



Asosiasi antara marka SSR dengan ketahanan terhadap wereng batang coklat pada varietas dan calon galur harapan padi

Association between SSR markers and brown planthopper resistance in rice varieties and promising lines

Chaerani^{1*}, Dwinita W. Utami¹, Nurul Hidayatun¹, Buang Abdullah², Bambang Suprihatno²

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

²Balai Penelitian Padi
 Jalan Raya 9, Subang 41256

(diterima Juli 2013, disetujui Desember 2013)

ABSTRAK

Perakitan varietas padi tahan wereng batang coklat (WBC, *Nilaparvata lugens* Stål.) perlu diupayakan secara kontinyu untuk mengatasi perubahan genetik WBC yang terjadi secara spasial dan temporal menjadi biotipe yang lebih ganas. Tersedianya marka molekuler yang terpaut erat dengan ketahanan terhadap WBC dapat mempercepat proses seleksi pada populasi persilangan. Marka yang terpaut erat dengan sebuah karakter fenotipe tertentu dapat diidentifikasi dengan cara mengasosiasikan sejumlah marka dengan karakter fenotipik pada individu-individu yang tidak berkerabat sebagai alternatif dari metode tradisional menggunakan analisis pautan yang memerlukan populasi persilangan. Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi marka *simple sequence repeat* (SSR) padi yang berasosiasi dengan ketahanan terhadap WBC. Sebanyak 44 varietas dan calon galur harapan yang telah diketahui tingkat ketahanannya terhadap WBC biotipe 3 dianalisis menggunakan 30 marka SSR yang tersebar di delapan kromosom padi. Uji asosiasi antara marka SSR dengan ketahanan terhadap WBC mendapatkan delapan marka SSR (RM17, RM38, RM125, RM144, RM250, RM287, RM328, dan RM536) yang berasosiasi signifikan dengan ketahanan WBC ($R^2=0,18$ sampai 0,89; $P<0,05$). Dua puluh satu varietas dan 11 calon galur harapan terdeteksi mengandung alel-alel SSR yang berasosiasi dengan ketahanan WBC biotipe 3. Marka RM17 terdeteksi pada 15 varietas dan 11 calon galur harapan yang dikategorikan tahan dan agak tahan sehingga berpotensi digunakan sebagai marka diagnostik awal untuk mendeteksi alel-alel ketahanan terhadap WBC. Untuk mendapatkan marka SSR yang dapat digunakan sebagai alat seleksi ketahanan WBC yang terpercaya, perlu dilakukan analisis lanjutan pada populasi yang bersegregasi untuk kedelapan marka tersebut dan uji asosiasi lebih banyak marka SSR yang tersebar luas pada kromosom padi.

Kata kunci: ketahanan, padi, SSR, wereng batang coklat

ABSTRACT

Development of resistant rice varieties to brown planthopper (BPH, *Nilaparvata lugens* Stål) must be continuously conducted to overcome the spatial and temporal genetic change in BPH into more virulent ones which can adapt to resistance rice. The availability of linked molecular markers with BPH resistant trait can speed up selection of hybridization progenies. Close-linked markers

*Penulis korespondensi: Chaerani. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jalan Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111
 Tel: 0251-833795, Faks: 0251-8338820, Email: chaeran1@yahoo.com

with trait of interest can be identified using association studies between markers and phenotypic data of unrelated individuals without the need to generate hybridization progenies as an alternative method to linkage studies which use mapping population. The objective of this study was to analyze the association of rice simple sequence repeat (SSR) markers with resistance to BPH. Forty-four rice varieties and promising lines with known resistance degree to BPH biotype 3 were assessed using 30 rice microsatellite markers previously mapped in the rice chromosomal regions with effects on resistance to BPH. Association test between SSR markers and BPH resistance scores revealed eight markers (RM17, RM38, RM125, RM144, RM250, RM287, RM328, dan RM536) which were significantly associated with BPH resistance ($R^2=0,18$ to $0,89$; $P<0,05$). Twenty-one varieties and 11 promising lines were detected to contain SSR alleles that were associated with BPH resistance. Marker RM17 was detected in 15 varieties and 11 promising lines which were scored as resistant and moderately resistant to BPH and therefore it is potentially the most useful as early diagnostic marker to detect BPH resistance alleles. Nevertheless, to obtain SSRs that can be used as reliable selection markers for BPH resistance, marker analysis in segregating populations for the eight markers is still needed as well as association test of more SSR markers widely distributed in rice chromosomes.

Key words: brown planthopper, resistance, rice, SSR

PENDAHULUAN

Wereng batang coklat (WBC), *Nilaparvata lugens* Stål. (Homoptera: Delphacidae) adalah serangga hama tipe penusuk-penghisap utama padi di Indonesia (Baehaki 2011). Serangan WBC dalam populasi tinggi dapat menyebabkan tanaman kering dan mati (*hopper burn*). Luas serangan WBC cenderung meningkat seiring dengan penanaman varietas padi berdaya hasil tinggi tetapi rentan WBC. Di tahun 2011, luas serangan WBC hampir dua kali lipat dari serangan pada tahun 2010, mencapai 173.890 ha dengan 22.613 ha diantaranya mengalami puso (PTP2011).

Penanaman varietas tahan merupakan strategi pengendalian WBC yang paling efektif, ekonomis, dan ramah lingkungan sehingga menjadi komponen penting program pengendalian hama terpadu (Bahagiawati 2012). Akan tetapi, ketahanan yang dikendalikan oleh gen-gen tunggal mayor tidak berlangsung lama karena timbulnya populasi WBC (biotipe) yang lebih virulen (Cohen et al. 1997). Di Indonesia, WBC biotipe 1, 2, dan 3 berturut-turut muncul setelah penanaman varietas Pelita I/1 (tanpa gen ketahanan terhadap WBC), varietas IR26 (memiliki gen ketahanan *Bph1*), dan IR42 (memiliki gen ketahanan *Bph2*) (Baehaki & Munawar 2008). Penanaman varietas IR64 dan turunannya seperti Ciherang mampu mengatasi serangan WBC biotipe 3 di lapangan dalam waktu lama hingga terdeteksinya biotipe 4 di Sumatera Utara pada tahun 2006 (Baehaki & Munawar 2008). WBC yang diidentifikasi di Jawa dan

Sumatera Selatan adalah biotipe 3, di Sulawesi Selatan campuran biotipe 2 dan 3, sedangkan di Sumatera Utara campuran biotipe 2, 3, dan 4; namun yang paling dominan di lapangan adalah biotipe 3 sehingga biotipe 3 digunakan dalam pengujian ketahanan galur-galur padi (Baehaki & Munawar 2008; Effendi & Munawar 2013).

Selain gen-gen mayor, terdapat lokus-lokus sifat kuantitatif (*quantitative trait locus*, [QTL]) yang tersebar pada 12 kromosom padi yang memberikan ketahanan terhadap WBC (Xu et al. 2002). Masing-masing lokus kuantitatif ini memberikan efek kecil terhadap ketahanan terhadap WBC tetapi gabungan beberapa lokus berkontribusi membentuk sifat ketahanan moderat dan dapat bertahan lama di lapangan dibandingkan dengan gen-gen mayor tunggal (Xu et al. 2002, Kazushige et al. 2003). Efek gabungan dari QTL menyulitkan WBC untuk mengatasi produk dari tiap lokus kuantitatif tersebut. Ketahanan IR64 dapat bertahan lama di lapangan karena selain mengandung gen mayor *Bph1*, varietas ini juga mengandung gen-gen minor dan QTL sehingga mampu memperlambat perubahan biotipe 3 ke arah yang lebih ganas (Cohen et al. 1997).

Gen-gen dan QTL ketahanan terhadap WBC pada umumnya diidentifikasi pada stadia tanaman muda (berumur 5-14 hari) dan tanaman lebih dewasa (berumur >1 bulan) sehingga mekanisme ketahanan yang dideteksi adalah *antixenosis* (*non-preference*) dan antibiosis (gangguan terhadap proses metabolisme) (Soundararajan et al. 2005). Gen *Bph14* telah diklon dan diketahui mengkode protein

bermotif CC-NB-LRR (*coiled-coil, nucleotide-binding, and leucine-rich repeat*) (Du et al. 2009). *Bph14* diekspresikan di jaringan vaskuler tanaman dan mengaktifkan jalur lintas pensinyalan *salicylic acid*, menginduksi deposisi kalus dalam sel-sel floem, dan menghasilkan inhibitor *trypsin*, sehingga menurunkan laju pertumbuhan dan lama hidup WBC (Du et al. 2009).

Karena perubahan biotipe WBC ke arah yang lebih ganas merupakan ancaman kontinyu terhadap peningkatan produksi padi, maka introduksi gen-gen ketahanan baru terhadap WBC dari berbagai donor ke dalam padi untuk mendapatkan varietas dengan produksi dan kualitas hasil beras tinggi serta tahan WBC terus dilakukan. Tersedianya marka molekuler yang terpaut erat dengan gen-gen ketahanan terhadap WBC akan sangat membantu kegiatan pemuliaan karena marka molekuler memungkinkan dilakukannya seleksi turunan persilangan berdasarkan genotipe dibandingkan seleksi berdasarkan fenotipe ketahanan (Su et al. 2006).

Metode alternatif untuk mencari marka molekuler yang terkait dengan sifat (*trait*) yang diminati tanpa melalui pemetaan marka molekuler pada populasi persilangan (*linkage mapping*) adalah melalui metode pemetaan asosiasi (*association mapping*). Pada metode ini marka diidentifikasi berdasarkan kekuatan asosiasinya dengan fenotipe tertentu pada sebuah populasi yang terdiri dari individu-individu yang “tidak berkerabat” dari sebuah populasi umum dengan sebuah karakter fenotipe yang serupa (Pritchard et al. 2000; Aranzana et al. 2005). Diasumsikan bahwa individu-individu yang tidak berkerabat dapat mirip secara fenotipik karena memiliki alel-alel yang dikelilingi oleh haplotipe marka yang diwariskan dari nenek moyang. Alel-alel ini diidentifikasi dengan pemindaian menggunakan sejumlah marka yang tersebar dalam genom (*genome-wide scan*) (Aranzana et al. 2005).

Di antara sejumlah marka molekuler, marka mikrosatelit atau *simple sequence repeats* (SSR) memiliki banyak kelebihan, antara lain tersebar luas dalam genom padi, mempunyai variasi alelik yang tinggi, mudah dianalisis menggunakan teknik *polymerase chain reaction* (PCR), dan memiliki kemampuan untuk diulang (reproduktibilitas) yang tinggi (McCouch et al. 2002). Ribuan marka SSR

padi telah dikembangkan dan dipetakan lokasinya pada kromosom padi sehingga menjadi rujukan untuk pemetaan gen dan QTL terkait sifat-sifat penting pada padi (<http://www.gramene.org/resources/>). Peta rujukan marka SSR ini dapat dimanfaatkan untuk mencari SSR putatif terkait dengan sifat ketahanan terhadap WBC dengan jalan mensejajarkannya dengan peta-peta (*map alignment*) marka *restriction fragment length polymorphism* (RFLP), *random amplified polymorphism DNA* (RAPD), dan *amplified fragment length polymorphism* (AFLP), pada mana banyak gen dan QTL ketahanan terhadap WBC telah dipetakan (<http://www.gramene.org/resources/>).

Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi marka-marka SSR yang terpaut dengan gen dan QTL ketahanan terhadap WBC pada varietas-varietas unggul nasional, introduksi, dan calon galur harapan melalui uji asosiasi.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan tempat penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Terpadu dan Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian dari bulan Agustus 2007 sampai dengan Oktober 2008.

Bahan tanaman dan isolasi DNA

Sebanyak 33 aksesori padi dengan skor ketahanan 1 dan 3 dari hasil skrining massal dan *population build-up* terhadap WBC biotipe 3 (Effendi & Munawar 2013, B. Suprihatno & B. Abdullah, data tidak dipublikasikan) dianalisis dengan marka SSR. Aksesori-aksesori tersebut terdiri dari 11 varietas unggul nasional, sembilan varietas introduksi, satu spesies kerabat liar padi (*Oryza australiensis*) serta 12 calon galur harapan (Tabel 1). Sepuluh benih dari setiap varietas atau calon galur harapan ditanam dalam bak-bak plastik. Tanaman dipelihara hingga umur 4–6 minggu. DNA diisolasi dari daun-daun muda yang diperoleh dari 10 tanaman menggunakan bufer ekstraksi *sodium dodecyl sulfate* (SDS) dalam skala miniprep mengikuti prosedur dari Lab Terpadu Litbang (2006). DNA dilarutkan dalam bufer TE (pH 8,0)

kemudian kualitas dan kuantitasnya diperiksa pada gel agarose 0,8–1% setelah perendaman gel dalam larutan etidium bromida. DNA divisualisasi menggunakan alat dokumentasi ChemiDoc XRS (Bio-Rad).

Primer mikrosatelit dan amplifikasi DNA

Tiga puluh marka SSR (Tabel 2) dipilih yang berada pada segmen kromosom mengandung gen dan QTL pengendali ketahanan terhadap WBC berdasarkan penyejajaran peta marka *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) dengan peta marka SSR (<http://www.gramene.org/resources/>). DNA tiap aksesori di amplifikasi secara terpisah untuk tiap pasang primer dalam volume

reaksi 20 µl pada mesin PCR (Biometra T1) menggunakan prosedur seperti yang diuraikan dalam Schuelke (2000) dan Chaerani et al. (2009).

Deteksi fragmen SSR

Produk PCR dari setiap primer diencerkan dalam *sample loading solution* (SLS, Beckman Coulter) kemudian dicampurkan dalam satu set panel *multiloading* bersama dengan produk PCR dari tiga sampai tujuh primer lainnya (Tabel 2). Perbandingan campuran antar produk PCR dan prosedur deteksi SSR pada *genetic analyzer* (CEQ8000 Beckman Coulter) dilakukan seperti yang diterangkan dalam Chaerani et al. (2009) (Tabel 3).

Tabel 1. Daftar 33 aksesori padi tahan wereng batang coklat (WBC) biotipe 3 yang dianalisis dengan 30 penanda SSR telit

No. Aksesori	Aksesori dan gen ketahanan terhadap WBC	Kelompok	Skor ketahanan terhadap WBC biotipe 3*
6661	Batang Lembang	Var. unggul	3
6265	Batang Piaman	Var. unggul	3
1427	Bondoyudo	Var. unggul	3
1115	Celebes 1	Var. unggul	3
1719	Ciapus	Var. unggul	3
1432	Cigeulis	Var. unggul	3
453	Digul	Var. unggul	3
1205	Gilirang	Var. unggul	3
789	Kelara	Var. unggul	3
4542	Memberamo	Var. unggul	3
1193	Way Apo Buru	Var. unggul	3
829	Widas	Var. unggul	3
1530	ARC10550 (bph5)	Var. introduksi	1
1543	Babawee (bph4)	Var. introduksi	1
-	H27	Var. introduksi	3
1880	Mudgo (Bph1)	Var. introduksi	1
681	Pokkali (Bph9)	Var. introduksi	3
1526	PTB33 (bph2 dan Bph3)	Var. introduksi	1
1546	Rathu Heenati (Bph3)	Var. introduksi	1
1506	Swarnalata (Bph6)	Var. introduksi	1
00048	Oryza australiensis (Bph18)	Kerabat liar padi	1
-	BP2870-4e-Kn-22-2-1-5*B	Calon galur harapan	3
-	BP3244-2e-8-3-2-3*B	Calon galur harapan	3
-	BP3684-2e-10-1-3*B	Calon galur harapan	3
-	BP4124-1f-3-3*B	Calon galur harapan	3
-	BP4124-1f-4-2-2*B	Calon galur harapan	3
-	BP4124-2f-6-1-2*B	Calon galur harapan	3
-	BP4130-1f-3-3-2*B	Calon galur harapan	3
-	BP4188-7f-1-2-2*B	Calon galur harapan	3
-	BP4198-4f-2-1-2*B	Calon galur harapan	3
-	BP4200-2f-3-2-2*B	Calon galur harapan	3
-	BP4556-1f-12-2*B	Calon galur harapan	3
-	BPT164c-68-7-3-1	Calon galur harapan	3

*0: sangat tahan; 1: tahan; 3: agak tahan; 5: agak rentan; 7=rentan; 9: sangat rentan; SU: koloni Sumatera Utara

Tabel 2. Sekuen primer dan set panel multiloading produk PCR untuk amplifikasi marka SSR padi

Marka SSR	Kromosom	Primer forward (5' ke 3')*	Primer reverse (5' ke 3')	Label fluoresen	Panel multi-loading	Ukuran alel (pb)	Reaksi PCR**	Program PCR#	µl produk PCR§
RM5	1	TGCAACTTCTAGCTGCTCGA	GCATCCGATCTTGATGGG	D2 (hitam)	1	110–114	1	A	0,7
RM17	12	TGTA AAAACGACGGCCAGTTGCCCTGT-TAITTTCTTCTCTC	GGTGATCCTTTCCCAITTTCA	D2 (hitam)	1	178–208	2	B	0,7
RM182	7	TGTA AAAACGACGGCCAGTTGGGATGCA-GAGTGCAGTTGGC	CGCAGGCACGGTGCCCTTG-TAAG	D2 (hitam)	1	338–401	2	B	0,7
RM401	4	TGTA AAAACGACGGCCAGTTGGAACAGA-TAGGGTGTAAGG	CCGTTCAACAACACTATACAAGC	D2 (hitam)	1	239–288	2	B	0,7
RM38	8	TGTA AAAACGACGGCCAGTAC-GAGCTCTCGATCAGCCTA	TCGGTCTCCATGTGCCAC	D3 (hijau)	1	239–253	2	B	0,3
RM223	8	TGTA AAAACGACGGCCAGTGAGT-GAGCTTGGGCTGAAAC	GAAGGCAAGTCTTGAGACTG	D3 (hijau)	1	169–182	2	B	0,3
RM111	6	TGTA AAAACGACGGCCAGTCAACAAC-CTTTGAGCACCCGGTTC	ACGCCGTGACGCTTGATCACCCGG	D4 (biru)	1	124–137	2	B	0,2
RM596	10	TGTA AAAACGACGGCCAGTATCTACACG-GACGAATTGCC	AGAAAGCTTCAGCCCTCTGCAG	D4 (biru)	1	124–320	2	B	0,2
RM317	4	TGTA AAAACGACGGCCAGTCACTTAC-CAGTTCACCCGC	CTGGAGAGTGTCAAGTATTGA	D2 (hitam)	2	154–174	2	A	0,7
RM475	2	TGTA AAAACGACGGCCAGTCCCTCAC-GAITTTCCCTCCAAC	ACGGTGGGATTAGACTGTGC	D2 (hitam)	2	189–205	2	A	0,5
RM209	11	TGTA AAAACGACGGCCAGTATATGAGTT-GCTGTGCTGGC	CAACTTGCATCCTCCCTCC	D3 (hijau)	2	135–169	2	A	0,3
RM328	9	TGTA AAAACGACGGCCAGTCAATAGT-GAGTATGCAGCTGC	CCTTCTCCAGTGTGATCTG	D3 (hijau)	2	197–199	2	A	0,3
RM517	3	TGTA AAAACGACGGCCAGTGGCTTACTG-GCTTCGATTTG	CGTCTCCTTTGGTTAGTGCC	D3 (hijau)	2	141–148	2	A	0,5
RM261	4	TGTA AAAACGACGGCCAGTCTACTTCTCC-CCTTGTGTGG	TGTACCATCGCCAAATCTCC	D4 (biru)	2	203–233	2	A	0,2
RM414	1	TGTA AAAACGACGGCCAGTATATGACGT-CATGCAGCAGTTC	ATAICTCCAATGTGGCAGGG	D4 (biru)	2	189–219	2	A	0,2

Tabel 2. Lanjutan

Marka SSR	Kromosom	Primer forward (5' ke 3')*	Primer reverse (5' ke 3')	Label fluoresen	Panel multi-loading	Ukuran alel (pb)	Reaksi PCR**	Program PCR#	µl produk PCR§
RM463	12	TGTAAAACGACGGCCAGTTTCCCCCTC- CTTTTATGGTGC	TGTTCTCCTCAGTCACTGCGG	D4 (biru)	2	273–291	2	A	0,2
RM125	7	ATCAGCAGCCATGGCAGCGACC	AGGGGATCATGTGCCGAAGGCC	D2 (hitam)	3	101–188	1	A	0,7
RM484	10	TCTCCCTCCTCACCAATTGTC	TGCTGCCCTCTCTCTCTCTC	D3 (hijau)	3	120–296	1	A	0,3
RM277	12	CGGTCAAATCATCACCCTGAC	CAAGGCTTGCAAGGGAAG	D4 (biru)	3	121–135	1	A	0,2
RM536	11	TCTCTCCTCTTGTGGTCTC	ACACACCAACACGACCCACAC	D4 (biru)	3	224–378	1	A	0,2
RM133	6	TTGGATTGTTTGGCTGGCTGCG	GGAACACGGGGTTCGGAAAGCGAC	D2 (hitam)	4	116–326	1	A	0,5
RM161	5	AAACTGTTTTACCCCTGGCC	ATCCCTTCTGCGGTAAAC	D2 (hitam)	4	108–208	1	A	0,5
RM124	4	ATCGTCTGCGTTGCGGCTGCTG	CATGGATCACCGAGCTCCCCC	D3 (hijau)	4	225–328	1	A	0,5
RM274	5	TGTAAAACGACGGCCAGTCCCTCGCTTAT- GAGAGCTTCCG	CTTCTCCATCACTCCCATGG	D3 (hijau)	4	146–213	2	B	0,3
RM287	11	TTCCCTGTTAAGAGAGAAATC	GTGTAITTTGGTGAAAGCAAC	D3 (hijau)	4	93–121	1	A	0,3
RM250	2	GGTTCAAACCAAGCTGATCA	GATGAAGGCCTTCCACGCAG	D4 (biru)	4	109–168	1	A	0,2
RM214	7	CTGATGATAGAAAACCTCTTCTC	AAGAACAGCTGACTTCACAA	D2 (hitam)	5	115–181	1	A	0,8
RM11	7	TCTCCTCTTCCCCCGATC	ATAGCGGGCGAGGCTTAG	D3 (hijau)	5	124–150	1	A	0,7
RM144	11	TGCCCTGGCGCAAATTTGATCC	GCTAGAGGAGATCAGATGGTAGT- GCATG	D3 (hijau)	5	217–243	1	A	0,7
RM215	9	CAAAATGGAGCAGCAAAGAGC	TGAGCACCTCTCTCTGTAG	D4 (biru)	5	106–151	1	A	0,2

*TGT AAA ACG GCC AGT = sekuen tambahan dari primer universal M-13 berlabel fluoresens; primer tanpa tambahan sekuen primer M-13 sudah berlabel fluoresens.

**1 = 1 × buffer PCR+MgCl₂; 0,30 mM dNTP; 0,75 mM MgCl₂; 0,30 µM primer forward; 0,30 µM primer reverse; 0,75 U TaqPolimerase, dan 20 ng DNA; 2 = 1 × buffer PCR+MgCl₂; 0,30 mM dNTP; 1 mM MgCl₂; 0,10 µM primer forward; 0,40 µM primer reverse; 0,40 µM primer M-13 berlabel fluoresen; 0,75 U TaqPolimerase (FastStart dan Vivantis), dan 20 ng DNA; primer dan dNTP dibeli dari Invitrogen.

#A = touchdown PCR: 4 menit denaturasi pada suhu 95°C diikuti dengan 13 siklus tahapan yang terdiri dari 45 detik denaturasi pada suhu 95°C, 45 detik annealing (penempelan primer) pada suhu 61,5°C; 30 detik elongation (perpanjangan basa) pada suhu 72°C dengan penurunan suhu 0,5°C per siklusnya; diikuti dengan 27 siklus tahapan yang terdiri dari 45 detik denaturasi pada suhu 95°C; 45 detik annealing (penempelan primer) pada suhu 55°C; 30 detik elongation pada suhu 72°C; diakhiri dengan satu siklus final elongation (perpanjangan akhir) pada suhu 72°C selama 5 menit (Lab Terpadu Litbang 2006); B = 5 menit denaturasi pada suhu 94°C diikuti dengan 30 siklus tahapan yang terdiri dari 30 detik denaturasi pada suhu 94°C; 45 detik penempelan primer pada suhu 55°C; 45 detik perpanjangan basa pada suhu 72°C; diikuti dengan 8 siklus tahapan yang terdiri dari 30 detik denaturasi pada suhu 94°C; 45 detik penempelan primer pada suhu 55°C; 45 detik perpanjangan basa pada suhu 72°C; dan diakhiri dengan satu siklus perpanjangan akhir pada suhu 72°C selama 10 menit (Schuelke 2000).

§Volume ekuivalen; produk PCR diencerkan terlebih dahulu dalam ddH₂O dengan perbandingan 1 : 5 kemudian dari pengenceran ini diambil sejumlah volume untuk diencerkan dalam SLS dengan perbandingan 1 : 6.

Analisis data

Data berat molekul alel SSR diskor sebagai '0' (tidak ada alel), '1' (alel homosis) dan '2' (alel heterosis). Ukuran alel dibulatkan ke bilangan bulat terdekat kemudian diolah dengan CEQ *Fragment Analysis Software* untuk pengelompokan (*binning*) berdasarkan motif pengulangan SSR. Asosiasi antara lokus SSR dengan skor ketahanan terhadap WBC (*association test*) dianalisis menggunakan prosedur *general linear model* (GLM) dari program Tassel 3.0 (www.maizegenetics.net/tassel). Lokus dan alel SSR dengan nilai *P* marka yang signifikan pada taraf 5% ($P < 0,05$) diasumsikan berasosiasi dengan ketahanan terhadap WBC.

HASIL

Uji asosiasi (*association test*) antara data marka SSR dengan data skor ketahanan padi terhadap WBC menunjukkan bahwa delapan SSR berasosiasi signifikan ($P < 0,05$) dengan ketahanan terhadap WBC biotipe 3 dengan nilai R^2 dari 0,126 sampai 0,497 (Tabel 3). Kedelapan SSR tersebut berada pada tujuh kromosom. Tujuh marka SSR, yaitu RM250 (kromosom 2), RM124 (kromosom 4), RM125 (kromosom 7), RM38 (kromosom 8), RM328 (kromosom 9), serta RM209 dan RM287 (kromosom 11), masing-masing memiliki satu alel yang berasosiasi dengan ketahanan terhadap WBC. Sementara itu marka RM17 pada kromosom 12 memiliki dua alel (179 dan 206 pasang basa [pb]) yang berasosiasi dengan ketahanan terhadap WBC biotipe 3.

Secara keseluruhan terdapat 28 aksesori padi yang terdiri dari masing-masing delapan varietas unggul nasional dan introduksi, satu spesies, serta 11 calon galur harapan yang terdeteksi mengandung marka SSR yang berasosiasi signifikan dengan ketahanan terhadap WBC biotipe 3 (Tabel 3). Varietas Digul memiliki jumlah marka SSR terbanyak (5) yang berasosiasi signifikan dengan ketahanan terhadap WBC, yaitu RM17, RM124, RM125, RM250, dan RM328; sedangkan varietas lainnya mengandung satu sampai tiga marka SSR.

PEMBAHASAN

Berdasarkan penjejakan peta marka SSR dengan peta RFLP (<http://www.gramene.org/resources/>), pada mana gen-gen dan QTL pengendali ketahanan terhadap WBC diidentifikasi, marka RM17, RM38 dan RM125 terpetakan pada daerah QTL; RM209 dan RM287 berada di segmen kromosom mengandung gen *Bph18*, RM250 dan RM328 berturut-turut berada dalam lokasi gen *Bph13* dan *Bph11*; sedangkan RM124 berada di daerah QTL dan *Bph15*. Di antara kedelapan marka tersebut, RM17 dianggap paling potensial sebagai marka diagnostik awal untuk mengetahui calon galur harapan yang terindikasi tahan terhadap WBC biotipe 3, karena: 1) lokasinya yang berada pada daerah QTL yang juga berdekatan dengan gen pengendali ketahanan terhadap WBC, yaitu gen *Bph10* dan *Bph19(t)* (Lang & Buu 2003; Li et al. 2010) diduga dapat memberikan kemampuan membedakan ketahanan dengan lebih baik dibandingkan marka lainnya; 2) memiliki dua alel yang berasosiasi dengan ketahanan terhadap WBC, dan 3) terdeteksi pada sebagian besar aksesori, yaitu 14 varietas, satu spesies (*O. australiensis*), serta 10 calon galur harapan. Marka RM17 berjarak hanya 16,7 cM dari gen *Bph19(t)* pada kromosom 12 dari hasil pemetaan pada populasi persilangan TN1×galur no. 2183 (Li et al. 2010). Individu-individu tahan dan rentan pada progeni populasi persilangan tersebut dapat dibedakan dengan menggunakan marka RM17 (Li et al. 2010).

Calon-calon galur harapan yang terdeteksi mengandung lokus RM17 dikembangkan melalui persilangan antara tetua elit dengan sumber-sumber ketahanan. Tiga calon galur di antaranya, yaitu BP4130-1f-13-13-2*B, BP2870-4e-Kn-22-2-1-5*B, dan BP4188-7f-1-2-2*B diketahui memiliki ketahanan yang stabil hingga tanaman umur satu bulan berdasarkan uji *population build-up* (Effendi & Munawar 2013). BP4130-1f-13-13-2*B memiliki mekanisme ketahanan antibiosis dan toleran terhadap serangan WBC, sedangkan BP4188-7f-1-2-2*B tidak memiliki mekanisme ketahanan antibiosis tetapi toleran terhadap serangan WBC. Calon galur harapan lainnya diketahui bereaksi agak tahan terhadap biotipe 3

Tabel 3. Marka SSR putatif terkait gen atau QTL ketahanan padi terhadap wereng batang coklat (WBC) biotipe 3 dan varietas/calon galur harapan yang terdeteksi mengandung alel gen atau QTL tersebut

Marka	Kro-mosom	Gen/QTL	Ukuran alel (pb)	P	R ²	Aksesi
RM328	9	<i>Bph11</i>	198	0,009	0,225	Digul, BP4124-1f-3-3-2*B
RM124	4	<i>QTL, Bph15</i>	267	0,013	0,221	Digul
RM17	12	<i>qBPH12-3</i>	179	0,016	0,174	ARC10550, Babawe, Mudgo, <i>Oryza australiensis</i> ‡, Pokkali, PTB33, Rathu Heenati, Swamalata, BP2870-4e-Kn-22-2-1-5*B, BP3684-2e-10-1-3*B‡, BP4200-2f-3-2-2*B, BP4556-1f-12-2*B, BPT164c-68-7-3-1
RM17	12	<i>qBPH12-3</i>	206	0,017	0,169	Batang Piaman, Celebes1, Ciapus, Cigeulis, Digul, H27, <i>Oryza australiensis</i> ‡, Pokkali, Widas, BP3684-2e-10-1-3*B, BP4124-1f-3-3-2*B, BP4124-1f-4-2-2*B, BP4130-1f-3-3-2*B, BP4188-7f-1-2-2*B, BP4198-4f-2-1-2*B, BPT164c-68-7-3-1
RM125	7	<i>QTL</i>	123	0,020	0,213	Digul, Gilirang, BP2870-4e-Kn-22-2-1-5*B
RM250	2	<i>Bph13</i>	153	0,020	0,221	Digul
RM209	11	<i>Bph18</i>	153	0,021	0,277	BP4188-7f-1-2-2*B
RM38	8	<i>QTL</i>	254	0,030	0,415	BP3244-2e-8-3-2-3*B
RM287	11	<i>Bph18</i>	111	0,040	0,126	Batang Lembang, BP2870-4e-Kn-22-2-1-5*B, BP4124-1f-3-3-2*B, BP4130-1f-3-3-2*B

‡heterosigus untuk marka RM17 (berukuran alel 179 dan 206).

pada uji skrining massal tahap pertama terhadap >600 aksesi namun menjadi agak rentan pada uji skrining massal tahap kedua (Effendi & Munawar 2013). Dengan demikian marka RM17 dapat digunakan sebagai alat bantu deteksi ketahanan terhadap WBC biotipe 3 pada skrining ketahanan tahap awal tanpa memerlukan infestasi WBC.

Pada penelitian ini tidak ditemukan marka yang berasosiasi sangat signifikan ($P < 0,001$) dengan ketahanan WBC. Asosiasi marka yang sangat signifikan dengan karakter fenotipik tertentu biasanya ditemukan pada populasi yang terstruktur, misalnya populasi yang sampel-sampelnya berasal dari lokasi geografik yang beragam (Pritchard et al. 2000; Aranzana et al. 2005). Hasil penelitian Aranzana et al. (2005) menunjukkan bahwa uji asosiasi genom secara luas (*genome-wide association* [GWAS]) terhadap 95 aksesi Arabidopsis yang berasal dari berbagai lokasi geografik dan mempunyai fenotipe waktu pembungaan yang berbeda-beda, mendapatkan marka-marka yang berasosiasi sangat signifikan dengan lokus vernalisasi dengan nilai P yang sangat condong ke nilai '0'.

Hasil uji asosiasi dalam penelitian ini dianggap masih memiliki kekuatan rendah (*low power*), dengan alasan: 1) analisis SSR tidak dilakukan

pada individu-individu tanaman yang sama dengan yang diuji fenotipik, dan 2) kepadatan marka SSR belum mencakup seluruh segmen kromosom. Studi GWAS oleh Aranzana et al. (2005) pada Arabidopsis misalnya, uji fenotipik dan uji asosiasi dilakukan pada individu tanaman yang sama untuk mencari lokus waktu pembungaan dan ketahanan terhadap penyakit. Dengan menggunakan metode statistik yang berbeda, lokus-lokus utama pengontrol kedua macam karakter yang sudah diidentifikasi sebelumnya, berhasil dikonfirmasi kembali dengan pemindaian menggunakan sekuen-sekuen DNA berukuran 500-600 pb di sekitar lokus-lokus tersebut dan pada setiap 100 kb ukuran genom Arabidopsis. SSR padi diperkirakan berada pada setiap 157 kb genom padi (McCouch et al. 2002), sehingga uji asosiasi ketahanan terhadap WBC dengan sejumlah besar SSR dapat meningkatkan kekuatan hasil analisis.

Marka-marka SSR yang diidentifikasi pada penelitian ini merupakan petunjuk awal untuk mengetahui aksesi padi yang mengandung lokus-lokus mikrosatelit yang terpetakan berdekatan dengan atau berada dalam segmen gen dan QTL ketahanan terhadap WBC biotipe 3. Marka-marka tersebut, terutama RM17, perlu dikonfirmasi lebih lanjut pada populasi turunan yang bersegregasi

untuk marka SSR tersebut dan fenotipe ketahanan terhadap WBC untuk memastikan kelayakannya sebagai alat seleksi ketahanan (*marker-assisted selection* [MAS]).

KESIMPULAN

Delapan marka SSR (RM17, RM38, RM124, RM125, RM209, RM250, RM287, dan RM328) berasosiasi signifikan ($P < 0,05$; $R^2 = 0,126-0,497$) dengan ketahanan terhadap WBC biotipe 3. Dua puluh delapan aksesori yang terdiri dari 16 varietas, satu spesies, serta 11 calon galur harapan padi terdeteksi mengandung alel-alel SSR yang berasosiasi dengan ketahanan WBC tersebut. Marka RM17 terdeteksi pada sebagian besar aksesori (25) sehingga berpotensi sebagai alat seleksi ketahanan terhadap WBC biotipe 3, namun masih perlu diuji pada populasi yang bersegregasi untuk marka tersebut.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami berterima kasih kepada Sujarno, Ma'sumah dan Ahmad Syarif untuk penyiapan tanaman dan DNA, dan kepada para penelaah yang telah memberikan masukan berguna untuk perbaikan makalah ini. Penelitian didanai APBN dengan nomor proyek 3209.0/018-09.0/XII/2007.1525.0460.A5.

DAFTAR PUSTAKA

- Aranzana MJ, Kim S, Zhao K, Bakker E, Horton M, Jakob K, Lister C, Molitor J, Shindo C, Tang C, Toomajian C, Traw B, Zheng H, Bergelson J, Dean C, Marjoram P, Nordborg M. 2005. Genome-wide association mapping in Arabidopsis identifies previously known flowering time and pathogen resistance genes. *PLoS Genetics* 1:e60. doi: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.0010060>.
- Baehaki SE. 2011. Strategi fundamental pengendalian hama wereng batang coklat dalam pengamanan produksi padi nasional. *Pengembangan Inovasi Pertanian* 4:63–75.
- Baehaki SE, Munawar D. 2008. Identifikasi biotipe wereng coklat di Jawa, Sumatera dan Sulawesi dan reaksi ketahanan kultivar padi. Di dalam: 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.
- Bahagiawati. 2012. Kontribusi teknologi marka molekuler dalam pengendalian wereng coklat. *Pengembangan Inovasi Pertanian* 5:1–18.
- Chaerani, Hidayatun N, Utami DW. 2009. Pengembangan set multipleks penanda DNA mikrosatelit untuk analisis variasi genetik padi dan kedelai. *Jurnal Agrobiogen* 5:57–64.
- Cohen MB, Alam SN, Medina EB, Bernal CC. 1997. Brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, resistance in rice cultivar IR64: mechanism and role in successful *N. lugens* management in Central Luzon, Philippines. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 85:221–229. doi: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1570-7458.1997.00252.x>.
- Du B, Zhang W, Liu B, Hu J, Wei Z, Shi Z, He R, Zhu L, Chen R, Han B, He G. 2009. Identification and characterization of Bph14, a gene conferring resistance to brown planthopper in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:22163–22166. doi: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0912139106>.
- [DPTP] Direktorat Perlindungan Tanaman Pangan. 2011. *Laporan Serangan Organisme Pengganggu Tanaman Pangan*. Jakarta: DPTP.
- Effendi BS, Munawar D. 2013. Uji ketahanan galur padi terhadap wereng coklat biotipe 3 melalui *population build-up*. *Jurnal Entomologi Indonesia* 10:7–17. doi: <http://dx.doi.org/10.5994/jei.10.1.7>.
- Kazushige S, Juan Z, Zhong-hai Q. 2003. Applications of DNA markers to analyze rice planthopper resistance genes. *Chinese Journal of Rice Science* 17:37–46.
- Laboratorium Terpadu Litbang. 2006. *Lab Manual Protocol Standar Operating Procedure BB Biogen*. Departemen Pertanian Indonesia. (tidak dipublikasikan).
- Lang, NT, Buu, BC. 2003. Genetic and physical maps of gene *Bph-10* controlling brown plant hopper resistance in rice (*Oryza sativa* L.). *Omonrice* 11: 35–41.
- Li R, Li L, Wei S, Wei Y, Chen Y, Bai D, Yang L, Huang F, Lu W, Zhang X, Li X, Yang X, Wei Y. 2010. The evaluation and utilization of new genes for brown planthopper resistance in common wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.). *Molecular Entomologi* 1:1–7.
- McCouch SR, Teytelman L, Xu Y, Lobos KB, Clare K, Walton M, Fu B, Maghirang R, Li Z, Xing

- Y, Zhang Q, Kono I, Yano M, Fjellstrom R, DeClerck G, Schneider D, Cartinhour S, Ware D, Stein L. 2002. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Research* 9:199–207. doi: <http://dx.doi.org/10.1093/dnares/9.6.199>.
- Pritchard JK, Stephens M, Rosenberg NA, Donnelly P. 2000. Association mapping in structured populations. *American Journal of Human Genetics* 67:170–181. doi: <http://dx.doi.org/10.1086/302959>.
- Schuelke M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18:233–234. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/72708>.
- Soundararajan RP, Gunathilagaraj K, Chitra N, Maheswaran M, Kadirvel P. 2005. Mechanisms and genetics of resistance of brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stal.) in rice, *Oryza sativa*. *Agriculture Review* 26:79–91.
- Su, C-C, H-Q, Zhai, C-M Wang, L-H Sun, J-M Wan. 2006. SSR Mapping of brown planthopper resistance gene *Bph9* in Kaharamana, an *indica* rice (*Oryza sativa* L.). *Acta Genetica Sinica* 33:262–268. [http://dx.doi.org/10.1016/S0379-4172\(06\)60049-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0379-4172(06)60049-8).
- Xu XF, Mei HW, Luo LJ, Cheng XN, Li ZK. 2002. RFLP-facilitated investigation of the quantitative resistance of rice to brown planthopper (*Nilaparvata lugens*). *Theoretical and Applied Genetics* 104:248–253. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00122-001-0777-0>