

HUBUNGAN KEMAMPUAN PERGANTIAN INANG DENGAN PLASTISITAS GENETIKA PADA CENDAWAN BLAS PADI (*Pyricularia grisea*)

(CHANGE ON GENETIC PLASTICITY OF RICE BLAST (*Pyricularia grisea*) DURING INFECTION IN DIFFERENT HOST)

Sri Listiyowati^{1,2)}, Utut Widyastuti^{1,2)}, Gayuh Rahayu²⁾, Alex Hartana^{1,2)}, Muhammad Jusuf^{1,2)}

ABSTRACT

The *Digitaria ciliaris*, wild grass grown around rice field, was a host for *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc., the fungi caused blast disease of rice. This fungi have a specific mechanism to regenerate new genetic variation in its life cycle. The aim of this research is to study the relation between the ability of the fungi to infect different species of host with its genetic plasticity. It was used three SCAR molecular markers Cut1, Pwl 1 and Erg2. *P. grisea* isolates (Dc4J1) originated from *D. ciliaris* at Jasinga-Bogor were able to infect rice cultivars Kencana Bali and Cisokan. The original Dc4J1, from *D. ciliaris*, and the Dc4J1 that were reisolated from the infected rice cultivars (reisolates-1) had the same ability to infect Kencana Bali and Cisokan. Molecular technique showed that there was a different molecular marker genotype between the original Dc4J1, from *D. ciliaris*, and the Dc4J1 reisolated from infected rice cultivars. The original Dc4J1 owned Cut1 but did not Pwl2 in contrary the reisolates Dc4J1 from rice cultivars (reisolates-1) had Pwl2 but did not Cut1. The Erg2 presented in both the original and the reisolated Dc4J1. These results indicated that there were a change of genotype of *P. grisea* at the same time with the change of host species. The Dc4J1 isolates originated from Kencana Bali and Cisokan (reisolates-2) that were infected by reisolates-1, had the same genotype with the reisolates-1.

Keywords : *Digitaria ciliaris*, *Pyricularia grisea*, genetic plasticity.

ABSTRAK

Rumput *Digitaria ciliaris* yang tumbuh di sekitar tanaman padi merupakan salah satu inang cendawan *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. Cendawan tersebut merupakan penyebab penyakit blas pada padi. Cendawan memiliki mekanisme tersendiri untuk mengintroduksi variasi genetika dalam siklus hidupnya. Penelitian ini bertujuan melihat hubungan pergantian inang dengan plastisitas genetika cendawan *P. grisea* asal rumput *Digitaria ciliaris* yang diambil dari Jasinga-Bogor. Uji perubahan plastisitas dilakukan dengan menggunakan tiga marka molekuler DNA SCAR, yaitu Cut1, Pwl2 dan Erg2. Isolat *P. grisea* Dc4J1 asal rumput *D. ciliaris*, dan isolat hasil reisolasi ke-1 yang berasal dari bercak isolat *P. grisea* Dc4J1 yang telah mengalami pergantian spesies inang mampu menginfeksi padi varietas Kencana Bali maupun Cisokan. Pergantian spesies inang memunculkan perubahan pada marka molekuler Cut1 dan Pwl2, tetapi tidak menimbulkan perubahan pada Erg2 pada *P. grisea* yang digunakan pada analisis plastisitas. Isolat awal memiliki marka Cut1, namun tidak memiliki Pwl2. Sebaliknya isolat-isolat hasil reisolasi ke-1 tidak memiliki marka Cut1, tetapi memiliki Pwl2. Perubahan yang terjadi pada marker Cut1 dan Pwl2 tidak berhubungan dengan kemampuan hidup cendawan blas. Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa *P. grisea* setelah mengalami pergantian inang dalam spesies yang sama (hasil reisolasi ke-2) tidak mengalami perubahan pada marka molekuler Cut1 dan Pwl2. Hal ini memberikan indikasi bahwa Cut1 dan Pwl2 pada *P. grisea* tidak bersifat plastis (stabil) setelah diinfeksi kembali pada inang dalam spesies yang sama.

Kata kunci : *Digitaria ciliaris*, *Pyricularia grisea*, plastisitas genetika.

PENDAHULUAN

Pyricularia grisea (Cooke) Sacc. memiliki kisaran inang yang luas selain padi. Anggota serealida dan rumput-rumput yang sering merupakan gulma padi dapat pula menjadi inang *P. grisea* (Ou, 1985). Menurut beberapa peneliti, *Pyricularia grisea*

¹⁾Laboratorium Genetika Cendawan, Pusat Penelitian Sumber Daya Hayati dan Bioteknologi, LPPM, Institut Pertanian Bogor.

²⁾Dep. Biologi, Fakultas Matematika dan IPA, Institut Pertanian Bogor.

bersinonim dengan *P. oryzae* Cav. Cendawan ini merupakan cendawan penyebab penyakit blas pada padi, dan merupakan anamorf (fase aseksual) dari *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr. Cendawan ini selain patogen pada padi, juga mampu menginfeksi anggota serelia lain, seperti gandum, sorgum (Kahman & Basse, 1999).

Isolat dari *Pyricularia* tidak semua bersifat patogen terhadap varietas padi ataupun Poaceae lainnya (Shen *et al.*, 2002). Beberapa *P. grisea* penyebab penyakit blas pada rumput hanya dapat menyebabkan penyakit blas pada padi varietas rentan terhadap penyakit blas (Singh dan Singh, 1988; Direktorat Bina Perlindungan Tanaman, Deptan, 1992), dan beberapa rumput lain (Direktorat Bina Perlindungan Tanaman, Deptan 1992). Namun demikian cendawan tersebut perlu mendapat perhatian karena pada umumnya cendawan dapat beradaptasi secara cepat terhadap perubahan kondisi lingkungan, dan memiliki mekanisme tersendiri untuk mengintroduksi variasi genetik dalam siklus hidupnya. Sebagai akibatnya, variasi tersebut dapat memiliki implikasi lain, di antaranya hubungan cendawan dengan inang dapat berubah. Hubungan tersebut banyak kenyataan membuatnya menjadi parasit yang lebih ganas, dan memiliki potensi dalam hal fleksibilitas genetik (Moore-Landecker, 1996).

Adaptasi terhadap lingkungan baru, seperti pergantian genotipe inang kemungkinan dapat menimbulkan keragaman *P. grisea* asal rumput. Keragaman yang timbul dapat diamati baik berupa fenotipe maupun genotipe. Perubahan genotipe umumnya bersifat stabil dan perubahan ini dapat diamati dengan menggunakan marka molekular. Salah satu marka molekular yang dapat digunakan mengamati keragaman *P. grisea* adalah *sequence characterized amplified region marker* (SCAR) (Soubabere *et al.*, 2001). Marka SCAR yang dikembangkan oleh Soubabere *et al.*, (2001) terdiri dari 16 macam, dan hasilnya berupa marka molekular untuk memonitor rekombinasi dan migrasi dalam populasi *P. grisea*. Marka-marka tersebut merupakan hasil pengembangan dan seleksi dari 22 marka SCAR.

Pada penelitian ini hanya akan digunakan 3 macam. Ketiga macam marka SCAR tersebut adalah Cut1, Pw12, dan Erg2. Marka Cut1 memiliki jumlah alel 3 dengan kisaran ukuran: *null*, 800-1730 pb (frekuensi alel *null* sebesar 0.66), Pw12 memiliki jumlah alel 3 dengan kisaran ukuran: *null*, 800-900 pb (frekuensi alel *null* sebesar 0.21), Erg2 memiliki jumlah alel 2 dengan kisaran ukuran: *null*, 1440 pb (frekuensi alel *null* sebesar 0.47).

Keberadaan gen *cut1* tidak berpengaruh terhadap penampakan dan kecepatan sporulasi

bercak yang dihasilkan oleh suatu isolat *P. grisea* (Sweigard *et al.*, 1992b). Gen cutinase (*cut1*) *P. grisea* mengandung dua intron, yaitu berukuran 115 pb dan 147 pb dan hanya satu copy dalam genomnya. Gen *cut1* akan diekspresikan ketika kutin sebagai sumber karbon tunggal, tidak ada sumber karbon lainnya (Sweigard *et al.*, 1992a).

Lokus *pw12* memiliki polimorfik yang *tinggi* di antara cendawan penyebab blas pada padi dari lokasi geografi berbeda (Sweigard *et al.*, 1995). *pw12-2* yang merupakan alel dari *pw12* kehilangan fungsinya akibat substitusi satu pasang basa. *pw12* mempunyai banyak homologi dengan berbagai tingkat perbedaan sekuen ditemukan pada *P. grisea* berbagai asal rumput. Keberadaan homolog *pw12* tidak berkorelasi dengan fenotipe avirulen pada *E. curvula*.

Penelitian ini bertujuan melihat hubungan pergantian inang dengan plastisitas genetik cendawan *P. grisea* asal rumput *Digitaria ciliaris* yang diambil dari Jasinga-Bogor. Plastisitasnya diamati berdasarkan perubahan genotipe menggunakan tiga marka molekular SCAR, yaitu Cut1, Pw12 dan Erg2.

BAHAN DAN METODE

Bahan: Isolat *P. grisea* (Dc4J1) asal rumput *D. ciliaris* yang diambil dari daerah Jasinga-Bogor, tiga benih padi yaitu Kencana Bali, Cisokan, dan varietas IR64 yang berturut-turut bersifat rentan, moderat, dan resisten terhadap penyakit blas ras 173 (Kurnianingsih 2008).

Metode: Untuk mendapatkan isolat cendawan *P. grisea* yang mengalami pergantian inang, maka dilakukan dua kali uji infeksi. Propagul yang digunakan sebagai uji infeksi adalah spora. Uji infeksi ke-1, yaitu isolat *P. grisea* awal (Dc4J1) diinokulasikan ke masing-masing pada tiga macam tanaman padi. Bercak penyakit blas yang dihasilkan dari uji infeksi ke-1 digunakan sebagai sumber reisolasi spora tunggal cendawan *P. grisea*, dan isolat yang diperoleh diberi kode sebagai reisolat_1. Selanjutnya reisolat_1 digunakan untuk uji infeksi ke-2, yaitu diinokulasikan pada masing-masing padi varietas yang mampu diinfeksi oleh isolat *P. grisea* awal (Dc4J1). Bercak yang dihasilkan dari uji infeksi ke-2 digunakan sebagai sumber reisolasi spora tunggal *P. grisea*, dan isolat yang diperoleh diberi kode reisolat_2. Sebagai pembanding pada uji infeksi ke-1, digunakan ras 173 asal padi yang juga diinokulasikan ke masing-masing pada tiga macam tanaman padi, namun pada uji infeksi ke-2 tidak digunakan sebagai pembanding. Tahap berikutnya adalah isolat awal, isolat pembanding (ras 173 asal

padi), reisolat_1, dan reisolat_2 dianalisis secara molekular menggunakan 3 macam marka SCAR.

Produksi Spora. Potongan miselium isolat cendawan diinokulasikan pada media oatmeal (30 g oat/l, 20 g agar biotek/l, 5 g sukrosa/l), dan diinkubasi selama delapan hari pada suhu ruang, kemudian dicuci secara aseptik untuk menghilangkan hifa aerial. Setelah itu, kultur disinari n-UV terus menerus selama kurang lebih enam hari untuk menginduksi pembentukan spora. Selanjutnya, sebanyak 1-3 ml air steril yang mengandung 0.025% (v/v) Tween 20 disiramkan pada permukaan koloni cendawan. Permukaan koloni cendawan diusap-usap dengan bantuan kaca objek steril untuk melepaskan spora dari konidiofor. Spora-spora dari isolat yang sama dipanen dan dikumpulkan hingga diperoleh suspensi spora 10^4 - 10^5 spora /ml (Chao & Ellingboe, 1997).

Uji Infeksi. Varietas benih padi yang telah berkecambah masing-masing ditanam secara terpisah pada pot berisi campuran tanah dan pupuk kandang pada perbandingan 1:1. Tanah yang digunakan adalah tanah yang telah disterilkan terlebih dahulu. Selanjutnya, tanaman padi berumur 16 hari setelah tanam (hst) diinokulasi dengan 1 ml suspensi spora (10^4 - 10^5 spora/ml) isolat *P. grisea* melalui penyuntikan di bagian pelepah daun kelima. Sebagai kontrol negatif, padi disuntik menggunakan aquades, masing-masing tiga ulangan. Selanjutnya semua padi diinkubasi pada kondisi lembap dan gelap selama 24 jam, kemudian dipindahkan ke ruang terang selama enam hari pada suhu 25°C-30°C dan kelembapan 70-90% (modifikasi Chao & Ellingboe, 1997). Pengamatan kemampuan infeksi terhadap inang berupa kemunculan bercak pada daun maupun batang dilakukan setiap hari selama kurang lebih sembilan hari setelah infeksi.

Reisolasi Spora Tunggal. Reisolasi spora tunggal cendawan dilakukan dari bercak yang muncul pada daun padi yang menunjukkan gejala penyakit blas (timbul bercak), sebagai hasil uji infeksi. Reisolasinya dilakukan dengan cara: bercak blas pada daun padi dicuci dengan air mengalir, kemudian setiap bercak blas dilembapkan semalam, selanjutnya sejumlah spora tunggal diisolasi dengan bantuan mikroskop. Spora tunggal dikecambahkan pada media *water agar* 4% (w/v) (agar bacto 40 g/l dan kloramfenikol 500 mg/l). Isolat hasil perkecambahan ditumbuhkan pada medium *Potato Dextrose Agar* (PDA).

Identifikasi Isolat. Reisolat_1 yang berasal dari bercak hasil infeksi isolat *P. grisea* awal (Dc4J1) asal *D. ciliaris* ditumbuhkan pada medium produksi spora (medium oatmeal) dan diberi perlakuan seperti

pada produksi spora. Identifikasi mengacu pada Ou (1985). Sedangkan reisolat_1 yang berasal dari bercak hasil infeksi ras 173 asal padi dan reisolat_2 tidak diidentifikasi secara khusus. Morfologi *P. grisea* dari kedua reisolat tersebut tampak pada awal saat mengambil spora tunggal.

Analisis Molekular. Masing-masing isolat *P. grisea* yang akan dianalisis molekularnya dilakukan terhadap dua isolat asal spora tunggal yang berasal dari satu bercak yang sama. DNA genom cendawan diisolasi dari miselium yang ditumbuhkan dalam 25 ml medium cair (5 g/l sukrosa, 2 g/l ekstrak yeast, dan 2 g/l pepton) selama enam hari pada mesin penggoyang. Miselium dipanen dengan menyaringnya menggunakan kertas saring. Isolasi DNA mengikuti metode Raeder & Broda (1985) dengan sedikit modifikasi. Miselium digerus dalam mortar steril. Hasil gerusan disuspensikan dalam 4 ml larutan penyangga ekstrak (200 mM Tris HCl pH 8.5; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA; 0.5% SDS). Sebanyak 2.8 ml fenol dan 1.2 ml CIA (kloroform:isoamil alkohol = 24 : 1) ditambahkan ke dalam suspensi dan suspensi dibolak-balik secara perlahan. Suspensi disentrifugasi selama 30 menit pada 4 000 rpm dengan suhu 6 °C. Fase cairan bagian atas segera dipindahkan ke tabung baru dan dipresipitasi dengan menambahkan 1x volume isopropanol dingin. Hasil presipitasi disentrifugasi selama 20 menit pada 4 000 rpm dengan suhu 6 °C. Endapan dibilas dengan etanol dingin konsentrasi 70% dan disentrifugasi kembali selama 10 menit. Endapan dikeringkan dengan pompa vakum selama 15 menit, dan dilarutkan dalam 100 ul TE 1x (10 mM Tris HCl pH 8, 1 mmol EDTA), serta ditambahkan 0.2x volume RNase 20 mg/ml. Larutan diinkubasi semalam pada 37 °C, kemudian ditambahkan 900 ul TE 1x dan larutan diekstrak kembali dengan menambahkan 1x volume CIA, dan disentrifugasi selama 10 menit pada 4 000 rpm dengan suhu 6 °C. Cairan bagian atas dipresipitasikan kembali dengan menambahkan isopropanol dingin seperti tahapan sebelumnya.

DNA cendawan hasil isolasi akan diamplifikasi melalui PCR dengan menggunakan 3 jenis primer yang telah dikembangkan oleh Soubabere *et al.*, (2001), yaitu *Cut1*, *Pw12*, *Erg2*. Susunan nukleotida ketiga jenis primer sebagai berikut:

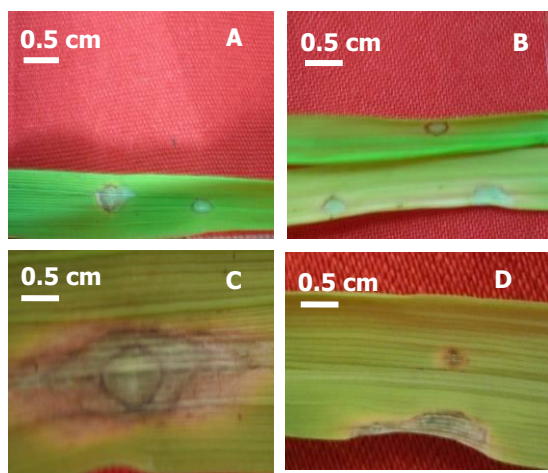
Cut1(F:5'TATAGCGTTGACCTTGTTGGA-3')
 Cut1(R:5-TATAGCATCTCAGACCGAACC-3')
 Pw12(F:5'-TCCGCCACTTTTCTCATTCC-3')
 Pw12(R: 5'-GCCCTCTTCTCGCTGTTTCC-3')
 Erg2 (F:5'-GCAGGGCTCATTCTTTTCTA-3')
 Erg2 (R:5'-CCGACTGGAAGGTTTCTTTA-3')

Total reaksi PCR sebanyak 20 ul, mengandung sekitar 100 ng DNA genom cetakan; 2 ul dari 10x

buffer reaksi PCR; 62.5 pmol dNTP, 0.3 pmol dari masing-masing primer, 0.2 unit enzim Taq DNA polymerase dalam larutan buffer 1 x (67 mM Tris HCl pH 8.8; 16 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0.01% Tween 20, dan 1.5 mM Mg Cl_2). Program PCR meliputi predenaturasi pada suhu 95 C selama 15 menit, dilanjutkan 35 siklus pada suhu 94 C selama 1 menit, suhu 60 C selama 45 detik, dan suhu 72 C selama 2 menit. Tahap akhir proses PCR pada suhu 72 C selama 15 menit. Produk PCR di visualisasi melalui elektroforesis pada gel agarosa 1% (w/v) dalam TAE 1x, dan dilanjutkan perendaman gel dalam 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ etidium bromida. Pengamatan dilakukan terhadap keberadaan pita DNA pada gel agarosa.

HASIL PEMBAHASAN

Kemampuan Infeksi ke-1. Hasil uji infeksi ke-1 di rumah kaca menunjukkan bahwa isolat *P. grisea* Dc4J1 asal rumput *D. ciliaris* mampu menginfeksi padi varietas Kencana Bali dan Cisokan (Gambar 1A dan 1B), namun tidak mampu menginfeksi padi varietas IR-64. Begitu juga sebagai pembandingan, *P. grisea* ras 173 yang berasal dari padi hanya mampu menginfeksi padi varietas Kencana Bali dan Cisokan (Gambar 1C dan 1D).

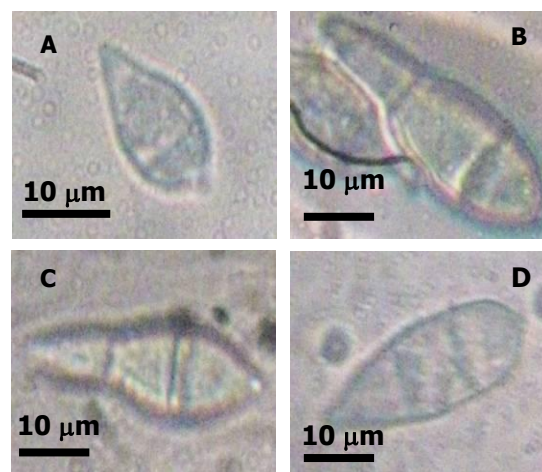


Gambar 1. Penampakan bercak blas di hari ke-9 setelah isolat *P. grisea* awal (Dc4J1) asal rumput *D. ciliaris* diinokulasikan pada daun padi galur kencana bali (A) dan cisokan (B), bercak blas di hari ke-7 setelah *P. grisea* ras 173 asal padi diinokulasikan pada daun padi galur (C dan D).

Identifikasi Hasil Reisolasi Spora.

Pengamatan mikroskopis terhadap spora reisolat_1 Dc4-kb [hasil reisolasi dari padi varietas Kencana Bali

yang diinokulasi dengan isolat *P. grisea* awal (Dc4J1)], maupun reisolat_1 Dc4-c [hasil reisolasi dari padi varietas Cisokan yang diinokulasi dengan isolat *P. grisea* awal (Dc4J1)], menunjukkan bentuk spora seperti morfologi spora dari isolat awal, hanya ukuran sporanya berbeda (Gambar 2). Bentuk spora adalah seperti buah pir dengan dua sekat, mempunyai apendik, dan berwarna hialin. Ukuran spora isolat *P. grisea* awal (Dc4J1) asal *D. ciliaris* adalah $(22.6 \times 9.4) \mu\text{m}$ (Gambar 2A), dan ukuran spora ras 173 asal padi adalah $(36.7 \times 8.9) \mu\text{m}$ (Gambar 2B). Ukuran spora reisolat_1 Dc4-kb dan Dc4-c berturut-turut adalah $(31.5 \times 9.9) \mu\text{m}$ (Gambar 2C) dan $(25.1 \times 8.1) \mu\text{m}$ (Gambar 2D).

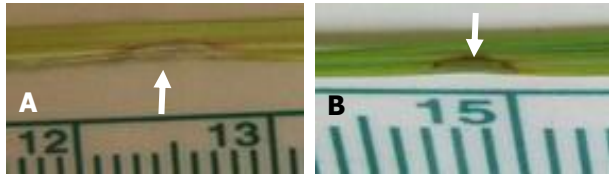


Gambar 2. Bentuk spora *P. grisea*: A. Isolat awal (Dc4J1) asal rumput *D. ciliaris*, B. ras 173 asal padi, C dan D. reisolat_1 Dc4-kb dan Dc4-c yang masing-masing berasal dari daun padi galur kencana bali dan cisokan yang diinokulasi dengan isolat awal yang diinokulasi dengan isolat awal (Dc4J1). bali (C, D), perbesaran 400 X.

Kemampuan infeksi ke-2. Hasil uji infeksi ke-2 menunjukkan, bahwa reisolat_1 Dc4-kb asal padi varietas Kencana Bali maupun reisolat_1 Dc4-c asal padi varietas Cisokan mampu menginfeksi padi varietas Kencana Bali dan Cisokan, berturut-turut tampak pada gambar 3 dan 4.

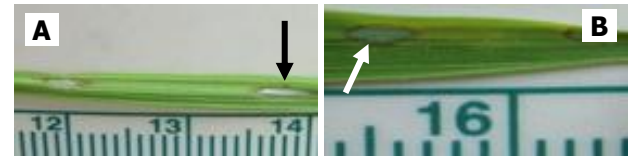
Analisis Molekular. Hasil amplifikasi genom dengan primer melalui PCR disajikan pada tabel 1 dan 2, dengan rincian sebagai berikut: marka molekular Cut1 hanya dimiliki oleh isolat *P. grisea* awal (Dc4J1) asal *D. ciliaris*. Marka molekular Cut1 berukuran sekitar 1700 pb (Gambar 5A.1). Sedangkan isolat yang menampakkan keberadaan marka molekular Pwl2 adalah semua reisolat_2 dan isolat pembandingan (ras 173 asal padi) maupun turunannya. Reisolat_2 merupakan reisolat turunan dari reisolat_1 yang

telah menginfeksi padi varietas Kencana Bali dan cisokan. Sedangkan reisolat_1 merupakan turunan isolat *P. grisea* awal (Dc4J1) asal *D. ciliaris* yang juga telah menginfeksi padi varietas Kencana Bali dan cisokan. Ukuran marka molekular Pwl2 sekitar 900 pb (Gambar 5C, hanya ditampilkan beberapa isolat). Semua isolat *P. grisea* sebelum dan sesudah berganti inang, baik pada spesies yang berbeda maupun sama, memiliki marka molekular Erg2 yang sama, yaitu berukuran sekitar 1400 pb (Gambar 5B, hanya ditampilkan beberapa isolat).



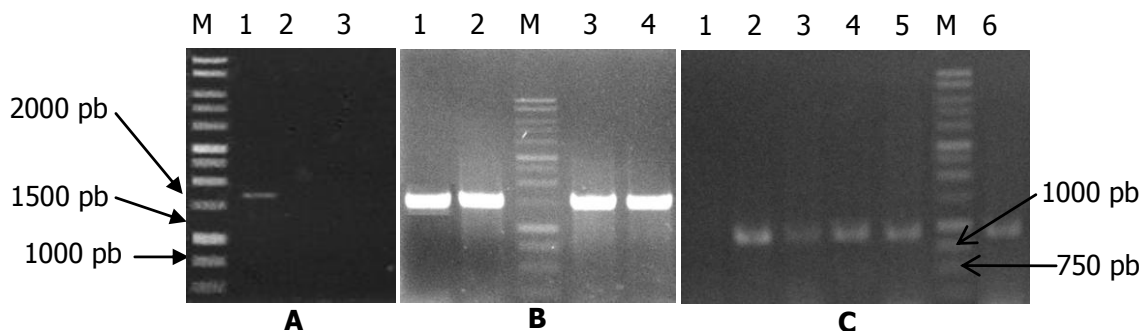
Gambar 3. Bercak blas daun padi galur kencana bali (A) dan cisokan (B) di hari ke 7 setelah diinokulasi dengan reisolat_1 *P. grisea* asal padi galur kencana bali (Dc4-kb). 1 skala =0.1 mm

Kemampuan Infeksi. Isolat *P. grisea* (Dc4J1) asal rumput *D. ciliaris* memiliki tingkat virulensi lebih rendah dibandingkan ras 173 asal padi. Hal tersebut tampak pada luasan bercak yang muncul pada daun (Gambar 1). Metode infeksi melalui injeksi suspensi spora tidak menunjukkan kemampuan apresorium suatu isolat (alat infeksi hasil perkecambahan spora) untuk menetrasi kutikula inang. Kutikula merupakan lapisan pertahanan awal inang. Sebaliknya yang terjadi di lapang, pada umumnya apresorium *P. grisea* harus mampu menetrasi bagian paling luar organ inang yang berupa lapisan kutikula.



Gambar 4. Bercak blas daun padi galur kencana bali (A) dan cisokan (B) di hari ke 7 setelah diinokulasi dengan reisolat_1 *P. grisea* asal padi galur cisokan (Dc4-c). 1 skala =0.1 mm.

Analisis molekular. Hasil analisis marka molekular terhadap isolat-isolat hasil pergantian spesies inang *P. grisea*, menunjukkan perubahan pada dua marka molekular SCAR, yaitu Cut1 dan Pwl2, namun tidak terjadi pada Erg2. Pergantian inang dalam spesies sama tidak menyebabkan perubahan marka molekularnya (bersifat stabil). Perubahan tersebut adalah pada genom isolat awal (Dc4J1) yang berinang rumput *D. ciliaris*, pada awalnya memiliki marka molekular Cut1. Setelah isolat tersebut menginfeksi padi, baik varietas bersifat rentan (Kencana Bali) ataupun moderat (Cisokan) terhadap penyakit blas, pada genomnya tidak teramplifikasi dengan primer yang sama. Sebaliknya, genom isolat awal (Dc4J1) yang tidak memiliki marka molekular Pwl2, namun memiliki marka Pwl2 setelah isolat tersebut menginfeksi padi yang rentan (Kencana Bali) ataupun moderat (Cisokan) terhadap penyakit blas. Sebagai data tambahan, perubahan juga terjadi pada tipe ras isolat. Hasil uji ras dari beberapa reisolat_1 ada yang menunjukkan peningkatan tipe ras.



Gambar 5. Marka molekular hasil amplifikasi melalui primer Cut1 (A), Erg2 (B), dan Pwl2 (C). M=marka standar 1 kb, 1. Isolat *P. grisea* awal (Dc4J1) asal *D. ciliaris*, 2 dan 3. reisolat_1 Dc4-kb dan Dc4-c yang masing-masing berasal dari padi galur kencana bali dan cisokan yang diinokulasi dengan isolat *P. grisea* awal (Dc4J1), 4. reisolat_2 Dc4-kb-kb [reisolat asal padi galur kencana bali yang diinokulasi dengan reisolat_1 Dc4-kb], 5. Dc4-c-c [reisolat asal padi galur cisokan yang diinokulasi dengan reisolat_1 Dc4-c], dan 6. ras 173 asal padi.

Tabel 1. Hasil infeksi *P. grisea* awal (Dc4J1) asal *D. ciliaris* dan ras 173 asal padi pada galur kencana bali, cisokan, dan varietas IR64, serta marka molekular isolat sebelum (Dc4J1) dan sesudah infeksi ke-1 (reisolat_1)

	<i>P. grisea</i> awal asal <i>D. ciliaris</i>	Uji infeksi isolat <i>P. grisea</i> awal (Dc4J1) asal <i>D. ciliaris</i> pada padi galur dan varietas			<i>P. grisea</i> asal padi	Uji infeksi <i>P. grisea</i> ras 173 asal padi pada padi galur dan varietas		
		kencana bali	cisokan	IR64		kencana bali	cisokan	IR64
Hasil infeksi		m	m	tm		m	m	tm
Jenis isolat	Dc4J1	Reisolat_1 (Dc4-kb)	Reisolat_1 (Dc4-c)		173	Reisolat_1 (173-kb)	Reisolat_1 (173-c)	
Marka molecular								
Cut1	+	-	-		-	-	-	
Pwl2	-	+	+		+	+	+	
Erg2	+	+	+		+	+	+	

Keterangan : m = muncul bercak, tm = tidak muncul bercak, + = memiliki penanda molekular (teramplifikasi dengan primer), - = tidak memiliki penanda (tidak teramplifikasi dengan primer)

Tabel 2. Hasil infeksi reisolat_1 *P. grisea* Dc4-kb dan Dc4-c pada padi galur kencana bali dan cisokan, serta marka molekular reisolat sesudah infeksi ke-1 (reisolat_1) dan sesudah infeksi ke-2 (reisolat_2)

	Reisolat <i>P. grisea</i> asal padi kenca bali	Uji infeksi reisolat_1 <i>P. grisea</i> (Dc4-kb) asal padi galur kencana bali pada padi galur		Reisolat <i>P. grisea</i> asal padi cisokan	Uji infeksi reisolat_1 <i>P. grisea</i> (Dc4-c) asal padi galur cisokan pada padi galur	
		kencana bali	cisokan		kencana bali	cisokan
Hasil infeksi		m	m		m	m
Jenis isolat	Reisolat_1Dc4-kb	Reisolat_2 Dc4-kb-kb	Reisolat_2 Dc4-kb-c	Reisolat_1Dc4-c	Reisolat_2 Dc4-c-kb	Reisolat_2 Dc4-c-c
Marka molecular						
Cut1	-	-	-	-	-	-
Pwl2	+	+	+	+	+	+
Erg2	+	+	+	+	+	+

Keterangan : m = muncul bercak, + = memiliki penanda molekular (teramplifikasi dengan primer), - = tidak memiliki penanda (tidak teramplifikasi dengan primer)

Perubahan yang dideteksi dalam penelitian ini bukan merupakan bagian dari gen yang penting bagi isolat-isolat *P. grisea*. Subkultur biakan yang berulang-ulang tidak menyebabkan perubahan terhadap marka molekular yang diamati pada penelitian ini (data tidak ditampilkan). Marka Cut1 merupakan bagian dari gen *cut1*, tetapi gen *cut1* tidak diperlukan untuk patogenitas (Sweigard *et al.*, 1992b), sehingga efek akibat perubahan tersebut tidak nyata, yaitu reisolat_1 masih mampu menginfeksi padi yang bersifat rentan ataupun moderat terhadap penyakit blas. Demikian pula perubahan terhadap marka Pwl2 yang merupakan bagian dari gen *pwl2*. Gen *pwl2* merupakan lokus yang tidak stabil (Kang *et al.*, 1995). Gen *pwl2* *P. grisea* merujuk pada patogenitasnya terhadap rumput *Eragrostis curvula*. Alel *pwl2*, yaitu *pwl2-2* yang merujuk nonpatogen (bersifat avirulene) terhadap rumput *E. curvula* secara genetika tidak stabil, sering tampak mutan patogen secara spontan (Sweigard *et al.*, 1995). Marka molekular Erg2 yang

merupakan bagian dari gen *erg2* bersifat stabil, karena merupakan bagian dari gen yang penting untuk sel. Gen *erg2* *M. grisea* menyandikan sterol Δ^8 Δ^7 isomerase (Keon *et al.*, 1994). Sterol merupakan komponen penting semua sel eukariot, dan berperan dalam stabilisasi membran pada kondisi stres, serta berhubungan dengan proses morfogenetik miselium pada kebanyakan cendawan patogen (Mysyakina dan Funtikova, 2007).

Ras *P. grisea* dibedakan antar isolat patogen berdasarkan kemampuan menginfeksi kultivar padi. Tipe ras reisolat_1 yang muncul di antaranya adalah ras *P. grisea* yang paling tinggi, yaitu mampu menginfeksi ke-7 padi diferensial yang digunakan dalam uji penentuan tipe ras. Hasil infeksi pada ke-7 padi diferensial tersebut menunjukkan skala bahwa padi-padi tersebut bersifat rentan (data tidak dipublikasi). Ke-7 padi varietas diferensial tersebut adalah asahan, cisokan, IR64, rapah aren, cisadane, cisanggarung, dan Kencana Bali yang biasa digunakan untuk penentuan ras blas di Indonesia

(Mogi *et al.*, 1991), Perubahan inang yang memicu timbul keragaman merupakan adaptasi yang diperlukan untuk menghadapi perubahan kondisi lingkungan, seperti genotipe inang. Jika terjadi peristiwa demikian, gulma disekitar pertanaman padi juga perlu mendapat perhatian. Walaupun uji patogenitas sering menghasilkan perkiraan yang lebih tinggi, karena dipengaruhi oleh beberapa parameter, seperti iklim, konsentrasi inokulum, dan keadaan sumber nitrogen tanah (Babujee dan Gnanamanickam 2000). Menurut Namai dan Iwadata (2002), bahwa hasil isolasi ulang (reisolasi) cendawan penyebab penyakit blas pada padi yang telah diinokulasikan ke inang padi yang resisten terhadap penyakit blas, ternyata tidak saja timbul variasi patogenitas, tetapi juga variasi keragaman genetiknya. Sedangkan menurut Borromeo *et al.*, (1993), walaupun populasi *Pyricularia* yang menginfeksi padi memiliki tetua yang sama tetapi populasi patogen yang menginfeksi rumput tidak memberikan inokulum ke padi di Filipina.

KESIMPULAN

P. grisea Dc4J1 asal rumput *D. ciliaris* memiliki kemampuan untuk berganti inang yang berupa padi varietas Kencana bali dan Cisokan. Begitu pula reisolat turunannya yang diperoleh dari bercak hasil infeksi terhadap kedua varietas padi tersebut, mampu menginfeksi kembali padi varietas Kencana Bali maupun cisokan. Pergantian spesies inang isolat *P. grisea* Dc4J1 asal rumput *D. ciliaris* dapat menimbulkan keragaman, khususnya perubahan marka molekular Cut1 dan Pw12. Perubahan marka molekular *P. grisea* akibat pergantian spesies inang bersifat stabil setelah *P. grisea* tersebut diinfeksi kembali pada inang dalam spesies yang sama.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan pada Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (LPPM) IPB yang telah memberikan dana bantuan pada penelitian ini dengan SPK/Kontrak Nomor 08/13.24.4/SPK/BG/2008, Tanggal 02 Juni 2008, atas nama Sri Listiyowati. Ucapan terima kasih juga disampaikan pada Ika Madona Pandia yang telah banyak membantu pelaksanaan penelitian ini, dan kepala Pusat Penelitian Sumber Daya Hayati dan Bioteknologi IPB yang telah memberikan fasilitas penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Babujee, L., Gnanamanickam, S.S. 2000. Molecular tools for characterization of rice blast pathogen (*Magnaporthe grisea*) population and molecular marker-assisted breeding for disease resistance. *Current Science* 78: 248-257.
- Borromeo, E.S., Nelson, R., Bonman, J.M., Leuang, H. 1993. Genetic differentiation among isolates of *Pyricularia* infecting rice and weed host. *Phytopathology* 83:393-399.
- Chao, C.T., Ellingboe, A.H. 1997. Genetic analysis of avirulence/virulence of on isolate of *Magnaporthe grisea* from a rice field in Texas. *Phytopathol* 87:71-76.
- Kahmann, R.C., Basse. 1997. Signaling and development in pathogenic fungi-new strategies for plant protection. *Trends in Plant Science* 2: 366-367.
- Kang, S., Sweigard, J.A., Valent, B. 1995. The pwl host specificity gene family in the blast fungus *Magnaporthe grisea* (abstrak). *Mol Plant Microbe Interact* 8:939-948.
- Keon, *et al.*, 1994. Isolation of the *ERG2* gene, encoding sterol Δ^8 Δ^7 isomerase, from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* and its expression in the maize smut pathogen *Ustilago maydis*. *Curr Genet* 25:531-537.
- Kerjasama Teknis Indonesia-Jepang Bidang Perlindungan Tanaman Pangan (ATA-162). 1992. Penyakit Padi: Laporan Akhir, Tulisan Ilmiah. Jakarta: Direktorat Bina Perlindungan Tanaman, Deptan.
- Kurnianingsih, R. 2008. Ekspresi gen PR1 dan PB21 yang terlibat dalam sistem toleransi tanaman padi *indica* terhadap penyakit blas (isolat 173) [tesis]. Bogor: Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Mogi, Shizuo, Zaenuddin, S., Wibowo, B.S., Ros, E., Irwan, C. 1991. Establishment of the differential variety series for pathogenic race identification of rice blast fungus and the distribution of race based on the new differentials in Indonesia. Jatisari: Rice Disease Study Group, Deptan.
- Moore-Landecker, E. 1996. *Fundamental of Fungi*. 4th edition. New Jersey: Prentice Hall, Upper saddle River.
- Mysyakina, S., Funtikova, N.S. 2007. The role of sterols in morphogenetic processes and

- dimorphism in fungi (abstrak). *Microbiology* 76: 1-13.
- Namai, T., and Iwade, Y. 2002. Rice blast fungus induced its pathogenic variation and its gene diversity during proliferation on the resistant rice cultivars (abstract). Di dalam: *Abstracts 3rd International Rice Blast Conference*, Ibaraki, 11-14 Sept 2002. Japan: Tsukuba International Congress Center-Epochal Tsukuba-Tsukuba Science City. hlm 15. abstr no 28.
- Ou, S.H. 1985. *Rice diseases*. 2nded. England: Commonwealth Mycological Institut, CAB.
- Raeder, U., Broda, P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology* 1:17-20.
- Shen *et al.*, 2002. Distribution of the mating type alleles and female fertility in Chinese *Magnaporthe grisea* populations pathogenic on rice (abstract). Di dalam: *Abstracts 3rd International Rice Blast Conference*. Ibaraki, 11-14 Sept 2002. Japan: Tsukuba International Congress Center-Epochal Tsukuba-Tsukuba Science City. hlm 58. abstr no 104.
- Singh, N.I., Singh, K.U. 1988. Unrecorded weed host for *Pyricularia oryzae* Cav. In India. *International Rice Research Newsletter* 13:31-32.
- Soubabere, Q., Jorge, V., Notteghem, J.L., Lebrun, M.H., Tharreau, D. 2001. Sequence characterized amplified region marker for the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Molecular Ecology Notes* 1:000-000. Blackwell Science, Ltd. 3p.
- Sweigard, J.A., Carrol, A.M., Kang, S., Farrall, L., Chumley, F.G., Valent, B. 1995. Identification, cloning, and characterization of *pw2*, a gene for host species-specificity in the rice blast fungus. *Plant Cell* 7:1221-1233
- Sweigard, J.A., Chumley, F.G., Valent, B. 1992a. Cloning and analysis of *cut1*, a cutinase gene from *Magnaporthe grisea* (abstrak). *Mol Gen Genet* 232: 174-182.
- Sweigard, J.A., Chumley, F.G., Valent, B. 1992b. Disruption of a *Magnaporthe grisea* cutinase gene (abstrak). *Mol Gen Genet* 232: 183-190.