompted breeders to seek rice genotypes tolerant to P deficiency by exploring *Pup1* locus, which plays a role in the P uptake, among the rice genotypes. This study was aimed at exploring *Pup1* locus among 55 rice genotypes to identify genotypes possessing Kasalath alleles at four specific markers of genes in the *Pup1* locus and high similarity of nucleotide sequence of the markers compared to *Pup1* locus reference sequence. Amplification of genomic DNA of three check genotypes, i.e. Kasalath, NIL-C443, and Nipponbare; 36 upland, 15 lowland, and 1 amphibian rice, with K05–1, K20–2 + *Bsp12861*, K29–1, and K46–2 markers, showed that the number of upland rice containing *Pup1* locus was comparable to lowland rice (49% and 47.3%, respectively). Three genotypes, i.e. Gajah Mungkur, Cabacu, and IR36, contained Kasalath alleles on the four markers, indicating that they have *Pup1* locus. Kasalath, NIL-C443, Gajah Mungkur, Cabacu, and IR36 had varying levels of nucleotide sequence similarity based on K20–2 + *Bsp12681* and K46–2 marker regions, ranged from 54.7–95.2% and 94.6–97.5%, respectively, compared to the *Pup1* reference sequence. Based on Kasalath allelic patterns and high nucleotide sequence similarity to the *Pup1* reference sequence (87.3–92.4% and 94.6–96%, respectively), Gajah Mungkur, Cabacu, and IR35 were identified as new sources of *Pup1* locus to replace Kasalath.

Keywords: Rice, P deficiency, *Pup1*, germplasm, sequence analysis.

ABSTRAK

Fosfor (P) merupakan unsur penting pada padi yang ketersediaannya di bumi semakin berkurang. Eksplorasi lokus yang berperan dalam penangkapan P (*Pup1*) pada plasma nutfah padi bermanfaat untuk mendapatkan calon tetua yang toleran terhadap defisiensi P. Penelitian ini bertujuan mengeksplorasi lokus *Pup1* pada 55 genotipe padi guna mendapatkan genotipe yang memiliki alel Kasalath dari empat marka spesifik gen-gen di dalam lokus *Pup1* dan memiliki kesamaan sekuen yang tinggi dengan sekuen rujukan lokus *Pup1*. Hasil amplifikasi DNA genomik dari tiga genotipe padi cek, yaitu Kasalath, NIL-C443, dan Nipponbare; 36 padi gogo, 15 padi sawah, dan 1 padi amfibi, menggunakan empat marka spesifik yang berada di dalam lokus *Pup1*, yaitu K05–1, K20–2 + *Bsp12861*, K29–1, dan K46–2, menunjukkan bahwa persentase padi gogo yang memiliki lokus *Pup1* hampir sama dengan padi sawah, berturut-turut 49% dan 47,3%. Tiga genotipe, yaitu Gajah Mungkur, Cabacu, dan IR36, memiliki alel Kasalath pada keempat marka yang menunjukkan bahwa genotipe tersebut memiliki lokus *Pup1*. Kasalath, NIL-C443, Gajah Mungkur, Cabacu, dan IR36 memiliki kesamaan sekuen basa yang bervariasi pada daerah marka K20–2 + *Bsp12681* dan K46–2, berturut-turut 54,7–95,2% dan 94,6–97,5%, dibanding dengan sekuen rujukan *Pup1*. Gajah Mungkur, Cabacu, dan IR36 pada daerah tersebut memiliki kesamaan sekuen basa yang tinggi dibanding dengan sekuen rujukan *Pup1* (berturut-turut 87,3–92,4% dan 94,6–96%) sehingga ketiga genotipe memiliki potensi sebagai sumber lokus *Pup1* yang baru menggantikan Kasalath.

Kata kunci: Padi, defisiensi P, *Pup1*, plasma nutfah, analisis sekuen.

PENDAHULUAN

Fosfor (P) merupakan salah satu unsur penting yang dibutuhkan padi untuk pertumbuhan pada fase vegetatif dan generatif. Kekurangan unsur P pada padi menyebabkan daun menyempit (mengecil), tanaman memendek, dan bobot tajuk berkurang (Prasetyono *et al.*, 2012). Gejala pada fase vegetatif awal dapat menjadi acuan dalam strategi pemupukan untuk mengurangi kerusakan akibat kekurangan P tersebut (Chen *et al.*, 2014). Kekurangan pasokan P pada fase generatif akan menyebabkan pembentukan gabah tidak sempurna, sehingga banyak gabah menjadi hampa dan mengakibatkan terjadinya penurunan hasil (Rose *et al.*, 2013).

Sampai saat ini, pupuk P hanya dapat dibuat dari batuan alam (*rock phosphate*). Batuan alam tersebut dapat langsung digunakan sehingga bersifat *slow release* atau diperlakukan terlebih dahulu dengan asam kuat (asam sulfat atau asam fosfat) agar kadar P tersedia (P_2O_5) menjadi lebih tinggi. Cadangan batuan alam dunia makin menipis akibat eksplorasi masif sehingga menyebabkan harga pupuk P semakin mahal. Batuan fosfat ini diprediksi akan habis dalam 50–100 tahun mendatang (Cordell *et al.*, 2009).

Genotipe padi yang memiliki kemampuan hidup pada tanah dengan kadar P yang rendah sangat membantu petani dalam mengurangi ketergantungan terhadap pupuk P (Ismail *et al.*, 2007). Tanaman padi dengan rambut akar yang banyak dan panjang, serta cabang perakaran yang banyak sangat bermanfaat untuk menyerap P lebih banyak (Vinod dan Heuer, 2012). Seleksi padi yang toleran defisiensi P telah banyak dilakukan, baik menggunakan larutan hara maupun tanah (Aluwihare *et al.*, 2016; Prasetyono *et al.*, 2012). Namun, seleksi plasma nutfah dalam jumlah ribuan di rumah kaca atau di lapang biasanya memerlukan lahan yang luas (Hadianto *et al.*, 2015; Silitonga dan Risliawati, 2013). Cara praktis dan efisien dalam menyeleksi genotipe padi yang toleran defisiensi P akan sangat membantu dalam kegiatan ini.

Wissuwa *et al.* (1998) telah menyeleksi genotipe-genotipe yang toleran defisiensi P dan memetakan lokus yang terlibat di dalam penangkapan P (selanjutnya disebut sebagai lokus *Pup1*). Hasil eksplorasi marka-marka ini dapat membantu, memudahkan seleksi genotipe padi untuk sifat tersebut. Kasalath, sebagai sumber lokus *Pup1*, dipelajari secara mendalam sehingga ditemukan salah satu gen yang bertanggung jawab dalam penangkapan P

(disebut sebagai gen *Phosphorus-starvation tolerance* [*Pstol1*]) (Gamuyao *et al.*, 2012; Heuer *et al.*, 2009).

Identifikasi gen-gen yang mirip dengan gen di dalam lokus *Pup1* telah dilakukan sejak marka-marka yang berkaitan dengan *Pup1* dibuat berdasarkan perbandingan sekuen daerah lokus *Pup1* antara padi lokal Kasalath dan Nipponbare (Chin *et al.*, 2010, 2011; Heuer *et al.*, 2009). Tercatat sebanyak 37 marka merujuk pada gen-gen yang terdapat di dalam lokus *Pup1* (Prasetyono dan Tasliyah, 2012). Eksplorasi lokus *Pup1* pada plasma nutfah padi menggunakan marka-marka spesifik *Pup1* telah dilakukan untuk mengidentifikasi tetua yang memiliki lokus tersebut (Kottearachchi dan Wijesekara, 2013; Pariasca-Tanaka *et al.*, 2014; Sarkar *et al.*, 2011; Tyagi *et al.*, 2012).

Walaupun Kasalath diketahui memiliki lokus *Pup1*, padi lokal ini memiliki beberapa kelemahan, seperti sangat sensitif terhadap keracunan Al dan memiliki penampilan yang tinggi (Prasetyono *et al.*, 2012). Pada kegiatan persilangan menggunakan Kasalath sebagai tetua donor, diperlukan proses silang balik yang panjang untuk menghilangkan efek-efek negatif tersebut. Oleh karena itu, diperlukan upaya mengeksplorasi lokus *Pup1* pada genotipe-genotipe lain dengan harapan lokus tersebut akan ditemukan pada genotipe lain yang memiliki karakter agronomis yang bagus.

Penelitian ini bertujuan mengeksplorasi lokus *Pup1* pada 55 genotipe padi guna mendapatkan genotipe yang memiliki alel Kasalath dari empat marka spesifik gen-gen di dalam lokus *Pup1* dan memiliki kesamaan sekuen yang tinggi dengan sekuen rujukan lokus *Pup1*.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Bogor mulai bulan Januari sampai Desember 2015.

Materi Penelitian

Materi penelitian yang digunakan adalah varietas padi yang dipilih secara acak, terdiri atas varietas unggul dan varietas padi lokal, yaitu 36 padi gogo, 15 padi sawah, dan 1 padi amfibi, serta 3 genotipe cek, yaitu Kasalath, NIL-C443, dan Nipponbare (Tabel 1). Marka yang digunakan adalah empat marka dalam lokus *Pup1* (Tabel 2).

Tabel 1. Materi genetik yang digunakan dalam penelitian ini.

No.*	Varietas/galur	Asal aksesori/tahun dilepas	Tipe (habitat)	No.*	Varietas/galur	Asal aksesori/tahun dilepas	Tipe (habitat)
1.	Kasalath	Padi lokal India	Padi gogo, cek (+) <i>Pup1</i>	29.	Situ Patenggang	2002	Padi gogo
2.	Nil-C443	NIL-(Kasalath x Nipponbare)	Padi gogo/sawah, cek (+) <i>Pup1</i>	30.	Tondano	1983	Padi gogo
3.	Nipponbare	Padi dari Jepang	Padi sawah, cek (-) <i>Pup1</i>	31.	Towuti	1999	Padi gogo
4.	Dodokan	1987	Padi gogo	32.	Way Rarem	1994	Padi gogo
5.	Arias-A	1984	Padi gogo	33.	Inpago 4	2010	Padi gogo
6.	Arias-B	1984	Padi gogo	34.	Inpago 5	2010	Padi gogo
7.	Batur	1988	Padi gogo	35.	Inpago 9	2012	Padi gogo
8.	C-22	1989 (introduksi)	Padi gogo	36.	Hawara Bunar	Padi lokal	Padi gogo
9.	Cabacu	Padi dari Brasil	Padi gogo	37.	ITA131	Padi lokal	Padi gogo
10.	Danau Bawah	1987	Padi gogo	38.	IRAT112	Padi dari Pantai Gading	Padi gogo
11.	Danau Gaung	2001	Padi gogo	39.	Angke	2001	Padi sawah
12.	Danau Tempe	1991	Padi gogo	40.	Ciherang	2000	Padi sawah
13.	Gajah Mungkur	1994 (introduksi)	Padi gogo	41.	Code	2001	Padi sawah
14.	Gata	1976	Padi gogo	42.	Inpari13	2009	Padi sawah
15.	Inpago 6	2009	Padi gogo	43.	IR36	1977	Padi sawah
16.	Inpago 7	2011	Padi gogo	44.	IR64	1986	Padi sawah
17.	Inpago 8	2011	Padi gogo	45.	Jangkak	1987	Padi sawah
18.	Jati Luhur	1994	Padi gogo	46.	Mentik Wangi	Padi lokal	Padi sawah
19.	Kalimutu	1994 (introduksi)	Padi gogo	47.	Adan Hitam	Padi lokal	Padi sawah
20.	Kartuna	1963	Padi gogo	48.	Adan Kelabit	Padi lokal	Padi sawah
21.	Kencana Bali	Padi lokal	Padi gogo	49.	Adan Merah	Padi lokal	Padi sawah
22.	Laut Tawar	1989	Padi gogo	50.	Pandan Wangi	Padi lokal	Padi sawah
23.	Maninjau	1985	Padi gogo	51.	Rojolele	Padi lokal	Padi sawah
24.	Poso	1989	Padi gogo	52.	Silugonggo	2001	Padi sawah
25.	Ranau	1984	Padi gogo	53.	IR24	Padi IRR	Padi sawah
26.	Sentani	1983	Padi gogo	54.	Mahsuri	Padi lokal	Padi sawah
27.	Seratus Malam	1960	Padi gogo	55.	Situ Bagendit	2003	Padi gogo, bisa di sawah (amfibi)
28.	Singkarak	1983	Padi gogo				

*Nomor 1–3 dikutip dari Wissuwa *et al.* (1998), nomor 9 dikutip dari Suardi (2000), 10–55 dikutip dari Romdon *et al.* (2014).

Tabel 2. Empat marka spesifik lokus *Pup1* (Chin *et al.*, 2011).

Marka	Gen	Protein yang dihasilkan	Tipe marka	Lokasi secara fisik (bp)		Ukuran pita (bp) K/N*	Sekuen marka (5'–3')	Sistem deteksi
				Kasalath AB458444.1	Nipponbare Krom 12			
K05–1	<i>OsPupK05–1</i> (<i>alpha-DOX2</i>)	<i>Hypothetical protein</i>	Kodominan	116430–116701	15336063–15336342	272/280	F : ATTCAGACATCGACGGCGAC R : TCCTCGTAACATGGCTTGC	Poliakrilamida 5% (<i>denaturing</i>)
K20–2	<i>OsPupK20–2</i>	<i>Dirigent protein</i>	Kodominan	169290–170607	15409652–15410981	982 /995	F : TCAAAATTTCTTCAGGTATGTACTCC R : TTGGGTGATCAGCTTTTCAGA	Agarosa 2%
K20–2 + enzim <i>Bsp12681</i> **		<i>Dirigent protein</i>	CAPS (<i>Bsp12681</i>)			K: 231+349+402 N: 413+582		
K29–1	<i>OsPupK2–9</i>	<i>Hypothetical protein</i>	Kodominan	205067–205287	15431572–15431786	212/206	F : TGGCCAACGGGGTAGAG R : GTCCAGGTAACACGAGGAA	Poliakrilamida 5% (<i>denaturing</i>)
K46–2	<i>OsPupK46–2</i> (<i>Pstol1</i>)	<i>Ser/Thr protein kinase</i>	Dominan	276371–276597	Kosong	227/–	F : AGGAAGATGGTTGTCGTTGG R : TTCACACCAACAGTGTGTC	Agarosa 2%

*K/N = Kasalath/Nipponbare.

**Marka *cleaved amplified polymorphic sequence* (CAPS).

Analisis Molekuler

DNA genomik diisolasi menggunakan metode Dellaporta *et al.* (1983). Daun segar bibit padi berumur 2 minggu digerus dalam nitrogen cair di dalam tabung mikro berukuran 2 ml dengan sumpit. Serbuk daun ditambah larutan bufer ekstraksi yang mengandung Na-disulfid (0,8% w/v) kemudian dipanaskan selama 15 menit dalam penangas air pada suhu 65°C. Tabung mikro dibolak-balik setiap 5 menit, kemudian ditambah dengan kloroform : isoamilalkohol (chisam; 24 : 1) sebanyak 500 μ l, lalu digoyang perlahan selama 10–15 menit dengan tangan atau mesin pengoyang. Tabung disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 15 menit, kemudian supernatan yang diperoleh dipindahkan ke dalam tabung mikro 2 ml yang baru dan ditambah dengan alkohol absolut (96%) atau isopropanol sampai mencapai volume 2 ml. Endapan

DNA dilarutkan dalam bufer TE 1× sebanyak 100–200 μ l sesuai dengan besar kecilnya endapan.

Reaksi PCR dilakukan dalam volume 20 μ l yang mengandung bufer PCR 1× (Tris-HCl 10 mM [pH 8,3]; KCl 50 mM; MgCl₂ 1,5 mM; gelatin 0,01%), dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 100 μ M, marka (F dan R) 0,5 μ M, larutan DNA yang diencerkan 1 : 10, dan 1 unit Taq DNA polimerase. Program PCR yang digunakan adalah 5 menit pada suhu 94°C untuk denaturasi permulaan yang dilanjutkan dengan 35 siklus yang terdiri atas: 60 detik pada suhu 94°C untuk denaturasi, 60 detik pada suhu 55°C untuk penempelan basa, dan 2 menit pada suhu 72°C untuk perpanjangan marka, dan diakhiri dengan perpanjangan basa selama 7 menit pada suhu 72°C. Hasil PCR kemudian dipisahkan pada gel agarosa 2% atau gel poliakrilamida (*denaturing*) 5%. Pita-pita pada gel

agarosa divisualisasikan dengan merendam gel ke dalam etidium bromida, kemudian didokumentasi pada Gel Doc™ (Bio-Rad, USA), sedangkan pita DNA pada gel poliakrilamida divisualisasikan dengan proses pewarnaan menggunakan perak nitrat.

Pita-pita yang muncul diskor menggunakan standar pita Kasalath (K) dan Nipponbare (N). Khusus amplikon marka K20–2, sebanyak 10–15 µl dipotong dengan 1 unit enzim *Bsp12861* dalam 1 µl bufer enzim 10× dan 3,9 µl ddH_2O steril pada suhu inkubasi 37°C selama 1 jam.

Analisis sekuen dilakukan terhadap amplikon dua marka (K20–2 + *Bsp12861* dan K46–2) pada lima genotipe yang memiliki alel Kasalath pada keempat marka, yaitu Kasalath, NIL-C443, Cabacu, Gajah Mungkur, dan IR36. Untuk marka K20–2 + *Bsp12861* sekuensing dilakukan pada pita DNA yang berukuran 349 bp, sedangkan untuk marka K46–2 dilakukan pada pita DNA yang berukuran 227 bp. Sekuensing satu arah menggunakan marka *forward* dilakukan oleh First Base. Pemilihan dua marka untuk sekuensing ini berdasarkan kemudahan teknis dalam pengambilan pita di gel.

Analisis Data

Data sekuen kedua marka (K20–2 + *Bsp12861* dan K46–2) dianalisis dengan perangkat lunak *Sequence Builder* dan *Meg Alignment* yang terintegrasi di dalam perangkat lunak *DNAStar Lasergene 11 Core Suite*. Sekuen DNA dimasukkan ke dalam program *Sequence Builder*, kemudian dibandingkan dengan sekuen rujukan lokus *Pup1* pada basis data NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB458444.1>). Seluruh sekuen diolah dengan program *SeqManPro* yang ada pada program *DNAStar Lasergene 11 Core Suite*. Persentase kesamaan sekuen lima genotipe dan sekuen rujukan dianalisis dengan program *Meg Alignment* pada Clustal W, dan divisualisasi dalam bentuk dendrogram.

HASIL DAN PEMBAHASAN

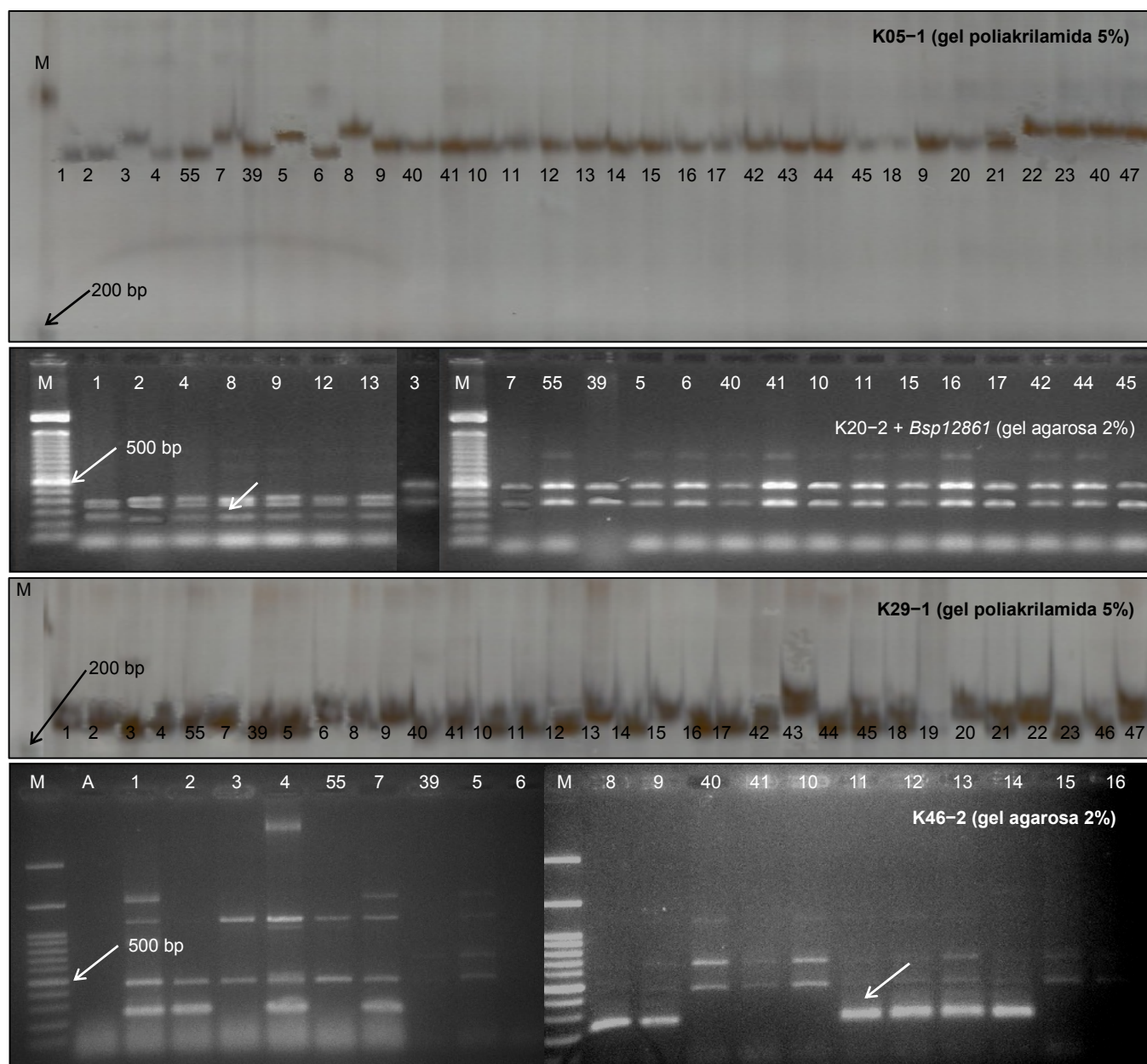
Marka Spesifik Lokus *Pup1*

Hasil amplifikasi empat marka spesifik lokus *Pup1* pada 55 genotipe padi disajikan pada Gambar 1 dan Tabel 3. Gen-gen yang terlibat dalam penangkapan P dapat ditemukan, baik pada kelompok padi gogo maupun padi sawah. Hasil rata-rata dari empat marka menunjukkan bahwa padi gogo dan padi sawah yang mengandung lokus *Pup1* berturut-turut sebanyak 49% dan 47,3%. Hal ini berarti dari 55 genotipe padi yang dieksplorasi, peluang untuk mem-

peroleh lokus *Pup1* pada padi gogo dan padi sawah hampir sama. Hasil serupa juga diperoleh oleh Tyagi *et al.* (2012) yang menggunakan enam marka spesifik lokus *Pup1* untuk mengevaluasi enam puluh genotipe padi India yang berasal dari berbagai tempat. Akan tetapi, dengan menggunakan 10 marka untuk mengeksplorasi lokus *Pup1* pada 159 genotipe padi, Chin *et al.* (2010) menemukan bahwa persentase padi toleran kekeringan (merujuk pada padi gogo) yang mengandung lokus *Pup1* jauh lebih tinggi (50%) daripada padi sawah (10%).

Penggunaan lebih banyak marka dapat meningkatkan peluang tereksplorasinya alel-alel pada lokus *Pup1*. Marka-marka yang pernah digunakan untuk mengeksplorasi lokus *Pup1* pada plasma nutfah padi adalah K01–1, K04–1, K05–1, K20–2, K29–2, K41–1, K42–1, K43–1, K45–1, K46–2, K48–1, K52–1, K53–1, K59–1, K67–1, dan Ba76H4_7154. Semenjak diketahui bahwa gen *Pstol1* memiliki peran yang sangat penting di dalam lokus *Pup1*, eksplorasi lokus *Pup1* pada genotipe-genotipe padi ada yang difokuskan hanya pada daerah *Pstol1* saja (Aluwihare *et al.*, 2015), bahkan Pariaska-Tanaka *et al.* (2014) membuat enam marka lagi berdasarkan sekuen di dalam daerah *Pstol1* tersebut. Marka-marka lain di luar K46–2 juga masih diidentifikasi peran dan hubungannya dengan gen ini (Wissuwa, 2015, komunikasi pribadi) sehingga nantinya akan diperoleh informasi marka-marka yang harus digunakan untuk mendeteksi gen-gen penting di dalam lokus *Pup1*. Semakin banyak alel Kasalath terkandung dalam satu genotipe, semakin lengkap lokus *Pup1* yang dimiliki genotipe tersebut. Sampai saat ini, tidak ada jumlah baku yang harus digunakan untuk eksplorasi plasma nutfah padi, namun marka K46–2 menjadi wajib untuk digunakan.

Berdasarkan penelitian ini, genotipe yang digunakan tidak selalu memiliki semua alel Kasalath pada semua marka (Tabel 3). Genotipe Arias-A dan Maninjau tidak memiliki alel Kasalath pada semua marka yang dipakai. Gen *Pstol1* (K46–2) terdapat pada kelompok padi gogo, yaitu Dodokan, Batur, C-22, Cabacu, Danau Gaung, Danau Tempe, Gajah Mungkur, Gata, Inpago 8, Jati Luhur, Kalimutu, Kencana Bali, Poso, Singkarak, Inpago 9, Hawara Bunar, dan ITA131, dan kelompok padi sawah, yaitu IR36, Mentik Wangi, Adan Hitam, Adan Merah, Pandan Wangi, Rojolele, dan Silugonggo. Genotipe-genotipe yang memiliki gen *Pstol1* ini mestinya memiliki kemampuan membentuk perakaran yang lebih banyak dalam kondisi kurang P dibanding dengan yang tidak memiliki gen tersebut. Untuk itu, diperlukan kajian yang lebih mendalam.



Gambar 1. Contoh hasil amplifikasi beberapa genotipe padi menggunakan empat marka spesifik lokus *Pup1*. Nomor yang tertera di atas pita DNA merujuk pada nama genotipe di Tabel 1. A = dH_2O . Tanda panah menunjukkan pita yang diambil untuk sekuensing (349 bp untuk marka K05-1 dan 227 bp untuk marka K46-2).

Berdasarkan data pada Tabel 3, terdapat tiga genotipe yang memiliki alel pada keempat marka, yakni Cabacu, Gajah Mungkur, dan IR36. Cabacu dan Gajah Mungkur adalah padi gogo, sedangkan IR36 adalah padi sawah. Ketiga genotipe ini, beserta Kasalath dan NIL-C443, dianalisis sekuen nukleotidanya pada marka K20-2 + *Bsp12861* dan K46-2.

Analisis Sekuen

Hasil sekuensing lima genotipe terpilih yang dilakukan pada marka K20-2 + *Bsp12861* dan K46-2 menunjukkan posisi 169.303–169.709 bp (pada sekuen rujukan 169.419–170.607 bp) untuk marka K20-2 + *Bsp12861*, dan 276.392–276.600 bp (pada sekuen rujukan 275.525–276.499 bp) untuk marka K46-2 (Gambar 2).

Hasil sekuensing menggunakan marka K20-2 + *Bsp12861* menunjukkan posisi di depan (sebelum)

Tabel 3. Tipe alel yang dihasilkan dari amplifikasi empat marka spesifik lokus *Pup1* yang diamplifikasi PCR pada 55 genotipe padi.

Varietas/galur	Marka lokus <i>Pup1</i>				Varietas/galur	Marka lokus <i>Pup1</i>			
	K05-1	K20-2 + Bsp	K29-1	K46-2		K05-1	K20-2+Bsp	K29-1	K46-2
Kasalath	K	K	K	K	Situ Patenggang	K	N	K	N
Nii-C443	K	K	K	K	Tondano	K	N	K	N
Nipponbare	N	N	N	N	Towuti	K	N	N	K
					Way Rarem	K	N	N	N
Dodokan	K	N	K	K	Inpago 4	K	N	N	K
Arias-A	N	N	N	N	Inpago 5	K	N	N	N
Arias-B	K	N	K	-	Inpago 9	K	N	N	K
Batur	N	N	N	K	Hawara Bunar	K	N	N	K
C-22	N	K	K	K	ITA131	K	K	N	K
Cabacu	K	K	K	K	IRAT112	K	N	N	N
Danau Bawah	K	N	N	N	Angke	K	N	N	N
Danau Gaung	K	N	N	K	Ciherang	K	N	N	N
Danau Tempe	K	K	N	K	Code	K	N	N	N
Gajah Mungkur	K	K	K	K	Inpari13	K	N	N	N
Gata	K	K	N	K	IR36	K	K	K	K
Inpago 6	K	N	K	N	IR64	K	N	N	N
Inpago 7	K	N	N	N	Jangkok	K	N	N	-
Inpago 8	K	N	N	K	Mentik Wangi	N	N	N	K
JatiLuhur	K	N	N	K	Adan Hitam	N	K	K	K
Kalimutu	K	N	N	K	Adan Kelabit	N	K	K	-
Kartuna	K	N	K	N	Adan Merah	N	K	K	K
Kencana Bali	K	K	N	K	Pandan Wangi	N	K	K	K
Laut Tawar	N	N	K	N	Rojolele	K	N	N	K
Maninjau	N	N	N	N	Silugonggo	K	K	N	K
Poso	K	K	N	K	IR24	K	N	K	N
Ranau	K	N	N	N	Mahsuri	K	N	N	N
Sentani	K	N	N	N	Situ Bagendit	K	N	K	N
Seratus Malam	K	N	N	N					
Singkarak	K	N	N	K		K05-1	K20-2+Bsp	K29-1	K46-2
Jumlah genotipe padi gogo yang memiliki alel Kasalath (rata-rata 49%)						30 (83%)	8 (22%)	10 (38%)	19 (53%)
Jumlah genotipe padi sawah yang memiliki alel Kasalath (rata-rata 47,3%)						11 (69%)	6 (38%)	6 (38%)	7 (44%)
Total genotipe padi yang memiliki alel Kasalath						41 (80%)	14 (28%)	16 (31%)	26 (51%)

K = alel Kasalath, N = alel Nipponbare, - = tidak terdeteksi. Jumlah total genotipe (selain 3 genotipe cek dan 1 padi amfibi) = 51, jumlah padi gogo = 36, jumlah padi sawah = 15. Persentase dihitung dengan membandingkan dengan jumlah masing-masing kelompok padi gogo, padi sawah, atau total.

gen *OsPupK20-2* sampai sekuen awal gen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AB458-444.1>). Marka K20-2 yang identik dengan gen protein dirigen (*dirigent protein*) (Heuer *et al.*, 2009) merujuk pada sekuen sepanjang 1.188 bp dan mengenali sekuen 116 bp sebelum awal gen dan 288 bp setelah awal gen. Genotipe Cabacu, Gajah Mungkur, dan IR36 memiliki kesamaan sekuen pada daerah tersebut, sedangkan NIL-C443 yang merupakan turunan Nipponbare yang mengandung lokus *Pup1* tidak memiliki kesamaan yang tinggi dengan sekuen rujukan (Gambar 2). NIL-C443 mengelompok tersendiri pada dendrogram dengan tingkat kesamaan dengan sekuen rujukan sebesar 54,7% (Gambar 3, Tabel 4). NIL-C443 yang dirakit dengan menyilangkan Nipponbare dengan Kasalath ternyata memiliki penyimpangan yang besar dari Kasalath pada lokus *Pup1*.

NIL-C443 dihasilkan dari seleksi berbantuan dua marka RFLP (C443 dan G1240) yang berjarak 13,2 cM

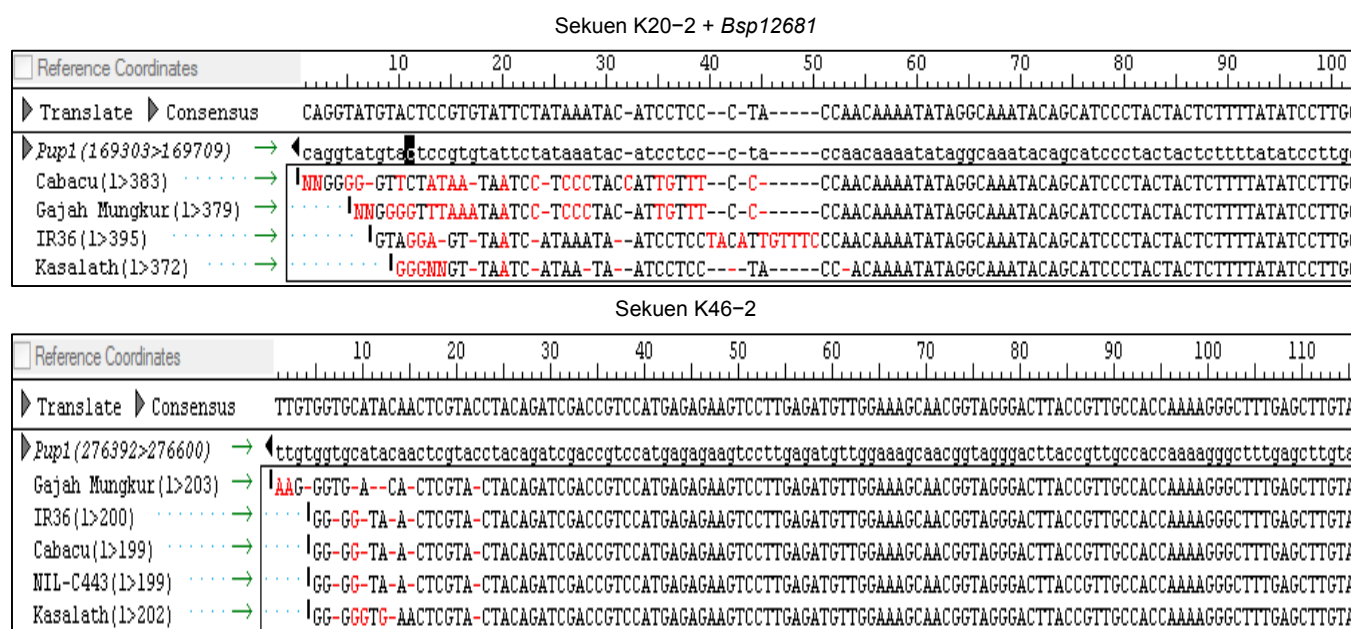
atau 3.305.000 bp (Wissuwa *et al.*, 2002). Jarak antara dua marka yang masih jauh tersebut memungkinkan terjadinya rekombinasi sehingga NIL-C443 dapat memiliki penyimpangan kesamaan sekuen nukleotida dari Nipponbare. Sementara itu, daerah lokus *Pup1* rujukan hanya sepanjang 452.002 bp ($\approx$ 1,8 cM) dan marka-marka yang didesain spesifik merujuk di dalam daerah lokus *Pup1* dan alel yang terdeteksi hanya alel Kasalath.

Kasalath yang merupakan genotipe asal lokus *Pup1* ternyata masih memiliki penyimpangan basa yang tergolong rendah (4,8%) untuk daerah *OsPupK20-2* dibanding dengan sekuen *Pup1* rujukan. Genotipe Cabacu, Gajah Mungkur, dan IR36 memiliki kesamaan dengan sekuen rujukan berturut-turut sebesar 92,4%, 93,1%, dan 87,3% dengan penyimpangan 1–4 basa. Gen dirigen ini terletak jauh dibanding dengan gen *Pstol* (berbeda 104.918 bp sebelum gen *Pstol*), namun peranannya dalam membentuk lignin

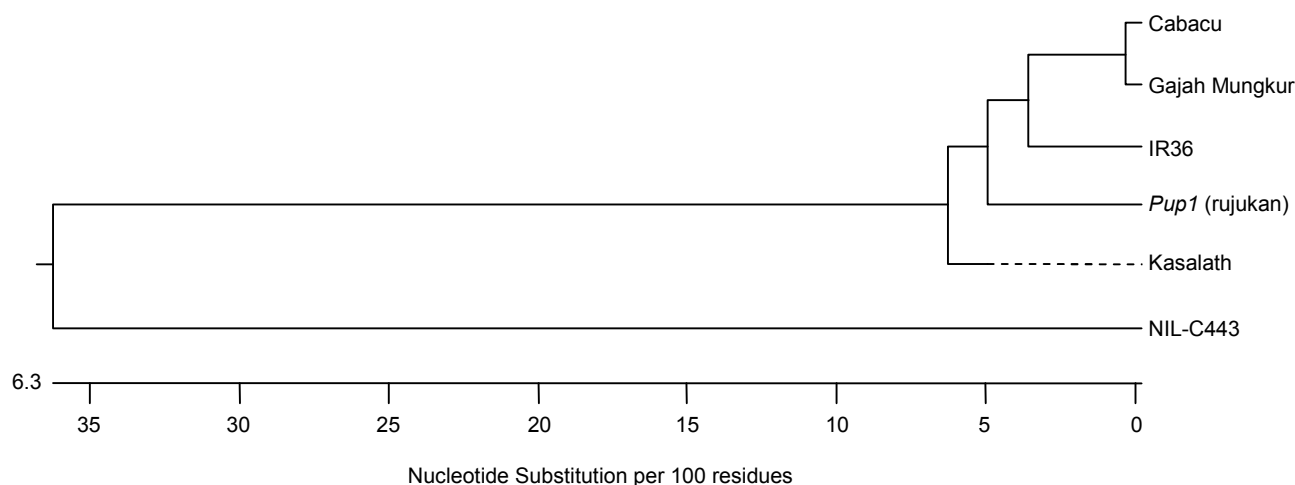
sangat membantu dalam peningkatan ketahanan galur-galur *Pup1* terhadap blas (Tasliyah *et al.*, 2015).

Daerah *OsPupKas46-2* yang dideteksi dengan marka K46-2 terletak di sekitar 275.525–276.499 bp pada daerah di sekuen rujukan (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB458444.1>). Daerah ini menyandi protein kinase serin/treonin yang telah dipelajari fungsinya secara mendalam oleh Gamuyao *et al.* (2012). Marka K46-2 dalam penelitian ini mendeteksi daerah sekitar 276.392–276.600 bp (Gambar 2). Posisi tersebut terletak di bagian akhir gen, sekitar 107 bp sebelum bagian ujung gen, dan 101 bp setelah ujung daerah gen *OsPupKas46-2*. Marka ini hanya mendeteksi 107 bp dari 974 bp gen

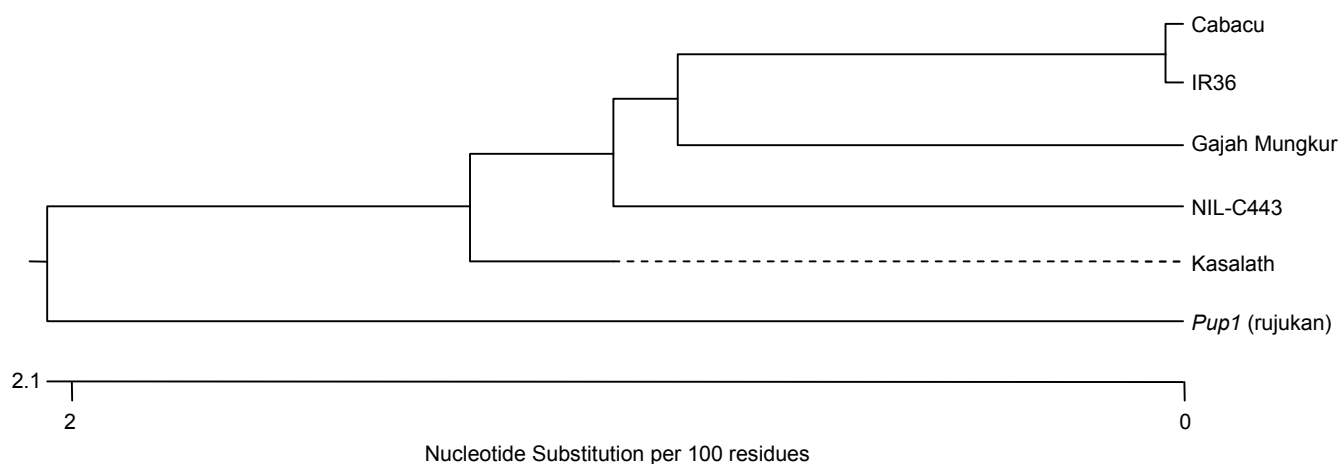
tersebut. Cabacu, IR36, dan Gajah Mungkur memiliki kesamaan sekuen yang tinggi (96%, 94,6%, dan 96%) dengan tingkat perbedaan basa kurang dari dua basa (Gambar 4 dan Tabel 5). Kesamaan sekuen basa yang tinggi dengan sekuen rujukan ini menunjukkan bahwa genotipe Cabacu, IR36, dan Gajah Mungkur memiliki peluang yang tinggi untuk dijadikan tetua sumber *Pup1* selain Kasalath. Aluwihare *et al.* (2015) menggunakan sekuen tiga puluh genotipe yang mengandung gen *Pstol1* (marka K46-2) untuk dibandingkan dengan sekuen rujukan *Pup1* dan memperoleh hasil tiga kelompok yang berbeda, pada tingkat kesamaan 84,33%. Dalam penelitian ini, diperoleh tingkat kesamaan dengan sekuen rujukan *Pup1*



Gambar 2. Hasil penjajaran sekuen K20-2 + *Bsp12681* dan K46-2 lima genotipe padi terpilih dengan sekuen rujukan lokus *Pup1*.



Gambar 3. Dendrogram lima genotipe padi terpilih berdasarkan kesamaan data sekuen nukleotida pada marka K20-2 + *Bsp12681*.



Gambar 4. Dendrogram lima genotipe padi terpilih berdasarkan kesamaan sekuen nukleotida pada marka K46–2.

Tabel 4. Persentase kesamaan antarsekuen lima genotipe terpilih pada marka K20–2 + *Bsp12681*.

	Cabacu	Gajah Mungkur	IR36	Kasalath	NIL-C443	<i>Pup1</i> (rujukan)
Cabacu		98,4	92,4	93,5	53,1	92,4
Gajah Mungkur			92,8	94,6	53,5	93,1
IR36				90,5	53,6	87,3
Kasalath					57,2	95,2
NIL-C443						54,7
<i>Pup1</i> (rujukan)						

Tabel 5. Persentase kesamaan antarsekuen lima genotipe terpilih pada marka K46–2.

	Cabacu	Gajah Mungkur	IR36	Kasalath	NIL-C443	<i>Pup1</i> (rujukan)
Cabacu		98,5	100,0	98,0	98,0	96,0
G. Mungkur			98,0	97,5	98,5	94,6
IR36				98,0	98,0	96,0
Kasalath					100,0	97,0
NIL-C443						97,5
<i>Pup1</i> (rujukan)						

yang jauh lebih tinggi (94,6–96%), dengan kesamaan lokus *Pup1* terendah dijumpai pada genotipe Gajah Mungkur.

Identifikasi gen dengan marka molekuler diharapkan dapat mempermudah eksplorasi sumber-sumber gen baru. Kottearachchi dan Wijesekara (2013), selain menggunakan dua marka spesifik lokus *Pup1* (K46–2 dan K52–1) untuk mengevaluasi dua puluh genotipe padi di Srilangka, juga menguji genotipe tersebut di tanah dan larutan Yoshida. Mereka membuktikan bahwa genotipe yang memiliki alel *Pup1* juga memiliki penampilan akar lebih bagus. Hal ini menunjukkan bahwa penggunaan marka spesifik *Pup1* sangat bermanfaat sebagai sarana untuk seleksi awal plasma nutfah padi. Pembuktian Cabacu, IR36, dan Gajah Mungkur sebagai calon donor *Pup1* selain Kasalath masih perlu dilakukan secara fisiologis dan agronomis. Gajah Mungkur dan Cabacu, selain dapat menjadi sumber lokus *Pup1*

yang baru, juga merupakan genotipe yang toleran kekeringan (Suardi, 2000) sehingga memberikan nilai tambah tersendiri. Gajah Mungkur dan IR36 telah dilepas sebagai varietas unggul sehingga ada beberapa sifat baik yang telah adaptif untuk lingkungan di Indonesia.

KESIMPULAN

Eksplorasi lokus *Pup1* pada 55 genotipe padi menggunakan empat marka spesifik dalam lokus *Pup1* mendapatkan tiga genotipe (Gajah Mungkur, Cabacu, dan IR36) yang memiliki alel Kasalath pada keempat marka tersebut. Sekuen Kasalath, NIL-C443, Gajah Mungkur, Cabacu, dan IR36 untuk daerah penyandi protein dirigen yang dideteksi dengan marka K20–2 + *Bsp12681* dan protein serin/treonin kinase yang dideteksi dengan marka K46–2 memiliki kesamaan yang bervariasi, berturut-turut 54,7–95,2%

dan 94,6–97,5%, dibanding dengan sekuen rujukan lokus *Pup1*. Gajah Mungkur, Cabacu, dan IR36 memiliki potensi sebagai sumber lokus *Pup1* yang baru menggantikan Kasalath berdasarkan marka spesifik dan kesamaan dengan sekuen rujukan lokus *Pup1*.

DAFTAR PUSTAKA

- Aluwihare, Y.C., M.D.M. Chamikara, D.R.R.P. Dissanayake, N.N.H. Karannagoda, D.N. Sirisena, W.L.G. Samarasinghe, S. Rajapakse, and S.D.S.S. Sooriyapathirana. 2015. Validation of *K46*, a *Pup1*-linked marker, using a selection of Sri Lankan rice (*Oryza sativa* L.) germplasm for marker assisted selection towards phosphorus deficiency tolerance. Ceylon J. Sci. (Bio. Sci.) 44(2):45–54.
- Aluwihare, Y.C., M. Ishan, M.D.M. Chamikara, C.K. Weebadde, D.N. Sirisena, W.L.G. Samarasinghe, and S.D.S.S. Sooriyapathirana. 2016. Characterization and selection of phosphorus deficiency tolerant rice genotypes in Sri Lanka. Rice Sci. 23(4):184–195.
- Chen, L., L. Lin, G. Cai, Y. Sun, T. Huang, K. Wang, and J. Deng. 2014. Identification of nitrogen, phosphorus, and potassium deficiencies in rice based on static scanning technology and hierarchical identification method. PLoS ONE 9(11):e113200. doi:10.1371/journal.pone.0113200.
- Chin, J.H., R. Gamuyao, C. Dalid, M. Bustaman, J. Prasetyono, S. Moeljopawiro, M. Wissuwa, and S. Heuer. 2011. Developing rice with high yield under phosphorus deficiency: *Pup1* sequence to application. Plant Physiol. 156:1202–1216.
- Chin, J.H., X. Lu, S.M. Haefele, R. Gamuyao, A.M. Ismail, M. Wissuwa, and S. Heuer. 2010. Development and application of gene-based markers for the major rice QTL *Phosphorus uptake 1*. Theor. Appl. Genet. 120(6):1073–1086.
- Cordell, D., J.O. Dragert, and S. White. 2009. The story of phosphorus: Global food security and food for thought. Glob. Environ. Change 19:292–305.
- Dellaporta, S.L., J. Wood, and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. Plant. Mol. Biol. Rep 1(4):19–21.
- Gamuyao, R., J.H. Chin, J. Pariasca-Tanaka, P. Pesaresi, S. Catausan, C. Dalid, I.S. Loedin, E.M.T. Mendoza, M. Wissuwa, and S. Heuer. 2012. The protein kinase *Pstol1* from traditional rice confers tolerance of phosphorus deficiency. Nature 488(7412):535–539.
- Hadiananto, W., L. Hakim, dan Bakhtiar. 2015. Karakteristik koleksi plasma nutfah padi berdasarkan viabilitas dan vigor benih. J. Floratek 10(2):61–71.
- Heuer, S., X. Lu, J.H. Chin, J. Pariasca-Tanaka, H. Kanamon, T. Matsumoto, T.D. Leon, V.J. Ulat, A.M. Ismail, M. Yano, and M. Wissuwa. 2009. Comparative sequence analyses of the major quantitative trait locus phosphorus uptake 1 (*Pup1*) reveal a complex genetic structure. Plant Biotech. J. 7:456–471.
- Ismail, A.M., S. Heuer, M.J. Thomson, and M. Wissuwa. 2007. Genetic and genomic approaches to develop rice germplasm for problem soils. Plant Mol. Biol. 65(4):547–570.
- Kottearachchi, N.S. and U.A.D.S.L. Wijesekara. 2013. Implementation of *Pup1* gene based markers for screening of donor varieties for phosphorus deficiency tolerance in rice. Ind. J. Pl. Sc. 2(4):76–83.
- Pariasca-Tanaka, J., J.H. Chin, K.N. Dramé, C. Dalid, S. Heuer, and M. Wissuwa. 2014. A novel allele of the P-starvation tolerance gene *OsPSTOL1* from African rice (*Oryza glaberrima* Steud.) and its distribution in the genus *Oryza*. Theor. Appl. Genet. 127:1387–1398.
- Prasetyono, J., T. Suhartini, I.H. Soemantri, Tasliah, S. Moeljopawiro, H. Aswidinnoor, D. Sopandie, dan M. Bustaman. 2012. Evaluasi beberapa galur-*Pup1* tanaman padi (*Oryza sativa* L.) pada larutan hara dan lapangan. J. Agron. Indonesia 40(2):83–90.
- Prasetyono, J. dan Tasliah. 2012. Pemetaan, karakterisasi, dan pengembangan marka-marka lokus *Pup1* (*P uptake 1*). J. AgroBiogen 8(3):120–129.
- Romdon, A.S., E. Kurniyati, S. Bahri, dan J. Pramono. 2014. Kumpulan deskripsi varietas padi. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Balai Besar Pengkajian dan Pengembangan Teknologi Pertanian, Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Jawa Tengah.
- Rose, T.J., S.M. Impa, M.T. Rose, J. Pariasca-Tanaka, A. Mori, S. Heuer, S.E. Johnson-Beebout, and M. Wissuwa. 2013. Enhancing phosphorus and zinc acquisition efficiency in rice: A critical review. Ann. Bot. 112:331–345.
- Sarkar, S., R. Yelne, M. Chatterjee, P. Das, S. Debnath, A. Chakraborty, N. Mandal, K. Bhattacharya, and S. Bhattacharyya. 2011. Screening for phosphorus (P) tolerance and validation of *Pup-1* linked markers in indica rice. Indian J. Genet. 71(3):209–213.
- Silitonga, T.S. dan A. Risliawati. 2013. Pembentukan koleksi inti plasma nutfah padi. Bul. Plasma Nutfah 19(2):61–72.
- Suardi, D. 2000. Kajian metode skrining padi tahan kekeringan. Bul. AgroBio 3(2):67–73.
- Tasliah, J. Prasetyono, T. Suhartini, dan I.H. Soemantri. 2015. Ketahanan galur-galur *Pup1* terhadap penyakit blas. J. Pen. Pert. Tan. Pangan. 34(1):29–36.
- Tyagi, W., M. Rai, and A. Dohling. 2012. Haplotype analysis for *Pup1* locus in rice genotypes of North Eastern and Eastern India to identify suitable donors tolerant to low phosphorus. SABRAO J. Breed. Genet. 44(2):398–405.
- Vinod, K.K. and S. Heuer. 2012. Approaches towards nitrogen- and phosphorus-efficient rice. AoB PLANTS: pls028. doi:10.1093/aobpla/pls028.

Wissuwa, M., J.N. Wegner, N. Ae, and M. Yano. 2002. Substitution mapping of *Pup1*: A major QTL increasing phosphorus uptake of rice from a phosphorus-deficient soil. *Theor. Appl. Genet.* 105:890–897.

Wissuwa, M., M. Yano, and N. Ae. 1998. Mapping of QTLs for phosphorus-deficiency tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 97:777–783.
