

Analisis Molekuler Piramida Gen *Xa* pada Progeni Padi Varietas Ciherang dan Inpari 13 (Molecular analysis of pyramiding *Xa* gene in progenies of Ciherang and Inpari 13 rice varieties)

Fatimah, Joko Prasetyono, Tri Puji Priyatno, Muhammad Yunus, Tintin Suhartini, Iman Ridwan, & Mushlihatun Baroya

Balai Besar Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian. Jl. Tentara Pelajar no.3A Bogor 16111
Email: fatimahsuw@gmail.com

Memasukkan: September 2014, Diterima: Januari 2015

ABSTRACT

Bacterial leaf blight (BLB) is a major disease in Indonesian lowland rice. This research was undertaken to pyramid three BLB resistant genes *xa5*, *Xa7* and *Xa21* and one background BLB resistant gene *Xa4* into Ciherang and Inpari 13 varieties. The donor parent Code (*Xa4+Xa7*) was crossed with Angke (*Xa4+xa5*) while Ciherang and Inpari 13 were crossed with IRBB21 (*Xa21*). Progenies were selected using marker assisted selection and yield component observation. Foreground selection was conducted using SSR and STS markers linked with the targeted genes in the F1 and DCF1 population. Individuals with triple positives *Xa* genes were screened for the presence of *Xa4* gene as the background. Selected heterozygote plants in F1 Code x Angke, F1 Ciherang x IRBB21 and F1 Inpari 13 x IRBB21 were used to develop DCF1 population. Molecular analysis on DCF1 population through alleles of three BLB resistant genes *xa5*, *Xa7* and *Xa21* and one background BLB resistant gene *Xa4* resulted 8 (2,6%) in DCF1 Ciherang and 13 (3,5%) in DCF1 Inpari 13. Yield component characters on F1 Code x Angke resulted significant in number of panicle. F1 Ciherang x IRBB21, F1 Inpari 13 x IRBB21 and DCF1 Ciherang resulted significant in weight of empty grain while DCF1 Inpari 13 resulted no significance in all of observed characters.

Keywords: Rice, F1 Population, DCF1 Population, molecular marker, *Xa* gene

ABSTRAK

Penyakit hawar daun bakteri (HDB) merupakan penyakit utama yang menyerang pertanaman padi sawah di Indonesia. Penelitian ini bertujuan untuk menggabungkan tiga gen ketahanan HDB yaitu *xa5*, *Xa7* dan *Xa21* dan satu gen ketahanan *Xa4* sebagai *background* pada padi Ciherang dan Inpari 13. Tetua donor adalah Code (*Xa4+Xa7*) disilangkan dengan Angke (*Xa4+xa5*) dan Ciherang dan Inpari 13 disilangkan dengan IRBB21 (*Xa21*). Metode seleksi menggunakan marka molekuler dan pengamatan komponen hasil terhadap progeni hasil persilangan. Seleksi *foreground* menggunakan marka molekuler STS dan SSR yang terpaut dengan gen-gen target pada populasi F1 dan silang ganda F1. Individu dengan tiga gen ketahanan selanjutnya diseleksi kembali dengan gen *Xa4* sebagai *background*. Individu heterozigot terpilih pada F1 Code x Angke, F1 Ciherang x IRBB21 dan F1 Inpari 13 x IRBB21 dilanjutkan untuk pembentukan DCF1. Hasil analisis molekuler pada populasi DCF1 terhadap alel-alel dari tiga gen ketahanan (*Xa7*, *xa5* dan *Xa21*) dan satu gen ketahanan *background* (*Xa4*) diperoleh masing-masing 8 individu (2,6%) DCF1 Ciherang dan 13 individu (3,5%) DCF1 Inpari 13. Karakter komponen hasil individu F1 Code x Angke berbeda nyata dengan kedua tetua pada karakter jumlah malai. Pada F1 Ciherang x IRBB21, F1 Inpari 13 x IRBB21, dan DCF1 Ciherang berbeda nyata pada peubah bobot gabah hampa. Pada galur DCF1 Inpari 13 tidak berbeda nyata dengan tetua Inpari 13 pada semua karakter.

Kata Kunci: Padi, populasi F1, populasi DCF1, marka molekuler, gen *Xa*

PENDAHULUAN

Ciherang merupakan salah satu varietas unggul padi yang banyak ditanam di Jawa Barat. Varietas ini disukai karena memiliki sejumlah

keunggulan antara lain rasa nasi enak, tekstur pulen, produktivitas tinggi dan rendemen tinggi sehingga sangat laku di pasaran. Oleh karena itu, para petani masih mempertahankan varietas Ciherang sebagai produk unggulan (Margana 2012). Selain

Ciherang, ada pula varietas lainnya yang disukai yaitu Inpari 13, varietas ini dilepas pada akhir tahun 2009. Inpari 13 memiliki keunggulan antara lain sangat genjah (103 hari), tahan wereng coklat, berdaya hasil tinggi namun agak rentan penyakit hawar daun bakteri (Rozakurniati 2010).

Penyakit hawar daun bakteri (HDB) disebabkan oleh bakteri *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* (Xoo) tercatat sebagai salah satu faktor pembatas peningkatan produksi padi (Iyer & McCouch 2007). Penurunan produksi padi akibat serangan penyakit ini berkisar antara 15-80% bergantung pada stadia tanaman saat penyakit timbul (Kadir 2009; Sudir *et al.* 2012). Salah satu upaya yang dinilai efektif untuk mengendalikan penyakit HDB adalah melalui penanaman varietas tahan, karena bersifat ekonomis dan tidak merusak lingkungan. Varietas tahan sangat dipengaruhi oleh interaksi antara gen pembawa sifat tahan dalam tanaman dengan gen avirulensi pada populasi Xoo (Yamasaki *et al.* 2006).

Saat ini sebanyak 38 gen ketahanan penyakit HDB telah diidentifikasi dan dipetakan (Bhasin *et al.* 2012; Chun *et al.* 2012). Gen pembawa sifat tahan yang paling efektif untuk strain bakteri Xoo di Indonesia adalah gen *xa5*, *Xa7*, dan *Xa21* (Bustamam *et al.* 2002; Fatimah dkk. 2014). Gen *Xa21* diidentifikasi berasal dari spesies liar *Oryza longistaminata*. *Xa21* memberikan resistensi terhadap banyak strain Xoo, sehingga dikenal sebagai gen yang memiliki resistensi luas (Khush *et al.* 1990; Ronald *et al.* 1992; Wang *et al.* 1996). Gen *Xa21* ini terpetakan dalam satu lokus pada kromosom 11 (Song *et al.* 1995). *xa5* merupakan gen ketahanan terhadap hawar daun bakteri yang bersifat resesif. Gen ini terletak pada lengan pendek kromosom 5 (Blair *et al.* 2003). *xa5* terdiri atas 4 ekson dan 3 intron, mengkode subunit gamma dari faktor transkripsi eukariotik (TFIIA) yang mengandung 106 asam amino. Gen ini dapat membedakan alel rentan melalui satu kodon, menghasilkan substitusi dari valin pada residu 39 menjadi asam glutamate (Iyer & McCouch 2007). *xa5* merupakan salah satu gen

yang sangat efektif tahan terhadap strain Xoo di Indonesia, sehingga gen tersebut potensial digunakan dalam penanggulangan penyakit hawar daun bakteri di Indonesia (Yunus 1998). Gen *Xa7* diidentifikasi pada padi kultivar DV85 (Chen *et al.* 2008). Gen resistensi *Xa7* pada genom padi terdapat pada kromosom 6. *Xa7* merupakan gen penting yang memiliki resistensi tahan lama (*durable*) karena tidak memiliki protein mirip dengan gen ketahanan HDB lainnya, termasuk *Xa1*, *Xa3*, *Xa13*, *Xa21*, *Xa26*, dan *Xa27* (Iyer & McCouch 2004; Chen *et al.* 2008). Efektivitas gen *Xa7* berkorelasi dengan mutasi pada Xoo yang menyebabkan patogenitas bakteri tersebut berkurang (Bai *et al.* 2000; Cruz *et al.* 2000).

Kemampuan patogen Xoo dalam menyerang inang (padi) terjadi ketika elisitor Xoo dikenali oleh reseptor yang terdapat pada tanaman padi, sehingga gen virulensi Xoo kompatibel dengan gen ketahanan padi (Yamasaki *et al.* 2006). Sementara tanaman padi memiliki suatu sistem pertahanan terhadap serangan patogen Xoo dengan adanya gen resisten. Gen ketahanan pada tanaman padi yang berperan pertama kali dalam menangkal serangan patogen Xoo adalah gen *Xa21*. Gen ini mengkode protein reseptor kinase (RLK) yang berperan utama dalam sejumlah lintasan sinyal pada tanaman, termasuk kekebalan alami (Morillo & Tax 2006). RLK memiliki struktur multidomain, termasuk domain ekstraselular *leucine-rich-repeat* (LRR) yang dapat mengenali patogen Xoo. Ketika sistem pertahanan awal oleh gen *Xa21* ini mampu ditembus oleh patogen Xoo, maka diperlukan gen ketahanan lain seperti halnya *xa5* yang terdapat pada inti sel tanaman padi untuk mencegah berlanjutnya infeksi. Gen *hrp* (*hypersensitivity reaction and for pathogenesis*) yang akan menyandikan sistem sekresi yakni T3SS (*Type III secretion system* merupakan protein yang bersifat hidrofobik). Elisitor Xoo melalui sekresi tersebut adalah *avrXa2*, *avrXa7*, *avrXa10* (Schornack *et al.* 2006). Sedangkan elisitor - elisitor tersebut disandikan oleh kelompok gen *AvrBs3/ PthA* seperti gen *PthXo06*, *PthXo07*

yang menyandikan protein serupa *transcription activator-like* (TAL) yang selanjutnya akan mempengaruhi proses transkripsi (Liu *et al.* 2006).

Salah satu cara untuk mengembangkan varietas tahan adalah melalui persilangan. Teknik persilangan yang dikombinasikan dengan seleksi menggunakan marka molekuler akan efektif dan mempercepat proses untuk mendapatkan varietas unggul baru (Ragimekula *et al.* 2013). Marka molekuler yang umum digunakan dalam tanaman sereal adalah marka mikrosatelit (*simple sequence repeat*/SSR) dan marka *sequence tag site* (STS) (Kumar *et al.* 2011). Studi melalui pendekatan *marker assisted selection* (MAS) dengan piramida gen ketahanan terhadap penyakit HDB telah banyak dilakukan di dunia pada berbagai varietas namun penelitian serupa di Indonesia masih terbatas, terlebih untuk varietas-varietas yang dominan pertanamannya. Beberapa contoh penelitian di dunia antara lain dilakukan Deng *et al.* (2006) dengan mentransfer gen ketahanan *Xa21* dan *Xa4* pada padi hibrida Mianhui 725. Gen *Xa4*, *xa5*, *xa13* dan *Xa21* pada padi Mahsuri (Shanti *et al.* 2010a), *xa5*, *xa13* dan *Xa21* pada padi Samba Mahsuri (Sundaram *et al.* 2008; Kottapalli *et al.* 2010), *xa5*, *xa13*, *Xa21* dan *Pi25* pada R8012 (Zhan *et al.* 2012), *xa13*, *Xa21*, *Pi54* dan *qSBR11-1* (Singh *et al.* 2012), *xa13* dan *Xa21* pada padi Basmati (Pandey *et al.* 2013), *Xa4*, *xa5*, *xa13* dan *Xa21* pada padi Tapaswini (Dokku *et al.* 2013) dan *Xa4*, *xa5*, *xa13* dan *Xa21* pada padi Mangeumbyeo (Suh *et al.* 2013). Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan kandidat galur unggul tahan penyakit HDB dengan menggabungkan tiga gen ketahanan HDB yaitu *xa5*, *Xa7* dan *Xa21* dan satu gen ketahanan *Xa4* sebagai *background* pada padi Ciherang dan Inpari 13 dengan metode seleksi berbantu marka.

BAHAN DAN CARA KERJA

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari 2013 sampai Juli 2014. Lokasi penelitian di Laboratorium Biologi Molekuler dan rumah kaca

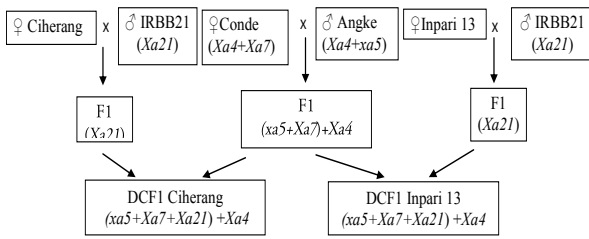
Balai Besar Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (BB Biogen).

Materi genetik yang digunakan sebagai tetua adalah padi varietas Ciherang, Inpari 13, Code (mengandung gen *Xa4+Xa7*), Angke (mengandung gen *Xa4+xa5*), IRBB21 (mengandung gen *Xa21*). Tanaman kontrol tahan yang digunakan yaitu IRBB5 (mengandung gen *xa5*) dan IRBB7 (mengandung gen *Xa7*), dan tanaman kontrol peka adalah IR64 dan IR24.

Populasi F1 diperoleh dari tiga persilangan tunggal. Persilangan pertama adalah Code (penerima) dengan Angke (donor gen *xa5*) dan progeni tanaman yang diuji terdiri dari 16 individu tanaman F1 Code x Angke. Persilangan kedua Ciherang (penerima) dengan IRBB21 (donor gen *Xa21*) dengan progeni tanaman yang diuji terdiri dari 22 individu F1 Ciherang x IRBB21. Persilangan ketiga Inpari 13 (penerima) dengan IRBB21 (donor gen *Xa21*) dengan progeni tanaman yang diuji terdiri dari 26 individu F1 Inpari 13 x IRBB21. Pembentukan DCF1 Ciherang ialah dari persilangan F1 (Code x Angke) dengan F1 (Ciherang x IRBB21) dengan progeni tanaman yang diuji terdiri dari 307 individu DCF1 Ciherang. Populasi DCF1 Inpari 13 ialah dari persilangan F1 (Code x Angke) dengan F1 (Inpari 13 x IRBB21) dengan progeni tanaman yang diuji terdiri dari 374 individu DCF1 Inpari 13. (Gambar 1).

Individu tanaman terpilih hasil analisis molekuler dipindahkan ke dalam ember berisi tanah yang dilumpurkan. Tanaman ditumbuhkan hingga panen dan dilakukan karakterisasi komponen hasil untuk melihat produktivitas tanaman akibat persilangan.

Karakter yang diamati adalah tinggi tanaman, jumlah malai, panjang malai, bobot gabah isi, bobot gabah hampa, dan bobot 100 butir. Tinggi tanaman diukur dari permukaan tanah sampai ujung malai paling panjang. Jumlah malai dihitung berdasarkan banyaknya malai pada satu rumpun padi. Panjang malai diukur dari leher malai sampai ujung malai. Bobot gabah isi, gabah hampa dan 100 butir ditimbang dari setiap rumpun padi. Data evaluasi komponen hasil dianalisis secara



Gambar 1. Alur persilangan pembentukan F1, Double Cross F1, dan BC1F1 pada perbaikan padi varietas Ciherang dan Inpari 13 dengan gen *Xa7*, *xa5* dan *Xa21* dan gen *Xa4* sebagai *background*.

statistik menggunakan program SPSS 16 dengan lima kali ulangan pada masing-masing tanaman dari tiap populasi dibandingkan dengan tetuanya yaitu Code, Angke, IRBB21, Ciherang dan Inpari 13 serta uji lanjut menggunakan uji jarak berganda Duncan.

Isolasi DNA dilakukan pada daun tanaman yang telah berumur 3 minggu dengan metode Dellaporta (1983). Primer yang digunakan untuk gen *xa5* adalah RM601, RM611 (Iyer & McCouch 2004) dan TioDW (Suh *et al.* 2013), RM20589 dan RM20582 untuk gen *Xa7* (Chen *et al.* 2008), pTA248 untuk gen *Xa21* (Huang *et al.* 1997) dan MP1+MP2 untuk gen *Xa4* (Temnykh 2000) (Tabel 1). Reaksi PCR dilakukan pada 20 µl volume yang mengandung 1 x buffer PCR (10 mM tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂,

0.01% gelatin), 100 µM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0.5 µM primer (F dan R), 50 ngul⁻¹ DNA dan 1 unit taq DNA polimerase. Proses amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan mesin PCR BIO-RAD dengan program predenaturasi pada suhu 94 °C selama 5 menit, denaturasi pada suhu 94 °C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 55/60 °C (tergantung primer) selama 1 menit, *extension* pada suhu 72 °C selama 1 menit, dan pasca pemanjangan primer pada suhu 72 °C selama 10 menit. Amplifikasi PCR dipisahkan pada gel agarose 2% atau poliakrilamid 8% dan pewarnaan dilakukan dengan metode *silver staining* dan ethidium bromida. Gel divisualisasi dengan chemidoc uv-illuminator Biorad.

HASIL

Analisis molekuler gen ketahanan *Xa*

Analisis molekuler pada 16 individu F1 Code x Angke berhasil mendeteksi 14 individu heterozigot gen *xa5*, sedangkan individu F1-10 dan F1-12 tidak memiliki gen tersebut (Gambar 2A dan 2B). Empat belas individu yang sama terdeteksi heterozigot gen *Xa7*, homozigot gen *Xa7* pada individu F1-10 dan F1-12 (Gambar 2C). Identifikasi dari 22 individu F1 Ciherang x IRBB21 terdeteksi 21 individu heterozigot gen

Tabel 1. Primer yang digunakan dalam penelitian ini.

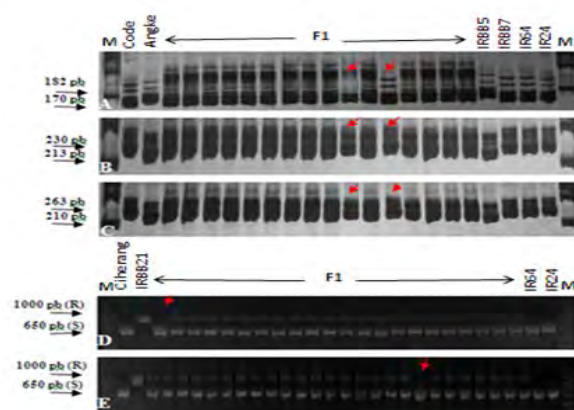
No.	Primer	Tipe	Krom	Gen	Motif	Sekuen
1	RM601	SSR	5	<i>xa5</i>	(GA)14	F:CCGGGGGTGTTGGGCTTAT R:TCACTGGCTCTACTTCCGCTTAC
2	RM611	SSR	5	<i>xa5</i>	(GA)19	F:CAACAAGATGGCCTCTTACC R:TACAAACAAACAGCTTGTGC
3	10603F	STS	5	<i>xa5</i>	-	F:GCACTGCAACCATCAATGAATC
	T10DwR	STS	5	<i>xa5</i>	-	R:CCTAGGAGAACTAGCCGTCCA
4	RM20589	SSR	6	<i>Xa7</i>	(AC)22	F:CATGTATTTGTGTGCACGTACCG R:ACCTTTCTTGGGCCTTTCTTGG
5	RM20582	SSR	6	<i>Xa7</i>	(TCT)7	F:AGAGCGTTCGTCCTTACCATCC R:GGCCAATACGACGATACATTACACG
6	pTA248	STS	11	<i>Xa21</i>	-	F-AGACGCGGAAGGGTGGTTCCCGGA R-AGACGCGGTAATCGAAAGATGAA
7	MP1 MP2	STS	11	<i>Xa4</i>	-	F:ATCGATCGATCTTACGAGG R:TGCTATAAAAGGCATTCCGG

Xa21 dan individu F1-1 tidak memiliki alel Ciherang (Gambar 2D). Identifikasi dari 26 individu F1 Inpari 13 x IRBB21 terdeteksi 25 individu F1 heterozigot gen Xa21 kecuali individu F1-19 yang memiliki alel Inpari 13 (Gambar 2E). Individu tanaman F1 yang homozigot diberi tanda dan tidak digunakan dalam kegiatan selanjutnya.

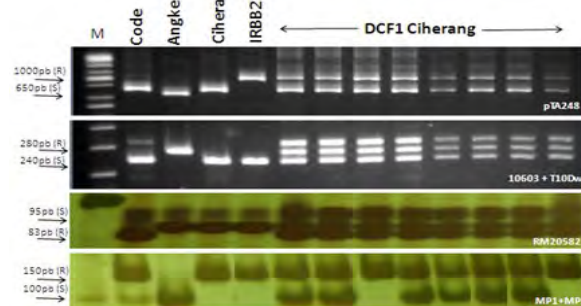
Analisis molekuler pada 307 individu DCF1 Ciherang telah didapatkan 11 individu heterozigot dengan alel-alel dari tiga gen ketahanan (*xa5*, *Xa7*, dan *Xa21*) (Tabel 2) dan 8 individu dengan penambahan gen *Xa4* sebagai gen ketahanan *background*. Nomor 71 dan 303 teridentifikasi dalam kondisi homozigot IR64 sedangkan enam nomor lainnya dalam kondisi heterozigot (Gambar 3). Analisis molekuler pada 374 individu DCF1 Inpari 13 telah didapatkan 16 individu heterozigot dengan alel-alel dari tiga gen ketahanan tersebut (Tabel 2) dan 13 individu dengan penambahan gen *Xa4* sebagai gen ketahanan *background*. Nomor 13, 288 dan 342 teridentifikasi dalam kondisi homozigot IR64 sedangkan sepuluh nomor lainnya dalam kondisi heterozigot (Gambar 4).

Evaluasi Karakter Komponen Hasil

Karakter komponen hasil populasi F1 Code x Angke berbeda nyata dengan kedua tetua pada karakter jumlah malai akan tetapi panjang malai dan bobot gabah hampa populasi F1 berada di



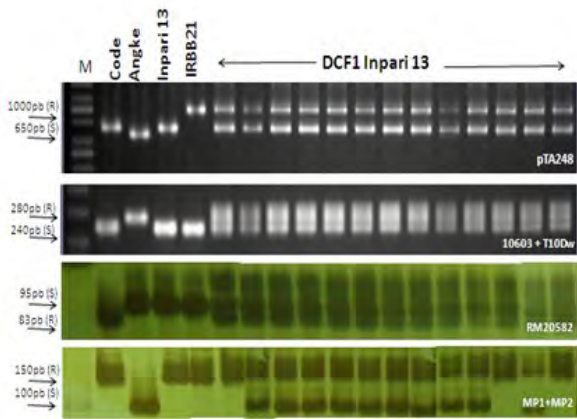
Gambar 2. Hasil amplifikasi PCR pada individu F1 Code x Angke menggunakan primer (A) RM601, (B) RM611, (C) RM20589, (D) individu F1 Ciherang x IRBB21 dengan primer pTA248 dan (E) F1 Inpari13 x IRBB21 dengan primer pTA248 setelah dielektroforesis pada gel poliakrilamid 8% (A, B, dan C) dan Agarose 2% (D dan E).



Gambar 3. Hasil amplifikasi tanaman DCF1 Ciherang terpilih dengan menggunakan primer pTA248 (*Xa21*), primer 10603+T10Dw (*xa5*), primer RM20582 (*Xa7*) dan primer MP1+MP2 (*Xa4*) setelah dielektroforesis pada gel agarose 2% dan gel poliakrilamid 8%.

Tabel 2. Rekapitulasi keberadaan gen ketahanan (*Xa*) pada populasi DCF1 Ciherang dan DCF1. inpari 13

Gen	Jumlah individu DCF1 Ciherang	keberadaan gen (%)	Jumlah Individu DCF1 Inpari 13	Keberadaan gen (%)
<i>xa5</i>	143	46.58	176	47.06
<i>Xa7</i>	125	40.72	179	47.86
<i>Xa21</i>	68	22.15	93	24.87
<i>xa5+Xa7</i>	58	18.89	89	23.8
<i>xa5+Xa21</i>	31	10.1	39	10.43
<i>Xa7+Xa21</i>	31	10.1	43	11.5
<i>xa5+Xa7+Xa21</i>	11	3.58	16	4.28
<i>xa5+Xa7+Xa21+Xa4</i>	8	2.6	13	3.47
Total Individu	307		374	



Gambar 4. Hasil amplifikasi tanaman DCF1 Inpari 13 terpilih dengan menggunakan primer pTA248 (*Xa21*), primer 10603+T10Dw (*xa5*), primer RM20582 (*Xa7*) dan primer MP1+MP2 (*Xa4*) setelah dielektroforesis pada gel agarose 2% dan gel poliakrilamid 8%.

antara kedua tetuanya, dan tinggi tanaman, bobot gabah isi dan bobot 100 butir populasi F1 tidak berbeda nyata dari kedua tetuanya. Karakter komponen hasil pada populasi F1 Ciherang x IRBB21 dengan kedua tetua menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata yaitu untuk karakter tinggi tanaman, jumlah malai, bobot gabah isi dan bobot 100 butir namun berbeda nyata

dengan tetua Ciherang pada karakter panjang malai dan bobot gabah hampa. Pada populasi F1 Inpari 13 x IRBB21 dengan kedua tetua menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata untuk karakter tinggi tanaman, jumlah malai, bobot 100 butir, bobot gabah isi, dan bobot gabah hampa namun berbeda nyata dengan tetua Inpari 13 pada karakter panjang malai (Tabel 3).

Populasi DCF1 Ciherang tidak berbeda nyata dengan tetua Ciherang pada karakter tinggi tanaman, panjang malai, jumlah malai, bobot gabah isi dan bobot 100 butir namun berbeda nyata pada peubah bobot gabah hampa (Tabel 4) sedangkan pada galur DCF1 Inpari 13 tidak berbeda nyata dengan tetua Inpari 13 pada semua karakter (Tabel 5).

PEMBAHASAN

Analisis molekuler gen ketahanan *Xa*

Pemuliaan kultivar tahan yang membawa gen resisten (R) telah menjadi pendekatan yang paling efektif untuk mengendalikan penyakit hawar daun bakteri. Pada penelitian ini telah berhasil dilakukan seleksi alel pada gen *xa5*, *Xa7*,

Tabel 3. Karakter agronomi dan komponen hasil tanaman tetua dan populasi F1.

Varietas	Tinggi Tanaman (cm)	Panjang malai (cm)	Jumlah malai (buah)	Bobot 100 butir (g)	Bobot gabah hampa (g)	Bobot gabah isi (g)
F1 (Code x Angke)						
Code	74.33b	22.63b	13.33a	2.7a	3.00b	24.43a
Angke	77.33b	20.91a	10.67a	2.7a	0.4a	22.31a
F1 (Code x Angke)	70.00a	21.17ab	25.00b	2.8a	2.61ab	31.97a
F1 (Ciherang x IRBB21)						
Ciherang	75.00a	19.37a	10.67a	2.5a	0.6a	19.86a
IRBB21	82.17a	22.04b	9.67a	2.5a	6.50b	18.76a
F1 (Ciherang x IRBB21)	78.33a	22.97b	13.00a	2.4a	6.70b	18.28a
F1 (Inpari13 x IRBB21)						
Inpari13	73.30a	20.26a	9.33a	2.2a	1.4a	15.57a
IRBB21	82.17a	22.04b	9.67a	2.5a	6.5a	18.76a
F1 (Inpari13 x IRBB21)	75.00a	22.67b	14.50a	2.4a	3.8a	34.84a

Keterangan: Angka rerata pada setiap kolom yang ditandai dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf uji 5% (uji jarak berganda Duncan)

Xa21 dan gen ketahanan *background* (Xa4) pada galur F1 Code x Angke, F1 Ciherang x IRBB21, F1 Inpari 13 x IRBB21, DCF1 Ciherang dan DCF1 Inpari 13.

Populasi F1 Code x Angke yang tidak memiliki alel gen ketahanan xa5 namun memiliki gen Xa7 diduga menyerbuk sendiri (*selfing*). Dugaan penyerbukan sendiri ini juga terjadi pada populasi FI Ciherang x IRBB21 dan populasi F1 Inpari 13 x IRBB21 sehingga tidak memiliki gen ketahanan Xa21. Hal ini menyebabkan individu tanaman F1 yang diharapkan heterozigot menjadi homozigot atau sama seperti tetua betina. Hal ini sesuai dengan pernyataan Pochlman (1983) yang menyatakan bahwa selama proses penyerbukan sendiri, banyak gen-gen resesif yang tidak diinginkan menjadi homozigot dan menampilkan fenotipenya.

Pada populasi DCF1 dengan alel-alel dari tiga gen ketahanan dan satu gen ketahanan *background* telah didapatkan 8 individu (2,6%)

DCF1 Ciherang dan 13 individu (3,5%) DCF1 Inpari 13. Menurut Ye & Smith (2008) beberapa hal yang mempengaruhi piramida gen yaitu: 1) karakteristik gen/sifat target, 2) karakteristik reproduksi, 3) kemampuan pemulia untuk menentukan genotipe terpilih, dan 4) biaya operasional yaitu lebih banyak melakukan persilangan pada satu generasi jika biaya *genotyping* lebih murah dan memungkinkan dengan jumlah populasi yang besar atau satu persilangan untuk satu generasi jika biaya *genotyping* mahal dan jumlah populasi yang sedikit.

Efek menggabungkan gen dominan dan gen resesif akan menjadi sulit karena ada efek sembunyi (*masking effect*) dari gen dominan terhadap gen resesif dan seleksi pada gen dengan reaksi yang mirip pada dua ras Xoo atau lebih. Gen resesif xa5 dan xa13 sulit untuk dideteksi melalui pemuliaan konvensional terkait dengan adanya gen dominan Xa21. Gen Xa21 yang dominan dan memiliki ketahanan terhadap sejumlah besar ras Xoo menyebabkan sulitnya

Tabel 4. Karakter agronomi dan komponen hasil tanaman tetua dan DCF1 Ciherang.

Varietas/Galur	Tinggi tanaman	Panjang malai (cm)	Jumlah malai (cm)	Bobot 100 butir (gram)	Bobot gabah isi (gram)	Bobot gabah hampa
Code	92,80 b	24,93 ab	0.00	2,63 b	26,62 ab	0,81 a
Angke	99,97 b	28,98 b	13 a	2,58 b	37,36 c	0,81 a
Ciherang	94,23 b	23,40 a	0.46	2,58 b	25,51 ab	0,78 a
IRBB21	82,43 a	25,51ab	0.46	2,32 a	24,05 a	1,24 a
DCF1 Ciherang	92,83 b	24,10 ab	14 a	2,71 b	34,49 bc	2,34 b

Keterangan: Angka rerata pada setiap kolom yang ditandai dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf uji 5% (uji jarak berganda Duncan)

Tabel 5. Karakter agronomi dan komponen hasil tanaman tetua dan DCF1 Inpari 13.

Tanaman	Tinggi tanaman (cm)	Panjang malai (cm)	Jumlah malai (cm)	Bobot 100 butir (gram)	Bobot gabah isi (gram)	Bobot gabah hampa (gram)
Code	92,80 b	24,93 a	0.00	2,63 b	26,62 ab	0,81 a
Angke	99,97 b	28,98 a	13 a	2,58 b	37,36 bc	0,81 a
Inpari13	98,43 b	25,36 a	0.00	2,61 b	31,39 abc	1,04 a
IRBB21	82,43 a	25,51 a	0.46	2,32 a	24,05 a	1,24 a
DCF1 Inpari13	92,83 b	25,99 a	0.00	2,53 b	39,92 c	0,91 a

Keterangan: Angka rerata pada setiap kolom yang ditandai dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf uji 5% (uji jarak berganda Duncan)

membedakan tanaman yang hanya memiliki gen tunggal *Xa21* dengan tanaman yang memiliki *Xa21* dan gen *Xa* lainnya. Oleh karena itu, penggunaan marka molekuler yang berpautan dekat pada gen ketahanan dominan dan resesif akan sangat membantu identifikasi dan seleksi tanaman dengan beberapa gen (Hajjar & Hodgkin 2007; Ye & Smith 2008; Shanti *et al.* 2010b; Rajpurohit *et al.* 2011; Suh *et al.* 2013).

Pada penelitian ini, pengujian ketahanan terhadap penyakit HDB pada generasi awal belum dilakukan. Hal ini dimaksudkan untuk memaksimalkan transfer gen *Xa* pada padi Ciherang dan Inpari 13 sehingga mengandung alel-alel dari tiga gen ketahanan yang bersifat piramida. Evaluasi ketahanan terhadap penyakit HDB baru akan dilakukan pada generasi selanjutnya yaitu pada generasi silang balik (*backcross*).

Evaluasi Karakter Komponen Hasil

Karakter agronomi dan komponen hasil menunjukkan perbedaan produktivitas antara populasi F1 dan DCF1 dengan tetuanya berdasarkan penampilan fisik (keragaan). Reny *et al.* (2009) menyatakan bahwa untuk mencapai tujuan seleksi harus diketahui antar karakter agronomi dan komponen hasil, sehingga seleksi terhadap satu karakter atau lebih dapat dilakukan.

Berdasarkan indeks panen pada populasi F1 memiliki panjang malai, jumlah malai, bobot gabah isi, dan bobot gabah hampa dengan produktivitas lebih tinggi atau perpaduan antara kedua tetuanya. Peningkatan ini bisa disebabkan oleh efek heterosis di lokus yang lain (di luar daerah gen *Xa*). Menurut Taringan & Wiryanta (2003), efek heterosis dapat menghasilkan hibrida dari penggabungan sinergi dua tanaman induk yang memiliki sifat dan penampilan yang lebih baik dibandingkan dengan kedua induknya namun biasanya efek heterosis ini terjadi pada individu F₁ pada padi hibrida (Vaithiyalingan & Nadarajan 2010).

Pada populasi DCF1 Ciherang dan Inpari 13, karakter panjang malai dan jumlah malai

tidak berbeda nyata dengan tetua Ciherang dan Inpari 13. Demikian juga pada karakter tinggi tanaman, bobot gabah isi dan bobot 100 butir tidak berbeda nyata dengan tetua Ciherang dan Inpari 13 namun berbeda nyata dengan tetua IRBB21 dimana populasi DCF1 Ciherang dan Inpari 13 memberikan nilai lebih tinggi dibandingkan tetua IRBB21. Sebaliknya pada karakter bobot gabah hampa berbeda nyata antara populasi DCF1 Ciherang dengan semua tetua namun pada populasi DCF1 Inpari 13 tidak berbeda nyata dengan semua tetua. Karakter gabah hampa ini diduga berasal dari IRBB21 dari garis tetua *Oryza longistaminata*, yang merupakan spesies liar dari Afrika. Salah satu karakter *O.longistaminata* adalah *semi-sterility* dan *self incompatibility* (Oka & Morishima 1967; Nayar 2014). Fenomena ini terjadi pada padi progeni Ciherang namun tidak pada progeni Inpari 13. Hal ini dimungkinkan karena perbedaan *background* genetik padi Ciherang yaitu IR64 sedangkan padi Inpari 13 yaitu OM1490 hasil introduksi dari Vietnam (Du & Loan 2007).

Penelitian ini mengindikasikan bahwa hasil persilangan ini masih perlu diseleksi pada generasi lebih lanjut terkait karakter jumlah malai dan bobot gabah hampa. Diasumsikan karakter bobot gabah hampa yang diperoleh dari IRBB21 merupakan *linkage drag* dan berdampak negatif pada populasi F1 dan DCF1 Ciherang dan populasi F1 Inpari 13 namun pada populasi DCF1 Inpari 13 segmen tersebut telah tereliminasi. Ye & Smith (2008) menyebutkan jika gen target berpautan dengan gen yang memiliki efek negatif, gen yang tidak diharapkan ini akan ditransfer bersama-sama dengan target gen pada tanaman penerima akan menghasilkan berkurangnya keragaan atau telah terjadi *linkage drag*.

KESIMPULAN

Piramida gen ketahanan pada generasi awal progeni padi Ciherang dan Inpari 13 yang memiliki alel-alel dari tiga gen ketahanan (*Xa7*,

xa5, dan Xa21) dan satu gen ketahanan *background* (Xa4) telah didapatkan masing-masing 2,6% pada individu DCF1 Ciherang dan 3,5% DCF1 Inpari 13. Pada karakter komponen hasil populasi DCF1 Inpari 13 tidak berbeda nyata dengan tetua Inpari 13 pada karakter yang diamati dan populasi DCF1 Ciherang berbeda nyata dengan tetua Ciherang pada peubah bobot gabah hampa sehingga diperlukan seleksi terkait karakter tersebut pada generasi lebih lanjut.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Synta Haqqul Fadhlillah dan Hermanto atas bantuannya dalam penelitian ini. Penelitian ini didanai oleh DIPA-BB-BIOGEN TA 2013 dan 2014 No. 018.09.2.237221. Badan Penelitian dan Pengembangan Kementerian Pertanian.

DAFTAR PUSTAKA

- Bai, J., SH. Choi, G. Panciano, H. Leung, & JE. Leach. 2000. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* avirulence gene contribute differently and spesifically to pathogen aggressiveness. *Molecular Plant-Microbe Interaction*. 13: 1322-1329.
- Bhasin, H., D. Bhatia, S. Raghuvanshi, JS. Lore, GK. Sahi, B. Kaur, Y. Vikal, & K. Singh. 2012. New PCR-based sequence-tagged site marker for bacterial blight resistance gene Xa38 of rice. *Molecular Breed.ing*. 30:607-611.
- Blair, MW., AJ. Garris, AS. Iyer, B. Chapman, S. Kresovich, & SR. McCouch. 2003. High resolution genetic mapping and candidate gene identification at the xa5 locus for bacterial blight resistance in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical Applied Genet.ics*. 107:62-73.
- Bustamam, M., RE. Tabien, A. Suwarno, MC. Abalos, TS. Kadir, I. Ona, M. Bernardo, CM. Veracruz, & H. Leung. 2002. Asian Rice Biotechnology Network: Improving popular cultivars through marker-assisted backcrossing. Prosiding Internasional Rice Congress, Beijing.16-20 September 2002.
- Chen, S., Z. Huang, L. Zeng, J. Yang, Q. Liu, & X. Zhu. 2008. High-resolution mapping and gene prediction of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* resistance gene Xa7. *Molecular Breeding* 22:433-441.
- Chun, X., C. Hongqi, & Z. Xudong. 2012. Identification, mapping, isolation of the genes resisting to bacterial blight and breeding application in rice. *Molecular Plant Breeding* 3:121-131.
- Cruz, VCM., J. Bai, I. Ona, H. Leung, RJ. Nelson, TW. Mew, & JE. Leach. 2000. Predicting durability of a disease resistance gene based on an assessment of the fitness loss and epidemiological consequences of avirulence gene mutation. *Proceedings of the Natal Academic of Science*. 97:13500-13505.
- Dellaporta, Sl., J. Woods, & JB. Hicks. 1983. A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1: 19-21.
- Deng, QM., SQ. Wang, AP. Zheng, HY. Zhang, & L. Ping. 2006. Breeding rice restorer lines with high resistance to bacterial blight by using molecular marker-assisted selection. *Rice Sci.ence*.13: 22-28.
- Dokku, P., KM. Das, & GJN. Rao. 2013. Pyramiding of four resistance genes of bacterial blight in Tapaswini, an elite rice cultivar, through marker-assisted selection. *Euphytica*. 192:87-96.
- Du, PV. & LC. Loan. 2007. Improvement of the rice breeding cropping system in the Mekong Delta. *Omonrice*. 15: 12-20.
- Fatimah, TP. Priyatno, SH. Fadlillah, Hermanto, M. Baroya, Mahrup, Wawan, D. Sasongko, Y. Suryadi, & TS. Kadir. 2014. Isolation and Disease Assessment of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* from Java Island and Pathogenic

- Assay on Near Isogenic Lines with Different Resistant Genes. *Jurnal Biologi Indonesia* 10:237-245.
- Hajjar, R., & T. Hodgkin. 2007. The use of wild relatives in crop improvement: a survey of developments over the last 20 years. *Euphytica* 156: 1-13.
- Huang, N., ER. Angeles, J. Domingo, G. Magpantay, S. Singh, G. Zhang, N. Kumaravadivel, J. Bennett, & GS. Khush. 1997. Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: market-assisted selection using RFLP and PCR. *Theoretical Applied Genetical.* 95: 313-320.
- Iyer, AS., & SR. McCouch. 2004. The rice bacterial blight resistance gene *xa5* encodes a novel form of disease resistance. *Molecular Plant Microbe Interact.* 17: 1348-1354.
- Iyer, AS., & SR. McCouch. 2007. Recessive resistance genes and the *Oryza sativa-Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* pathosystem. *Molecular Plant Microbe Interaction.* 20: 731-739.
- Kadir, TS. 2009. Menangkal HDB dengan menggilir varietas. *Warta Penelitian Pertanian.* 31:1-3.
- Khush, GS., E. Bacalangco, & T. Ogawa. 1990. A new gene for resistance to bacterial blight from *O. longistaminata*. *Rice Genet. Newslett.* 7: 121-122.
- Kumar, J., AK. Choudhary, RK. Solanki, & A. Pratap. 2011. Towards MAS in pulses: a review. *Plant Breeding* 130: 297-313.
- Kottapalli, KR., ML. Narasu, & KK. Jena. 2010. Effective strategy for pyramiding three bacterial blight resistance genes into fine grain rice cultivar, Samba Mahsuri, using sequence tagged site markers. *Biotechnology Letter.* 32: 989-996.
- Liu, DON., CR. Pamela, & JB. Adam. 2006. *Xanthomonas oryzae* pathovars: model pathogen of a model crop. *Molecular Plant Pathology.* 7: 303-324.
- Margana, DM. 2012. Ciharang Varietas Fenomenal. Jawa Barat: Dinas Pertanian dan Tanaman Pangan Propinsi Jawa Barat.
- Morillo, SA., & FE. Tax. 2006. Functional analysis of receptor-like kinases in monocots and dicots. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 460-469.
- Nayar, NM. 2014. *Origins & Phylogeny of Rices.* Academic Press. Elsevier. USA.
- Oka, HI., & H. Morishima. 1967. Variations in the breeding systems of a wild rice, *Oryza perennis*. *Evolution* 21: 249-258.
- Pandey, MK., NS. Rani, RM. Sundaram, GS. Laha, MS. Madhav, K. Srinivasarao, I. Sudharshan, Y. Hari, GS. Varaprasad, LVS. Rao, K. Suneetha, AKP. Sivaranjani, & BC. Viraktamath. 2013. Improvement of two traditional Basmati rice varieties for bacterial blight resistance and plant stature through morphological and marker-assisted selection. *Molecular Breeding* 31: 239-246.
- Poehlman, JM. 1983. *Breeding Field Crops.* The Avi Publishing Company. Inc. Westport.
- Ragimekula, N., NN. Varadarajula, SP. Mallapuram, G. Gangimani, RK. Reddy, & HR. Kondreddy. 2013. Marker assisted selection in disease resistance breeding. *Journal of Plant Breeding and Genetics.* 1: 90-109.
- Rajpurohit, D., R. Kumar, M. Kumar, P. Paul, A. Awasthi, PO. Basha, A. Puri, T. Jhang, K. Singh, & HS. Dhaliwal. 2011. Pyramiding of two bacterial blight resistance and a semi dwarfing gene in Type 3 Basmati using marker-assisted selection. *Euphytica* 178: 111-126.
- Reny, H., BS. Purwoko, & IS. Dewi. 2009. Keragaman genetik dan karakter agronomi galur haploid ganda padi gogo dengan sifat-sifat tipe baru hasil kultur antera. *Jurnal Agronomi.* 37: 87-94.
- Ronald, PC., B. Albano, R. Tabien, L. Abenes, K. Wu, SR. McCouch, & SD. Tanksley. 1992. Genetic and physical analysis of the rice bacterial blight disease resistance locus, *Xa21*. *Molecular Genetics and Genomics.* 236:113-120.

- Rozakurniati. 2010. Inpari 13 padi sangat genjah dan tahan wereng coklat. *Warta Penelitian dan Pengetmbangan Pertanian*. 32: 7-9.
- Schorneck, S., A. Meyer, P. Romer, T. Jordan, & T. Lahaye. 2006. Gene for gene mediated recognition of nuclear target AvrBs3-like bacterial effector proteins. *Journal of Plant Physiology*. 163: 256-272.
- Shanti, ML., VV. Shenoy, GL. Devi, VM. Kumar, P. Premalatha, GN. Kumar, HE. Shashidhar, UB. Zehr, & WH. Freeman. 2010a. Marker-assisted breeding for resistance to bacterial leaf blight in popular cultivars and parental lines of hybrid rice. *Journal of Plant Pathology*. 92: 495-501.
- Shanti, ML., GL. Devi, GN. Kumar, & HE. Shashidhar. 2010b. Molecular marker-assisted selection: A tool for insulating parental lines of hybrid rice against bacterial leaf blight. *International Journal of Plant Pathology*. 1: 114-123.
- Singh, A., VK. Singh, SP. Singh, RTP. Pandian, RK. Ellur, D. Singh., PK. Bhowmick, KS. Gopala, M. Nagarajan, KK. Vinod, UD. Singh, KV. Prabhu, TR. Sharma, T. Mohapatra, & AK. Singh. 2012. Molecular breeding for the development of multiple disease resistance in Basmati rice. doi: 10.1093/aobpla/pls029.<http://www.aobplants.oxfordjournals.org>.
- Song, W., G. Wang, L. Chen, H. Kim, L. Pi, T. Holsten, J. Gardner, B. Wang, W. Zhai, L. Zhu, *et al.* 1995. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science*. 270:1804-1806.
- Sudir, B. Nuryanto, & TS. Kadir. 2012. Epidemiologi, patotipe, dan strategi pengendalian penyakit hawar daun bakteri pada tanaman padi. *Iptek Tanaman Pangan*. 7: 79-87.
- Suh, JP., JU. Jeung, TH. Noh, YC. Cho, SH. Park, HS. Park, MS. Shin, CK. Kim, & KK. Jena. 2013. Development of breeding lines with three pyramided resistance genes that confer broad-spectrum bacterial blight resistance and their molecular analysis in rice. *Rice*. 6: 5-15.
- Sundaram, RM., MR. Vishnupriya, SK. Biradar, GS. Laha, GA. Reddy, NS. Rani, NP. Sarma, & RV. Sonti. 2008. Marker assisted introgression of bacterial blight resistance in Samba Mahsuri, an elite indica rice variety. *Euphytica*. 160: 411-422.
- Taringan, S., & Wiryanta W. 2003. *Bertanan Cabai Hibrida secara Intensif*. Agromedia Pustaka. Jakarta.
- Temnykh, *et al.* 2000. Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 100: 697.
- Vaithiyalingan, M. & N. Nadarajan. 2010. Heterosis for yield contributing characters in inter sub-specific crosses of rice. *Journal of Plant Breeding*. 1: 305-310.
- Wang, G., W. Song, D. Ruan, S. Sideris, & PC. Ronald. 1996. The cloned gene, *Xa21*, confers resistance to multiple *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* isolates in transgenic plants. *Molecular of Plant Microbe Interaction*. 9: 850-855.
- Yamasaki, RAD., N. Murata, & T. Suwa. 2006. Studies on the culture of *Xanthomonas oryzae*. *Journal of Bacteriology* 42: 946-949.
- Ye, G. & KF. Smith. 2008. Marker-assisted gene pyramiding for inbred line development: Basic principles and practical guidelines. *International Journal of Plant Breeding*. 2: 1-10.
- Yunus, M., 1998. Studi pautan marka molekuler dengan gen ketahanan terhadap bakteri hawar daun (Gen *xa5*) pada padi. [Tesis]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Zhan, XD., HP. Zhou, RY. Chai, JY. Zhuang, SH. Cheng, & LY. Cao. 2012. Breeding of R8012, a rice restorer line resistant to blast and bacterial blight through marker-assisted selection. *Rice Science*. 9: 29-35.