

IDENTIFIKASI GEN YANG MENGONTROL LEBAR GABAH DENGAN MENGGUNAKAN GALUR INTROGRESI *ORYZA GLUMAEPATULA* PADA PADI

Sobrizal* dan A. Yoshimura**

* Puslitbang Teknologi Isotop dan Radiasi, BATAN, Jakarta

** Fakultas Pertanian Universitas Kyushu, Fukuoka, Jepang

ABSTRAK

IDENTIFIKASI GEN YANG MENGONTROL LEBAR GABAH DENGAN MENGGUNAKAN GALUR INTROGRESI *ORYZA GLUMAEPATULA* PADA PADI.

Identifikasi gen yang mengontrol lebar gabah padi telah dilakukan dengan menggunakan galur introgresi padi liar *Oryza glumaepatula* dan bantuan marka RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Galur introgresi tersebut mempunyai *background* genetik *Oryza sativa*, cv. Taichung 65. Gen yang diidentifikasi diberi nama *width of kernel* yang disingkat dengan *wk(t)*. Pada lokus *wk(t)* alil Taichung 65 yang mengekspresikan gabah lebar bersifat resesif sedangkan alil *Oryza glumaepatula* yang mengekspresikan gabah agak ramping bersifat dominan. Gen *wk(t)* terletak diantara marka *Y1060L* dengan *R566* dan *co-segregated* dengan marka *R569* dan *C1004* pada khromosom 5.

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF A GENE CONTROLLING KERNEL WIDTH USING *ORYZA GLUMAEPATULA* INTROGRESSION LINES IN RICE.

Identification of the gene for kernel width was conducted using *Oryza glumaepatula* introgression lines with a help of RFLP markers. The genetic background of these lines was *Oryza sativa*, cv. Taichung 65. The identified gene was designated as width of kernel (*wk(t)*). At this locus, the Taichung allele expressing wide kernel was recessive while the *Oryza glumaepatula* allele expressing narrow kernel was dominant. The *wk(t)* was located between *Y1060L* and *R566*, and co-segregated with *R569* and *C1004* on chromosome 5.

PENDAHULUAN

Ukuran gabah merupakan bagian dari komponen hasil dan merupakan salah satu kriteria dalam menentukan kualitas gabah padi. Batasan ukuran gabah yang disukai sangat luas, tergantung kepada konsumen. Walaupun demikian kebanyakan konsumen dari sebagian besar Asia Tenggara, China dan Amerika lebih menyukai bentuk gabah yang ramping, sedangkan konsumen dari Jepang, Korea dan Taiwan lebih menyukai bentuk gabah yang lebar. Setelah dimasak, gabah ramping cenderung menjadi kering, halus dan berderai, sedangkan gabah yang medium atau yang lebar cenderung menjadi bergumpal, basah dan kenyal (1). Variasi yang besar pada ukuran gabah sangat diperlukan dalam program pemuliaan tanaman baik untuk meningkatkan produksi maupun untuk meningkatkan kualitas gabah sesuai dengan selera.

Keragaman genetik yang diekspresikan dalam bentuk variasi yang besar dari suatu sifat dapat diciptakan antara lain dengan persilangan. Melakukan beberapa kali persilangan balik pada

induk *recurrent* menjadikan porsi genom tanaman donor semakin kecil dan bahkan hanya tinggal sepotong saja pada keturunannya. Tanaman atau galur yang mengandung potongan kecil genom atau khromosom yang berasal dari tanaman donor disebut juga galur introgresi. Dengan bantuan marka DNA, posisi potongan khromosom yang diintrogresikan tersebut pada peta khromosom dapat diketahui. Melalui seleksi, posisi potongan khromosom yang diintrogresikan itu dapat menjadi bervariasi sehingga secara bersama-sama dapat menutup semua genom tanaman donor. Galur introgresi yang komplet dapat digunakan selain untuk mengidentifikasi berbagai sifat tanaman seperti aborsi gamet pada padi (2), umur tanaman padi (3), komponen hasil tanaman tomat (4), juga dapat digunakan sebagai material dasar pada program pemuliaan tanaman (5).

SOBRIZAL dkk. (6) mengembangkan galur padi introgresi dimana *Oryza glumaepatula* sebagai induk donor dan Taichung 65 sebagai induk *recurrent*. *Oryza glumaepatula* adalah sejenis padi liar dari Brazil yang mempunyai bentuk gabah yang sangat ramping, sedangkan Taichung 65

adalah padi Japonika dengan bentuk gabah agak lebar. Pada penelitian ini, dengan menggunakan galur introgresi padi *Oryza glumaepatula* diidentifikasi suatu gen yang mengontrol lebar gabah.

BAHAN DAN METODA

Bahan tanaman yang digunakan adalah galur introgresi padi *Oryza glumaepatula* (6). Galur introgresi yang membawa potongan khromosom *Oryza glumaepatula* pada khromosom 2 dan 5 disilangkan dengan Taichung 65. Segregasi tanaman yang memiliki gabah lebar dan gabah agak ramping diamati pada populasi F_2 . Kesesuaian perbandingan segregasi diuji dengan *Chi-square*.

Untuk mengetahui posisi gen yang mengontrol lebar gabah, analisa RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) dilakukan pada 56 tanaman F_2 . Untuk keperluan analisa tersebut DNA diekstraksi dari daun setiap tanaman F_2 dan daun tanaman induknya dengan menggunakan metoda CTAB (cetyltrimethyl amonium bromida) seperti yang dikemukakan oleh ROGERS dan BENDITH (7). DNA yang diperoleh didigesti dengan enam macam enzim restriksi (*Bam*HI, *Bgl*II, *Dra*I, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III), dielektroforesis pada 0,8% agarose gel, dan dibloting pada nilon membran dengan menggunakan metoda SOUTHERN (8). Prob DNA yang digunakan adalah prob DNA yang sudah dipetakan oleh HARUSHIMA, dkk. (9). Prob tersebut diisolasi dari plasmid dan diradiolabel dengan [32 P]-dCTP secara metoda random hexamer (10). Prob yang sudah dilabel dihibridisasi dengan DNA tanaman yang sudah dibloting pada nilon membran. Setelah dihibridisasi, membran dicuci dengan larutan 6 x SSC, 0,2 % SDS selama 30 menit (dua kali), dan 2 x SSC, 0,2 % SDS selama satu jam, selanjutnya diekspos pada *x-ray film* selama lebih kurang 24 jam, dan seterusnya diamati segregasi pola pita Taichung 65 dan *Oryza glumaepatula* yang muncul pada *x-ray film*. Soft ware MAP-MAKER/EXP 3.0 (11) digunakan untuk menganalisa keterkaitan (*linkage*) dan memetakan gen yang mengontrol lebar gabah berdasarkan pola segregasi marka dan penotipe tanaman pada populasi F_2 .

HASIL DAN PEMBAHASAN

Padi liar *Oryza glumaepatula* (IRGC105668) mempunyai bentuk gabah sangat ramping dengan ukuran lebih kurang 10,0 x 2,5 mm, sedangkan Taichung 65 mempunyai bentuk gabah lebar dengan ukuran lebih kurang 7,8 x 3,8 mm. Pada populasi F_2 dari persilangan galur introgresi *Oryza glumaepatula* yang membawa

potongan khromosom *Oryza glumaepatula* pada khromosom 2 dan 5 dengan Taichung 65 terlihat segregasi antara tanaman yang mempunyai gabah lebar dengan ukuran lebih kurang 7,8 x 3,8 mm dan tanaman yang mempunyai gabah agak ramping dengan ukuran lebih kurang 7,8 x 3,4 mm (Tabel 1, Gambar 1). Karena genom atau potongan khromosom *Oryza glumaepatula* yang masuk pada populasi F_2 hanya pada khromosom 2 dan 5, sedangkan genom yang lainnya adalah genom Taichung 65, maka diduga perbedaan lebar gabah antara 3,8 dengan 3,4 mm disebabkan oleh gen yang terletak pada potongan khromosom *Oryza glumaepatula* tersebut. Pada tabel 1 terlihat tanaman dengan gabah lebar sebanyak 17 tanaman dan tanaman dengan gabah agak ramping sebanyak 39 tanaman. Hasil ini sesuai dengan segregasi mono-genik (1 : 3) menunjukkan bahwa lebar gabah pada penelitian ini dikontrol oleh satu gen.

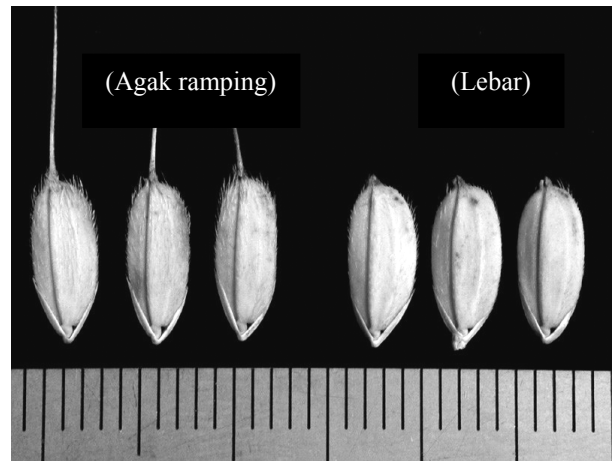
Dari analisa *linkage* antara gabah lebar dengan marka RFLP pada khromosom 2 dan 5 terlihat bahwa lebar gabah *co-segregated* dengan marka RFLP *C1004* pada khromosom 5 (Tabel 2). Pada marka *C1004*, tujuh belas tanaman yang mempunyai gabah lebar membawa alil Taichung 65 homozigot, dan tiga puluh sembilan tanaman yang mempunyai gabah agak ramping membawa alil *Oryza glumaepatula* homozigot atau heterozigot. Hasil ini lebih menegaskan lagi bahwa sifat gabah lebar pada penelitian ini dikontrol oleh satu gen. Taichung 65 dengan gabah lebar mempunyai alil resesif sedangkan *Oryza glumaepatula* mempunyai alil yang dominan.

KAJIYA, dkk. (12) melaporkan bahwa gen *wgl(t)*, mengontrol lebar gabah, diidentifikasi dengan menggunakan progeni yang berasal dari persilangan balik antara varietas Nipponbare dengan Kasalath, terkait dekat sekali dengan marka *Y1060L* pada khromosom 5. Dengan demikian, besar kemungkinan gen yang mengontrol lebar gabah pada penelitian ini alelik dengan gen *wgl(t)* tersebut. Sungguhpun demikian gen mengontrol lebar gabah yang diidentifikasi pada penelitian ini untuk sementara diberi nama *width of kernel* yang disingkat dengan *wk(t)* sampai dilakukan *allelic test* diantara kedua gen ini untuk membuktikan apakah kedua gen tersebut alelik atau tidak.

Untuk memetakan gen *wk(t)*, dilakukan analisa RFLP antara lebar gabah (*wk(t)*) dengan marka RFLP yang terletak disekitar *C1004* pada khromosom 5. Hasil analisa menunjukkan bahwa gen *wk(t)* terletak diantara marka *Y1060L* dengan *R566*, dengan jarak 15,7 dan 6,4, berturut-turut (Gambar 2).

Oryza glumaepatula mempunyai gabah sangat ramping, yaitu dengan ukuran lebih kurang 10,0 x 2,5 mm. Sedangkan tanaman F₂ yang membawa alil *Oryza glumaepatula* pada lokus *wk(t)* hanya mempunyai gabah agak ramping, dengan ukuran lebih kurang 7,8 x 3,4 mm. Berdasarkan hal ini dapat diduga bahwa masih ada gen lain yang berperan dalam menentukan lebar atau ukuran gabah selain gen *wk(t)* yang sudah diidentifikasi. Untuk mempelajari dan mengetahui gen lain tersebut perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan galur-galur lain dari galur introgresi *Oryza glumaepatula*.

Pada populasi F₂ yang dianalisa, terlihat juga bahwa gabah agak ramping terkait erat sekali dengan sifat berbulu (*awned*) (Gambar 1). Gen yang mengontrol bulu ini kemungkinan gen *An7(t)* yang diidentifikasi oleh KURAKAZU, dkk. (13) dengan menggunakan galur introgresi padi liar *Oryza meridionalis*.



Gambar 1. Penotipe gabah agak ramping dan gabah lebar ditemukan Segregasi pada populasi F₂ dari persilangan galur introgresi *Oryza glumaepatula* dengan *Oryza sativa* cv. Taichung 65.

KESIMPULAN

Dengan menggunakan galur introgresi *Oryza glumaepatula* dan bantuan marka RFLP telah diidentifikasi suatu gen yang mengontrol lebar gabah padi. Gen tersebut diberi nama *width of kernel (wk(t))*. Gen *wk(t)* terletak diantara marka *Y1060L* dengan *R566* pada khromosom 5.

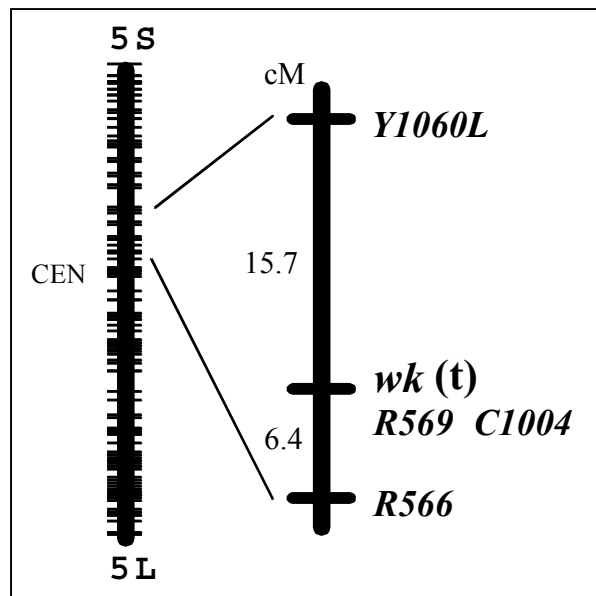
Tabel 1. Segregasi bentuk lebar gabah pada populasi F₂ dari persilangan galur introgresi *Oryza glumaepatula* dengan *Oryza sativa*, cv. Taichung 65.

Populasi	Penotipe Tanaman		Total	X ²
	Gabah lebar	Gabah agak ramping		
F ₂	17	39	56	0,86 ^{ns}

Tabel 2. Hubungan antara lebar gabah dengan genotipe pada *C1004* pada populasi F₂ dari persilangan galur introgresi *Oryza glumaepatula* dengan *Oryza sativa*, cv. Taichung 65.

Penotipe	Genotipe pada <i>C1004</i>		
	TT	TG	GG
gabah lebar	17	0	0
Gabah agak ramping	0	31	8

Keterangan;
TT, TG dan GG adalah alil Taichung 65 homozigot, heterozigot dan *Oryza glumaepatula* homozigot.



Gambar 2. Linkage map khromosom 2 yang memperlihatkan lokasi *wk(t)*. Framework map dikutip dari Harusima, dkk. (9).

DAFTAR PUSTAKA

- JULIANO, B. O., Rice chemistry and technology, 2nd edn. American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paoul, Minn. (1985).
- SOBRIZAL, MATSUZAKI, Y., SANCHEZ, P. L., IKEDA, K. and YOSHIMURA, A., Identification of a gene for male gamete abortion in backcross progeny of *Oryza sativa* and *Oryza glumaepatula*, Rice Genet. Newslt. 17 (2000) 59.

3. SANCHEZ, P. L., SOBRIZAL, IKEDA, K., YASUI, H. and YOSHIMURA, A., Linkage analysis of late heading genes using *Oryza glumaepatula* introgression lines, Rice Genet. Newslt. 17 (2000) 46.
4. ESHED, Y. and ZAMIR, D., An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield-associated QTL, Genetics 141 (1995) 1147.
5. ZAMIR, D., Exotic libraries in plant breeding, Abstract of genomic approaches to functional analysis of plant genes (2001).
6. SOBRIZAL, IKEDA, K., SANCHEZ, P. L., DOI, K., YASUI, H., ANGELES, E. R., KUSH, G. S., and YOSHIMURA, A., Development and evaluation of *Oryza glumaepatula* Steud. introgression lines in rice, *Oryza sativa* L., Presented at the International Plant and Animal Genome Conference VIII, January 9-12, 2000, San Diego, CA, USA.
7. ROGERS, S. O., and BENDITH, A. J., Extraction of DNA from plant tissues, Plant Molecular Biology Manual A6 (1988) 1.
8. SOUTHERN, E. M., Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, J. Mol. Biol. 98 (1975) 503.
9. HARUSHIMA, Y., YANO, M., SHOMURA, A., SATO, M., SHIMANO, T., KUBOKI, Y., YAMAMOTO, T., LIN, S. Y., ANTONIO, B. A., PARCO, A., KAJIYA, H., HUANG, N., YAMAMOTO, K., NAGAMURA, Y., KURATA, N., KHUSH, G. S., and SASAKI, T., A high-density rice genetic linkage map with 2275 markers using a single F₂ population, Genetics 148 (1998) 479.
10. FEINBERG, A. P., and VOGELSTEIN, B., A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity, Anal. Biochem. 32 (1983) 6.
11. LANDER, E. S., GREEN, P., ABRAHAMSON, J., BARLOW, A., DALY, M. J., LINCOLN, S. E. and NEWBURG, L., MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations, Genomics 1 (1987) 174.
12. KAJIYA, H., YANO, M. and SASAKI, T., Molecular tagging of the gene *wgln(t)* conferring glum width in rice, Japan. J. Breed. 45 (Suppl. 1) (1995) 77.
13. KURAKAZU, T., SOBRIZAL, and YOSHIMURA, A., RFLP mapping of the genes for awn on chromosome 4 and 5 in rice using the *Oryza meridionalis* introgression lines, Rice Genet. Newslt. 18 (2001) in press.

DISKUSI

MASRIZAL

Setelah diketahui gen yang mengontrol lebar gabah, *Wk(t)* ini, apakah tidak perlu di registrasi di tingkat internasional, atau dipublikasikan secara luas? Supaya penemuan ini tidak diklaim oleh orang lain menjadi penemunya.

SOBRIZAL

Gen *Wk(t)* perlu diregistrasi di tingkat internasional dan dipublikasi secara luas karena penemuan ini dikerjakan bersama-sama dengan Universitas Kyushu dan dilakukan di Universitas Kyushu, maka pengajuannya tentu juga melalui/bersama Universitas Kyushu. Untuk itu kami su-

dah menyiapkan segala sesuatu yang diperlukan untuk registrasi tersebut. Registrasi biasanya dilakukan di IRRI (International Rice Research Institute).

A. NASROH

Hubungan teknik ini dengan teknik isotop dan radiasi tidak tampak dalam pendahuluan maupun pembahasan. Karena diketahui bahwa sifat gabah ramping bersifat dominan. Apakah dapat dikatakan bahwa kecenderungan mutasi radiasi menuju ke gabah gemuk? Karena kalau tidak salah mutasi radiasi cenderung menuju resesif. Kalau benar, apakah hal ini tampak dalam praktek?

SOBRIZAL

- Isotop ^{32}P digunakan untuk melabel marka RFLP yang digunakan.
- Berdasarkan pengalaman, memang kecenderungan mutasi radiasi menuju ke arah resesif (Ismachin, personel komunikasi) tetapi bukan berarti selalu dari gabah ramping ke gabah gemuk, karena sifat gabah ramping tidak selalu dominan. Kebetulan saja gen Wk(t) pada khromosom 5 sifat ramping yang dominan, tetapi pada penelitian kami yang lain (belum dipublikasi) kami menemukan juga gen yang mengontrol lebar gabah terletak pada khromosom 2. Disini gabah gemuk yang bersifat dominan.

BAKHHTIAR

Berdasarkan analisis X^2 segregasi gen pengontrol lebar gabah mengikuti Hk mandel 3:1 dan disebutkan dikontrol oleh satu gen. Kenapa Bapak masih meragukan hasil penelitian tersebut (dikontrol oleh satu gen), sehingga masih disarankan untuk meneliti ulang keterlibatan gen-gen lain dalam mengontrol lebar gabah ?

SOBRIZAL

Kami tidak meragukan hasil penelitian yang sudah kami lakukan. Kami tidak menyarankan untuk meneliti ulang. Yang kami sarankan adalah mengidentifikasi gen lain yang mengontrol lebar gabah dengan menggunakan galur introgresi yang lain; karena ukuran gabah *Oryza glumepatula* (induk donor) $\pm 10 \times 2,5$ mm, *oryza sativa* Cv. Taichung 65 (induk recurrent) $+ 7,8 \times 3,8$ mm, sedangkan ukuran gabah IL 99 yang digunakan pada penelitian ini $+ 7,8 \times 3,4$ mm. Berarti masih ada gen lain yang mengontrol lebar gabah selain Wk(t) yang sudah diidentifikasi.

AGUS DARMAWAN

Sebelumnya saya mengucapkan selamat kepada Bapak yang telah menemukan gen yang diberi nama width oh kernet. Bagaimana rasa dan hasil persilangan dan ukuran dari gabah padi tersebut dan apakah hasil riset Bapak bisa diterapkan di Indonesia ?

SOBRIZAL

Terima kasih atas ucapan selamatnya.

- Rasa nasi padi IL 99 atau persilangannya saya belum mencoba karena kami berkonsentrasi hanya pada lebar gabah.
- Saya belum mencoba menerapkan di Indonesia walaupun banyak kendalanya, terutama fasilitas penelitian dan dana.

MARIA LINA

- Apabila dipakai introgresi lain, apakah marka RFLP-nya sama untuk mengekspresikan gen yang sama ?
- Mengingat pemakaian marka RFLP adalah mahal, apakah mungkin untuk melanjutkan galur introgresi lain ataupun gen lain yang mengekspresikan gabah lebar ?
- Apakah mungkin untuk mengklon gen Wk (T) sehingga dapat dengan mudah untuk mengekspresikannya pada tanaman padi lain yang produksi gabahnya kurang baik ?

SOBRIZAL

- Kalau digunakan galur introgresi lain tujuannya untuk mengidentifikasi gen lain, tentu markanya akan berbeda.
- Memang penggunaan marka RFLP mahal, tetapi kalau kita ingin mengidentifikasi gen lain dengan menggunakan galur introgresi lain tentu mungkin saja bisa dilakukan.
- Mengklon gen yang sudah diidentifikasi mungkin saja memang arah kegiatan dari partner kita (Universitas Kyushu) ke arah kloning.

