

KARAKTERISASI VIRULENSI DAN MOLEKULER WERENG BATANG COKLAT (*NILAPARVATA LUGENS* [STÅL])

Chaerani¹, Siti Yuriyah¹, Ahmad Dadang¹, Diani Damayanti¹, Kusumawaty
Kusumanegara¹, Trisnarningsih², Bahagiawati¹, dan Sutrisno¹

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya
Genetik Pertanian, Jln. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111

²Balai Besar Penelitian Tanaman Padi, Jln. Raya Ciapus no. 25, Bogor
e-mail: chaeran1@yahoo.com

ABSTRAK

Wereng batang coklat (WBC) mudah beradaptasi pada varietas padi yang mengandung gen ketahanan tunggal terhadap WBC. Ketersediaan marka molekuler yang dapat menentukan virulensi WBC yang berkembang di lapang akan berguna untuk perancangan strategi pelepasan varietas tahan. Penelitian ini bertujuan mempelajari keragaan virulensi dan genetik populasi WBC lapang dan biotipe WBC untuk mengidentifikasi marka molekuler yang berasosiasi dengan virulensi WBC. Sepuluh populasi WBC asal Provinsi Banten (T2), Jawa Barat (S1), Kalimantan Selatan (B1-B4), dan Sulawesi Selatan (X1, X3-X5); serta terduga 'biotipe 1' dan 'biotipe 2' diuji virulensinya pada empat varietas diferensial mengandung gen ketahanan yang berbeda terhadap WBC (TN-1 [tanpa gen ketahanan], Mudgo [*Bph1*], ASD7 [*bph2*], dan Rathu Heenathi [*Bph3*]). Hasil pengujian menunjukkan bahwa virulensi B1-B4, X1, dan X3 sudah melebihi biotipe 4; virulensi X4 menyamai biotipe 4; virulensi T2 dan X5 seperti biotipe 3; sedangkan virulensi S1 paling rendah, yakni seperti biotipe 2. Virulensi WBC yang selama ini dipelihara sebagai 'biotipe 1' dan 'biotipe 2' ternyata telah bergeser, berturut-turut menjadi biotipe 4 dan lebih virulen daripada biotipe 4. Karakterisasi WBC menggunakan 38 primer *expressed sequence tag-simple sequence repeat* (EST-SSR) polimorfik terhadap 5 ekor per populasi mendapatkan rata-rata keragaan alelik yang moderat pada koleksi WBC dengan jumlah alel 30 dan nilai *polymorphic information content* (PIC) sebesar 0,47. Jumlah alel SSR dan nilai PIC yang terdeteksi pada S1 nyata paling rendah (berturut-turut 18 dan 0,38) dibandingkan dengan yang terdeteksi pada populasi lainnya yang lebih virulen (berturut-turut 21–40 dan 0,42–0,52). Plot *principal coordinate analysis* (PCoA) tidak memperlihatkan adanya korespondensi antara genotipe SSR dengan fenotipe virulensi WBC, sehingga marka molekuler yang dapat menentukan virulensi WBC belum diperoleh. Evaluasi marka EST-SSR dan jumlah individu WBC yang lebih banyak serta tersedianya WBC biotipe 1 murni diharapkan dapat meningkatkan peluang ditemukannya marka yang berasosiasi dengan virulensi WBC.

Kata kunci: wereng batang coklat, keragaan, marka molekuler, EST-SSR, virulensi

ABSTRACT

Brown planthopper (BPH) is highly adapted on rice carrying single BPH resistance gene. The availability of molecular marker(s) which can be used to determine BPH virulence will be useful for designing management of this pest through the use of resistant varieties. The objective of this study was to evaluate virulence and molecular diversity of field BPH and BPH biotypes with the goal to identify markers that correspond to BPH virulence. Ten field populations from Provinces of Banten (T2), West Java (S1), South Kalimantan (B1-B4), and South Sulawesi (X1, X3-X5), as well as long-term laboratory reared 'biotype 1' and 'biotype 2' were tested on four differential varieties carrying different BPH resistance genes (TN-1 [none], Mudgo [*Bph1*], ASD7 [*bph2*], dan Rathu Heenathi [*Bph3*]) to determine their virulences. The tests showed that populations B1-B4, X1, and X3 were more virulent than biotype 4; X4 was classified as biotype 4; T2 and X5 were classified as biotype 3; whereas S1 was identified as biotype 2. Virulence of the putative 'biotype 1' and 'biotype 2' were unexpectedly shifted to biotype 4 and more virulent than biotype 4, respectively. Characterization of BPH with 38 expressed sequence tag-simple sequence repeat (EST-SSR) polymorphic primers on 5 individuals per population obtained moderate level of SSR allelic diversity within BPH collection with polymorphic information content (PIC) as high as 0.47. The number of SSR allele and PIC value detected in S1 population were significantly lower (18 and 0.38, respectively) compared to the other BPH populations with higher virulence level 21–40 and 0.42–0.52, respectively). Plot of principal coordinate analysis (PCoA) showed lack of correspondence between SSR genotypes and BPH virulence phenotypes, indicating that molecular marker(s) which can determine BPH virulence reliably have not been identified. Evaluation of more EST-SSR markers and BPH individuals, as well as the availability of homogenous biotype 1 are necessary to increase the probability in finding marker(s) associated with BPH virulence.

Key words: brown plant hopper, diversity, molecular marker, EST-SSR, virulence

PENDAHULUAN

Wereng batang coklat (*Nilaparvata lugens* (Stål) [*Homoptera: Delphacidae*]) merusak tanaman padi secara langsung dengan menghisap cairan dalam pembuluh floem dan secara tidak langsung dengan menularkan virus kerdil rumput dan kerdil hampa (Baehaki, 2011). Serangga ini menjadi hama utama padi di Indonesia setelah penanaman varietas genjah berdaya hasil tinggi dari *International Rice Research Institute* (IRRI) secara luas. Serangan ekstensif terjadi pada periode tahun 1974-1978, kemudian pada periode 1998-1999 dan 2005-2006 (Susanti *et al.*, 2010). Ledakan populasi wereng batang coklat (WBC) juga terjadi pada tahun-tahun berikutnya tetapi serangannya banyak terjadi di Pulau Jawa (Baehaki dan Munawar, 2013).

Hama yang berstrategi *r* atau bereproduksi secara eksponensial ini mampu beradaptasi untuk makan dan bereproduksi pada varietas tahan (Baehaki, 2011). Sesuai dengan terminologi dari IRRI, populasi WBC yang virulen pada varietas padi dengan ketahanan yang berbeda disebut sebagai biotipe dan diberi nomor (Claridge *et al.*, 1984). Biotipe 1 dapat bereproduksi baik pada TN1 (tidak membawa gen ketahanan), biotipe 2 pada Mudgo (membawa gen ketahanan *Bph1*), biotipe 3 pada TN1 dan ASD7 (mengandung gen ketahanan *bph2*), sedangkan biotipe 4 bereproduksi pada ketiga varietas tersebut tetapi tidak dapat bereproduksi pada Rathu Heenathi (*Bph3*; Brar *et al.*, 2009). Populasi WBC lapang dengan pola virulensi seperti keempat biotipe tersebut diberi nama dengan biotipe dan nomor yang sesuai. Antar biotipe tidak ada perbedaan morfologi yang nyata dan dapat terjadi perkawinan antar biotipe, sehingga penamaan biotipe dimaksudkan untuk memberi identitas suatu populasi WBC dengan kelompok virulensi tertentu (Claridge *et al.*, 1982). Biotipe 1-3 telah digunakan untuk seleksi ketahanan galur padi di Asia (Claridge *et al.*, 1984) termasuk Indonesia (Baehaki dan Munawar, 2013).

Sudah ada empat biotipe WBC di Indonesia (Baehaki dan Munawar, 2007). Biotipe 1 muncul pada tahun 1974 sesudah penanaman var. Pelita, biotipe 2 dikenal pada tahun 1976 dan menyerang var. IR26, dan biotipe 3 muncul setelah penanaman var. IR42 (Oka dan Bahagiawati, 1984). Biotipe 4 teridentifikasi di Sumatera Utara namun serangannya tidak sampai meluas (Baehaki dan Munawar, 2008). Pada tahun 2005 biotipe 3 mendominasi serangan di Pulau Jawa, Sumatera Selatan dan Sulawesi Selatan (Baehaki dan Munawar, 2008).

Pemantauan dinamika perubahan populasi WBC di lapang diperlukan untukantisipasi terjadinya ledakan WBC dengan fenotipe virulensi baru (Baehaki dan Munawar, 2008). Akan tetapi metode identifikasi virulensi WBC pada varietas diferensial memakan waktu lama sehingga memperlambat upaya perakitan dan pelepasan varietas dengan gen ketahanan terhadap biotipe WBC tertentu.

Saat ini tersedia marka DNA dari kelas *simple sequence repeats* (SSR) yang dikembangkan secara *in silico* dari pangkalan data *expressed sequence tag* (EST) WBC (Jing *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2011; Jairin *et al.*, 2012; Liu dan Hou, tidak dipublikasikan). Marka EST-SSR berkorespondensi dengan daerah pengkode gen sehingga berpeluang tinggi menjadi marka langsung untuk gen-gen yang berkaitan dengan virulensi (Jing *et al.*, 2011). Enampuluh satu marka EST-SSR dapat membedakan biotipe 1, 2, 3, dan biotipe Y yang diseleksi dari biotipe 3 (Jing *et al.*, 2011). Penggunaan marka SSR ini akan sangat membantu identifikasi virulensi WBC yang berkembang di lapang secara lebih cepat dan akurat.

Penelitian ini bertujuan: (1) mempelajari virulensi WBC lapang dan 'biotipe', (2) mempelajari keragaan molekuler WBC lapang dan 'biotipe' menggunakan marka EST-SSR, dan (3), mengetahui hubungan antara fenotipe virulensi dengan genotipe SSR untuk mendapatkan marka SSR yang berasosiasi dengan kelompok virulensi WBC di Indonesia.

BAHAN DAN METODE

Penentuan Virulensi Wereng Batang Coklat

Sepuluh populasi WBC yang dikumpulkan dari Provinsi Banten (T2, var. Inpari 13), Bekasi (S1, var. Manohara), Sulawesi Selatan (X1, X3-X5; var. Memberamo dan Ciliwung), dan Kalimantan Selatan (B1-B4; var. Ciherang, Inpari 13, dan Karang Dukuh Kuning), dipelihara di fasilitas rumah kaca Cikeumeuh, Bogor, dalam kandang-kandang berkasa berisi tanaman pakan berumur 45 HST yang ditanam dalam ember berdiameter 15 cm. Varietas tanaman pakan yang diberikan sesuai dengan varietas asal darimana WBC diperoleh. 'Biotipe 1' dan 'biotipe 2' dipelihara di fasilitas rumah kaca KP Muara, Bogor, berturut-turut pada var. Pelita I-1 dan IR 26. Sebanyak 300–480 ekor betina bunting dibiarkan bertelur pada tanaman-tanaman pakan berumur 45 HST selama tiga malam, setelah itu seluruh betina dikeluarkan dari kandang. Telur dipelihara hingga menetas menjadi nimfa instar 2 dan 3.

Virulensi WBC diuji menggunakan metode skrining massal (Baehaki, 2012). 'Biotipe 1' dan 'biotipe 2' diuji di rumah kaca KP Muara, sedangkan 10 populasi WBC diuji di rumah kaca Cikeumeuh. Empat varietas diferensial WBC yaitu TN1 (tanpa gen ketahanan terhadap WBC), Mudgo (*Bph1*), ASD7 (*bph2*), dan Rathu Heenathi (*Bph3*), ditanam dalam larikan-larikan sepanjang 25–30 cm dalam bak-bak berisi lumpur. Setiap varietas ditanam dalam satu larikan, sebanyak 20 kecambah (umur 3 hari). Varietas TN-1 ditanam dalam dua larikan pada bagian tepi dan tengah tiap bak. Nimfa instar-2 dan instar-3 diinfestasikan pada bibit berumur 10–13 hari pada tingkat 8 ekor nimfa WBC per tanaman menggunakan metode keprik (*tapping*) secara merata (Baehaki, 2012). Pengujian virulensi dilaksanakan dalam rancangan acak kelompok dengan tiga ulangan perlakuan varietas dan dilaksanakan secara berseri. Tiap bak tanam merupakan satu ulangan.

Kerusakan tanaman diamati pada saat $\geq 90\%$ tanaman TN1 mati menggunakan dua macam metode. Pada pengujian 5 populasi (B2, B3, X1, X3, dan X4) dan kedua 'biotipe' kerusakan tiap tanaman diskor pada skala 0–9 (0=tidak ada gejala serangan dan 9=tanaman mengering) sesuai metode dari Sun *et al.* (2005) dan Kumari *et al.* (2010) yang dimodifikasi (Tabel 1). Pada pengujian 5 populasi selanjutnya (B1, B4, S1, T2, dan X5), dilakukan penyederhanaan penilaian kerusakan tanaman, yaitu dengan menghitung jumlah tanaman yang mengalami kelayuan parah (skor 7) dan tanaman mati (skor 9). Persentase tanaman dengan kelayuan parah dan tanaman mati dikonversi kedalam nilai skor kerusakan, yaitu persentase 0% dikonversi sebagai skor 0, >0–30%, 31–50%, 51–70%, 71–80%, dan $\geq 81\%$ berturut-turut dikonversi sebagai skor 1, 3, 5, 7, dan 9. Analisis korelasi sederhana menunjukkan bahwa kedua macam metode penilaian kerusakan berkorelasi erat ($r=0,65$; $P<0,001$; $db=103$).

Untuk mengetahui kelompok biotipe WBC yang diuji, varietas diferensial dengan skor kerusakan ≤ 5 dikategorikan sebagai 'tahan', sedangkan tanaman

dengan skor kerusakan >5 dikategorikan sebagai 'rentan' (Brar *et al.* 2009). Biotipe 1 hanya dapat menyerang TN1; biotipe 2 menyerang TN1 dan Mudgo; biotipe 3 dapat menyerang TN1 dan ASD7; sedangkan biotipe 4 dapat menyerang TN1, Mudgo, dan ASD7.

Tabel 1. Penilaian kerusakan tanaman padi akibat serangan wereng batang coklat berdasarkan skor kerusakan per tanaman (Sun *et al.*, 2005; Kumari *et al.*, 2010 dengan sedikit modifikasi)

Skor	Status tanaman
0	Tidak ada kerusakan
1	Satu daun menguning
3	Daun pertama dan kedua menguning sebagian
5	Setengah bagian tanaman menguning
7	Setengah bagian tanaman layu
9	Tanaman mati

Analisis SSR Wereng Batang Coklat

DNA diekstraksi secara individual dari 5 ekor jantan dan betina tiap populasi dan 'biotipe' menggunakan buffer ekstraksi SDS sesuai metode dari Latief *et al.* (2009). Tiga puluh delapan primer EST-SSR polimorfik (Tabel 2) hasil penapisan 72 primer dari Jing *et al.* (2011), Sun *et al.* (2011), Jairin *et al.* (2012), serta Liu dan Hou (tidak dipublikasikan) pada tiga populasi WBC dengan virulensi berbeda, digunakan untuk mengamplifikasi SSR dari total 60 individu WBC. DNA diamplifikasi dalam volume reaksi 10 µl yang mengandung buffer PCR 1×; dNTPs 1 mM; MgCl₂ 2,5 mM; primer *forward* dan *reverse* masing-masing 0,3 µM; *Taq*polymerase 1 U; dan DNA 10-40 ng. PCR dilakukan pada mesin *thermal cycler* Bio-Rad menggunakan program *touchdown* yang terdiri dari 4 menit pra-denaturasi pada suhu 94°C, diikuti dengan 20 siklus dari 30 detik denaturasi pada suhu 94°C, 30 detik penempelan primer pada suhu 58°C dengan penurunan suhu 0,5°C per siklusnya, 30 detik pemanjangan basa pada suhu 72°C; kemudian diikuti dengan 15 siklus tahapan yang terdiri dari 30 detik denaturasi pada suhu 94°C, 30 detik penempelan primer pada suhu 48°C, 30 detik pemanjangan basa pada suhu 72°C; dan diakhiri dengan pemanjangan basa akhir selama 5 menit pada suhu 72°C. Amplikon dielektroforesis pada gel poliakrilamid 8% yang dijalankan pada arus konstan 80 V selama 1,5 jam. DNA *size marker* 10 bp (Invitrogen) dijalankan bersama-sama pada gel sebagai pembanding ukuran alel SSR. Pita DNA divisualisasi menggunakan pewarnaan perak nitrat 0,1%.

Keberadaan pita DNA diskor sebagai '1', sedangkan ketiadaan pita diskor '0'. Matriks skor biner diolah dengan program PowerMarker V3.25 (Liu dan Muse, 2005) untuk penghitungan jumlah alel SSR, dan dengan GenAlex 6.41 (Peakall dan Smouse 2009) untuk analisis ragam molekuler (*analysis of molecular variance*, AMOVA) dan analisis koordinat utama (*principal coordinate analysis*, PCoA).

Tabel 2. Primer EST-SSR yang digunakan untuk analisis keragaan genetik wereng batang coklat

No.	Marker	Pustaka ^a	No.	Marker	Pustaka	No.	Marker	Pustaka
1.	BM8	1	14.	BM395	1	27.	NLES6	4
2.	BM25	1	15.	BM432	1	28.	NLES8	4
3.	BM68	1	16.	BM435	1	29.	NLES11	4
4.	BM76	1	17.	BM499	1	30.	NLES15	4
5.	BM140	1	18.	BM1262	1	31.	NLES18	4
6.	BM194	1	19.	BM1277	1	32.	NLES22	4
7.	BM246	1	20.	BPH06	2	33.	NLES24	4
8.	BM265	1	21.	BPH07	2	34.	NLES30	4
9.	BM298	1	22.	BPH09	2	35.	NLES33	4
10.	BM339	1	23.	DB839391	3	36.	NLES34	4
11.	BM347	1	24.	DB845048	3	37.	NLES35	4
12.	BM350	1	25.	DB846024	3	38.	NLES49	4
13.	BM375	1	26.	NLES2	4			

^a1=Jing *et al.* (2011); 2= Liu dan Hou (tidak dipublikasikan); 3=Sun *et al.* (2011); 4=Jairin *et al.* (2012)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Virulensi Wereng Batang Coklat

Berdasarkan kategori ketahanan varietas diferensial, populasi WBC asal lapang dengan virulensi seperti biotipe 1 sudah tidak ditemukan. Populasi S1 (Bekasi, Jawa Barat) tergolong sebagai biotipe 2; T2 (Serang, Banten) dan X5 (Bulukumba, Sulawesi Selatan) termasuk ke dalam biotipe 3; X4 (Jeneponto, Sulawesi Selatan) teridentifikasi sebagai biotipe 4; sedangkan empat populasi asal Kalimantan Selatan, yaitu B1 (Barito Kuala), B2, B3 dan B4 (Hulu Sungai Tengah) serta dua populasi asal Sulawesi Selatan X1 (Maros) dan X3 (Takalar) lebih ganas daripada biotipe 4 (Tabel 3). Sementara itu virulensi WBC yang telah lama dianggap sebagai 'biotipe 1' ternyata telah mengarah ke biotipe 3, sedangkan 'biotipe 2' lebih virulen daripada biotipe 4.

Pergeseran virulensi WBC lapang ke arah yang lebih ganas dapat disebabkan oleh adanya tekanan seleksi berupa penanaman varietas padi dengan ketahanan yang lebih tinggi dibandingkan dengan varietas yang ditanam sebelumnya dalam skala luas sehingga menimbulkan varian individu-individu WBC yang mampu mengatasi mekanisme ketahanan padi dalam populasi tersebut (Claridge *et al.*, 1982; Jing *et al.*, 2011). Perubahan virulensi WBC yang selama ini dipelihara sebagai 'biotipe 1' dan 'biotipe 2' menjadi biotipe 4 dan lebih ganas daripada biotipe 4, walaupun telah lama disub-kultur dan diisolasi pada masing-masing varietas inangnya di rumah kaca, dapat diakibatkan oleh tercampurnya individu-individu virulen ke dalam populasi kedua biotipe tersebut. Pergeseran sebuah biotipe WBC menjadi biotipe yang lebih ganas dapat terjadi hanya dalam 10 generasi atau ± 1 tahun (Claridge dan Hollander, 1983).

Tabel 3. Skor dan kategori ketahanan empat varietas diferensial terhadap wereng batang coklat asal Provinsi Banten, Jawa Barat, Sulawesi Selatan, dan Kalimantan Selatan, serta 'biotipe 1' dan 'biotipe 2'

Populasi/ Biotipe ^a	TN-1 (tanpa gen ketahanan)	Mudgo (Bph 1)	ASD7 (bph2)	Rathu Heenati (Bph3)
'Biotipe 1'	8,9 (R) ^b	5,8 (R)	8,7 (R)	0,9 (T)
'Biotipe 2'	9,0 (R)	8,9 (R)	9,0 (R)	7,0 (R)
B1	8,7 (R)	9,0 (R)	9,0 (R)	6,3 (R)
B2	9,0 (R)	8,1 (R)	8,8 (R)	5,9 (R)
B3	9,0 (R)	8,8 (R)	9,0 (R)	7,1 (R)
B4	8,7 (R)	9,0 (R)	9,0 (R)	7,0 (R)
S1	8,3 (R)	7,7 (R)	4,3 (T)	3,7 (T)
T2	9,0 (R)	3,7 (T)	8,3 (R)	1,3 (T)
X1	9,0 (R)	9,0 (R)	9,0 (R)	8,1 (R)
X3	8,9 (R)	7,2 (R)	8,9 (R)	6,1 (R)
X4	9,0 (R)	7,6 (R)	9,0 (R)	4,7 (T)
X5	8,3 (R)	9,0 (R)	7,0 (R)	2,3 (T)

^a'Biotipe 1' dan '2' berasal dari BB Padi, S1 dari Jawa Barat, T2 dari Banten, B1-B4 dari Sulawesi Selatan, dan X1-X5 dari Sulawesi Selatan. ^bR=rentan (skor >5); T=tahan. WBC dikategorikan sebagai biotipe 1 jika TN1 rentan; biotipe 2 jika TN1 dan Mudgo rentan; biotipe 3 jika TN1 dan ASD7 rentan; dan biotipe 4 jika ketiga varietas rentan.

Analisis SSR Wereng Batang Coklat

Dengan menggunakan 38 primer EST-SSR polimorfik, kisaran rata-rata jumlah alel yang terdeteksi pada tiap populasi dan biotipe WBC adalah 9-44 dengan kisaran nilai *polymorphic information content* (PIC) sebesar 0,28-0,57 (Tabel 4). Nilai PIC menunjukkan tingkat keragaman suatu populasi, dimana semakin tinggi nilai PIC maka semakin tinggi keragaman alelik pada populasi tersebut. Rata-rata jumlah alel dalam seluruh koleksi WBC ini termasuk tinggi (30) dengan rata-rata nilai PIC 0,47, yang tergolong moderat ($0,50 < \text{PIC} < 0,25$; Jing *et al.*, 2011).

Keragaman alelik EST-SSR yang tinggi pada koleksi WBC yang diteliti konsisten dengan tingkat virulensinya. Populasi S1 dengan virulensi paling rendah (biotipe 2) di antara populasi WBC lainnya, memiliki keragaman alelik SSR yang secara signifikan lebih rendah (jumlah alel SSR=18 dan nilai PIC=0,38) dibandingkan dengan populasi lainnya yang lebih virulen (kisaran jumlah alel 21–40 dan PIC 0,42–0,52). Fakta ini sejalan dengan hasil penelitian Jing *et al.* (2011) yang mendapatkan bahwa nilai PIC semakin tinggi dengan meningkatnya virulensi biotipe, dimana jumlah alel SSR dan nilai PIC pada biotipe 1 adalah yang paling rendah dibandingkan dengan tiga biotipe lainnya yang lebih ganas (biotipe 2, 3 dan Y).

Tabel 4. Keragaan genetik 10 populasi dan dua biotipe wereng batang coklat berdasarkan analisis 38 lokus EST-SSR

No.	Populasi/biotipe	Rata-rata jumlah alel (kisaran) ^a	Rata-rata nilai PIC (kisaran)
1	'Biotipe 1'	40 a (37-43)	0,52 ab (0,48-0,55)
2	X1	39 ab (32-44)	0,43 abc (0,39-0,45)
3	'Biotipe 2'	38 ab (34-41)	0,54 a (0,49-0,57)
4	T2	36 ab (32-40)	0,43 abc (0,38-0,45)
5	X4	31 abc (30-33)	0,50 ab (0,45-0,55)
6	B4	31 abc (21-36)	0,46 abc (0,38-0,50)
7	X5	27 abc (20-34)	0,49 abc (0,45-0,54)
8	B2	26 abc (13-37)	0,44 abc (0,35-0,48)
9	X3	26 abc (17-39)	0,48 abc (0,40-0,55)
10	B1	25 bc (15-30)	0,48 abc (0,43-0,52)
11	B3	21 c (9-33)	0,42 bc (0,28-0,52)
12	S1	18 c (12-38)	0,38 c (0,32-0,50)
Rata-rata		30	0,47

^aRata-rata dari lima individu. Angka-angka dalam satu kolom yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji Tukey pada taraf 5%.

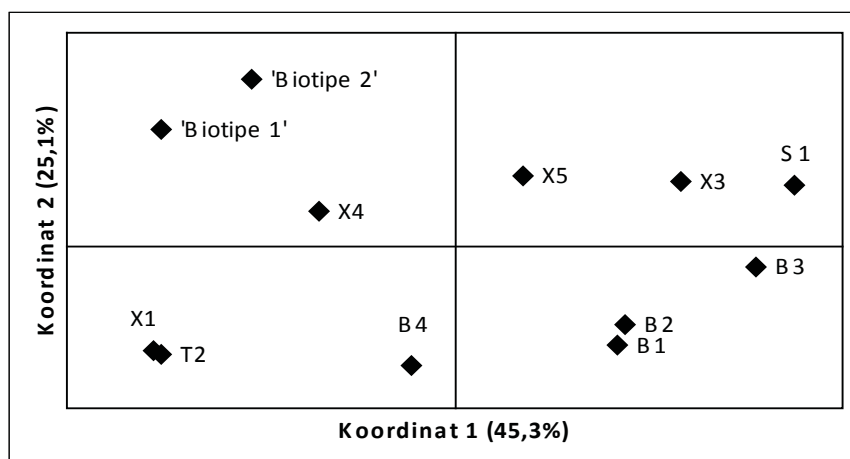
Jumlah alel pada 'biotipe 1' (40) dan nilai PIC pada 'biotipe 2' (0,52) nyata lebih tinggi dibandingkan dengan kesembilan populasi WBC lainnya ($P < 0,05$), yang berarti kedua 'biotipe' memiliki heterogenitas yang lebih tinggi. 'Biotipe 1' dan '2' telah dipelihara secara konsisten pada masing-masing varietas inangnya dalam jangka waktu lama dan diisolasi satu sama lainnya di rumah kaca tanpa ada penambahan individu dari populasi lain, sehingga seharusnya memiliki keragaan alelik yang lebih rendah dibandingkan dengan populasi WBC asal lapang. Heterogenisitas ini dapat diakibatkan oleh terjadinya kontaminasi secara tak sengaja oleh individu-individu dari populasi lain, baik yang berasal dari tanaman pakan, maupun dari individu-individu WBC dari luar kandang ke dalam kandang pemeliharaan.

Hasil AMOVA menunjukkan bahwa ragam genetik antar populasi (*among populations*) adalah sebesar 24% dan signifikan ($P = 0,001$), yang menandakan ada perbedaan genetik yang cukup besar antar populasi dan biotipe. Sisa keragaman total yang sebesar 64,5% terletak di dalam populasi (*within populations*; Tabel 5).

Tabel 5. Hirarki ragam genetik di antara dan di dalam populasi dan 'biotipe' wereng batang coklat berdasarkan *analysis of molecular variance* (AMOVA)

Sumber keragaman	Derajat bebas	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	Ragam (%)	P
Antar populasi	11	1809,0	164,5	24	0,001
Dalam populasi	48	3096,0	64,5	76	
Total	59	4905,0		100,0	

Diagram PCoA menggambarkan lebih jelas perbedaan genetik antar populasi dan 'biotipe' WBC tersebut (Gambar 1). Aksis 1 memisahkan 'biotipe 1' dan '2', populasi X4, X1, T2, dan B4 dari populasi X3, X5, S1, dan B1-B3 dengan ragam genetik sebesar 45,3%, sedangkan aksis 2 membedakan kedua 'biotipe, populasi X3-X5, dan S1 dari populasi X1, T2, dan B1-B4 dengan ragam genetik sebesar 25,1%.



Gambar 1. Plot *principal coordinates analysis* (PCoA) dari 10 populasi wereng batang coklat dan dua 'biotipe' berdasarkan 38 lokus EST-SSR. Populasi B1-B4 berasal dari Kalimantan Selatan; S1 dari Jawa Barat; T2 dari Banten; X1-X5 dari Sulawesi Selatan; Bio 1 dan 2 berturut-turut adalah 'biotipe 1' dan 'biotipe 2' asal BB Padi.

Hubungan antara keragaan virulensi dengan keragaan SSR WBC

Pemisahan genotipe SSR antar WBC tidak berkorespondensi dengan hasil pengelompokan virulensinya (Gambar 1; Tabel 3). Pada diagram PcoA populasi T2, populasi yang bervirulensi seperti biotipe 3, terletak pada aksis yang berbeda dari populasi X5 dan 'biotipe 1', yang juga memiliki tingkat virulensi seperti biotipe 3. Sementara itu posisi S1, satu-satunya populasi yang memiliki virulensi seperti biotipe 2 terpisah agak jauh dari X3 (lebih ganas dari biotipe 4) dan X5 (biotipe 3), walaupun masih berada dalam satu aksis. Demikian pula populasi lainnya tersebar pada kedua aksis meskipun memiliki tingkat virulensi yang sama. Hal ini berarti bahwa marka SSR yang digunakan belum dapat membedakan kelompok virulensi koleksi WBC yang diteliti.

Ketidakterkaitan antara fenotipe virulensi dengan genotipe SSR WBC ini dapat disebabkan oleh (1) kisaran virulensi yang kurang luas (biotipe 1 tidak tersedia) sehingga hanya lebih kurang separuh primer SSR (38 dari 72 primer) yang diuji bersifat polimorfik, (2) jumlah individu yang dianalisis SSR ($n=5$

ekor) kurang mewakili pola virulensi dari tiap populasi WBC, sedangkan Jing *et al.* (2011) menganalisis 21 ekor per populasi. Pola virulensi sebuah populasi WBC sangat ditentukan oleh proporsi individu-individu yang membawa alel-alel gen virulensi karena karakter virulensi diekspresikan secara kuantitatif dan dikendalikan oleh banyak gen, yang masing-masing mempunyai efek minor (Claridge dan Hollander, 1983; Tanaka, 1999). Untuk mendapatkan marka-marka SSR yang dapat membedakan kelompok virulensi WBC, penelitian ini perlu dilanjutkan dengan menganalisis lebih banyak marka EST-SSR pada lebih banyak individu per populasi (>5 ekor), serta mendapatkan WBC dari kelompok virulensi biotipe 1.

KESIMPULAN

Virulensi 10 populasi WBC lapang asal Banten, Kalimantan Selatan, dan Sulawesi Selatan termasuk ke dalam biotipe 3 hingga lebih ganas dari biotipe 4, sedangkan virulensi satu populasi WBC asal Jawa Barat masih tergolong sebagai biotipe 2. Virulensi WBC yang selama ini dipelihara sebagai 'biotipe 1' dan 'biotipe 2' berturut-turut telah bergeser ke biotipe 4 dan lebih ganas dari biotipe 4. Analisis keragaan genetik WBC menggunakan 38 marka EST-SSR polimorfik pada 5 ekor individu per populasi menunjukkan bahwa keragaan alelik SSR bersifat moderat dengan rata-rata nilai PIC 0,47. Hasil pengelompokan WBC berdasarkan genotipe SSR tidak berkaitan dengan tingkat virulensinya. Penelitian untuk mendapatkan marka SSR yang dapat membedakan virulensi WBC perlu dilanjutkan dengan menganalisis lebih banyak marka EST-SSR dan jumlah individu per populasi (>5 ekor), serta mendapatkan WBC biotipe 1.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penghargaan sebesar-besarnya kami sampaikan kepada M. Saputro, Rudi Mahmudin, Endang Ibrahim, Riri Sundasari, Fajar Suryawan, dan Cece Sukmana atas bantuan pemeliharaan dan pengujian wereng batang coklat; Ir. M. Thamrin, MS (Balittra), Ir. Akmal Amir (Diperta Sulsel), dan Sutirman (KP Singamerta, BPTP Banten) atas bantuan dalam pengumpulan WBC lapang. Penelitian didanai DIPA BB Biogen 2013-2014 dengan no. kode 1798.011.002.012.

DAFTAR PUSTAKA

- Baehaki, S.E. 2011. Strategi fundamental pengendalian wereng batang coklat dalam pengamanan produksi padi nasional. *Pengembangan Inovasi Pertanian* 4(3): 63-75.
- Baehaki, S.E., D. Munawar. 2008. Identifikasi biotipe wereng coklat di Jawa, Sumatera dan Sulawesi dan reaksi ketahanan kultivar padi. In: Suprihatno B *et al.* (Eds.), *Prosiding Seminar Apresiasi Hasil Penelitian Padi Menunjang P2BN* (Subang, 19-20 Nopember 2007). pp 351-366. Subang: Balai Besar Penelitian Tanaman Padi, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian.

- Baehaki, S.E., D. Munawar. 2013. Uji ketahanan galur padi terhadap wereng coklat biotipe 3 melalui *population build-up*. Jurnal Entomologi Indonesia 10(1): 7-17.
- Baehaki. 2012. Standar operasional prosedur pengujian galur dan varietas padi terhadap wereng batang coklat (*Nilaparvata lugens*). Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Kementerian Pertanian. 8 hal.
- Brar, D.S., P.S. Virk, K.K. Jena, G.S. Khush. 2009. Breeding for resistance to planthoppers in rice. Pp. 401-428. In Heong, K.L. and B. Hardy (eds.) Planthoppers: new threats to the sustainability of intensive rice production systems in Asia. IRRI.
- Claridge, M.F., J. den Hollander, D. Haslam. 1984. The significance of morphometric and fecundity differences between the 'biotypes' of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. Entomologia Experimentalis et Applicata 36: 104-114.
- Claridge, MF, J Den Hollander. 1983. The biotype concept and its application to insect pests of agriculture. Crop Protection 2(1): 85-95.
- Claridge, MF., J den Hollander, I Furet. 1982. Adaptations of brown planthopper (*Nilaparvata lugens*) populations to rice varieties in Sri Lanka. Entomologia Experimentalis et Applicata 32: 222-226.
- Jairin, J., T. Kobayashi, Y. Yamagata, S. Sanada-Morimura, K. Mori, K. Tashiro, S. Kuhara, S. Kuwazaki, M. Urio, Y. Suetsugu, K. Yamamoto, M. Matsumura, H. Yasui. 2013. A simple sequence repeat and single-nucleotide polymorphism-based genetic linkage map of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. DNA Research 20: 17-30.
- Jing, S., B. Liu, L. Peng, L. Zhu, Q. Fu, and G. He. 2011. Development and use of EST-SSR markers for assessing genetic diversity in the brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål). Bulletin of Entomological Research, page 1-10. Doi:10.1017/S0007485311000435.
- Kumari, S., J.M. Sheba, M. Marappan, S. Ponnuswamy, S. Seetharaman, N. Pothi, M. Subbarayalu, R. Muthurajan, S. Natesan. 2010. Screening of IR503 Rathu Heenati F7RILs and identification of SSR markers linked to brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål) resistance in Rice (*Oryza sativa* L.). Molecular Biotechnology 46:63-71.
- Latif MA, MY Rafi, MS Mazid, ME Ali, F Ahmed, MY Omar, SG Tan. 2012. Genetic dissection of sympatric populations of brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål), using DALP-PCR molecular markers. The Scientific World Journal 2012, Article ID 585831
- Liu, K. and S.V. Muse. 2005. PowerMarker: integrated analysis environment for genetic marker data. Bioinformatics 21: 2128-2129.
- Liu, Y.D, M.L. Hou. Development of EST-SSRs in the brown planthopper *Nilaparvata lugens*. Molecular Ecology Resources (submitted).
- Oka, I.N., Bahagiawati A.H. 1984. Development and management of a new brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stal) biotype in North Sumatera, Indonesia. Contribution no. 71. Central Research Institute for Food Crops, Bogor. 33p.

- Peakall, R., P.E. Smouse. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel, population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Note* 6: 288-295.
- Sun, J.T., Y.K. Zhang, C. Ge, X.Y. Hong. 2011. Mining and characterization of sequence tagged microsatellites from the brown planthopper *Nilaparvata lugens* Stål. *Journal of Insect Science* 11: 134.
- Sun, L., C. Su, C. Wang, H. Zhai, and J. Wan. 2005. Mapping of a major resistance gene to the brown planthopper in the rice cultivar Rathu Heenati. *Breeding Science* 55: 391-396.
- Susanti, E., F. Ramadhani, T. June, L.I. Amien. 2010. Utilization of climate information for development of early warning system for brown plant hopper attack on rice. *Indonesian Journal of Agriculture* 3(1): 17-25.
- Tanaka K. 1999. Quantitative genetic analysis of biotypes of the brown planthopper *Nilaparvata lugens*: heritability of virulence to resistant rice varieties. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 90: 279-287.