

Mutasi pada Beberapa Kandidat Galur Mutan Pemulih Kesuburan Tanaman Padi

Rice Mutation on Candidate of Restorer Mutant Lines

Sobrizal¹

Diterima 23 Februari 2007/Disetujui 27 Juli 2007

ABSTRACT

Cytoplasmic male sterility (CMS) system has largely been applied in development of rice hybrid varieties. In this system the maintainer and restorer lines are necessary to maintain the CMS and to restore the pollination abilities of hybrid plants, respectively. In this study, rice candidate of restorer mutant lines were developed through irradiation of CMS seeds by 0.2 kGy gamma rays. Some mutations indicated by polymorphism between mutants and original plants were observed through simple sequence repeat (SSR) marker genome survey in six mutant lines. Frequencies of polymorphism varied depend on the lines, range from 8.5 to 18.3%. No common marker showed polymorphism between six mutant lines and original plants indicating that the mutant lines do not carry the same restoring genes. Nevertheless, allelic tests or linkage studies using segregating populations are needed for confirmation. This result should be useful as initial information on genetic studies of restoring genes induced by gamma ray irradiation as well as for application of these genes in hybrid rice breeding program.

Key words : Mutation, restorer mutant lines, hybrid rice

PENDAHULUAN

Sebagai tanaman menyerbuk sendiri, produk riset pemuliaan padi yang dikenal selama ini adalah jenis inbrida. Sejak ilmuwan Cina berhasil mengembangkan dan menggunakan padi hibrida pada akhir tahun 1970an, teknologi padi hibrida menarik perhatian para peneliti di berbagai belahan dunia. Indonesia sudah melepas 31 varietas hibrida, baik oleh lembaga riset pemerintah maupun dari introduksi oleh perusahaan benih swasta, namun pengembangan jenis hibrida di lapangan masih terbatas. Varietas padi hibrida dengan sifat heterosis yang dimilikinya mempunyai potensi hasil 15 – 30% lebih tinggi dari pada varietas padi inbrida (Yuan, 1994; Fujimura *et al.*, 1996). Penanaman varietas padi hibrida tentu akan membantu dalam memenuhi kebutuhan pangan nasional.

Penggunaan sistem mandul jantan (*male sterility*) merupakan persyaratan mutlak dalam mengeksploitasi *heterosis* pada tanaman padi. Ada beberapa sistem mandul jantan yang diketahui, yaitu *cytoplasmic genetic male sterility* (CMS), *environmental sensitive genetic male sterility* dan *chemical induced male sterility* (Virmani *et al.*, 1997). Dari ketiga sistem itu hanya CMS yang sudah dipakai secara luas dalam pengembangan varietas padi hibrida.

CMS terjadi disebabkan oleh interaksi antara genom sitoplasmik dengan inti, dan diturunkan secara maternal (Virmani *et al.*, 1997). Dalam pemuliaan

varietas hibrida yang menggunakan sistem CMS, selain galur CMS diperlukan juga galur pelestari (*maintainer*) dan galur pemulih kesuburan (*restorer*). Galur pelestari diperlukan untuk melestarikan galur CMS karena galur CMS tidak dapat menghasilkan biji sendiri, sedangkan galur pemulih kesuburan berfungsi untuk memulihkan kemampuan menyerbuk sendiri dari tanaman hibrida. Secara komersial sistem CMS juga telah digunakan dalam memproduksi benih hibrida pada tanaman yang mempunyai nilai ekonomi tinggi (Newton, 1988).

Pada pemuliaan tanaman, mutasi induksi merupakan cara yang efektif untuk memperluas keragaman genetik. Berbagai mutagen kimia maupun mutagen fisika telah digunakan untuk menginduksi mutan. Akhir-akhir ini, lebih dari 2500 varietas mutan telah dilepas di berbagai negara, dan lebih dari separuhnya merupakan hasil iradiasi sinar gamma (www-mvd.iaea.org). Sebanyak 443 diantaranya adalah varietas mutan tanaman padi. Indonesia pertama kali melepas varietas mutan padi yaitu pada tahun 1982 dengan nama Atomita 1, dan sejak itu sudah 14 varietas mutan padi yang dilepas (Ismachin and Sobrizal, 2006). Sebagian besar dari varietas mutan padi tersebut merupakan hasil iradiasi sinar gamma dengan dosis 0,2 kGy. Yamaguchi *et al.*, (2006) juga menyimpulkan bahwa dosis 0,2 kGy merupakan dosis optimum penggunaan sinar gamma untuk mendapatkan frekuensi mutasi yang tinggi.

¹ PATIR-BATAN, Jl. Cinere Pasar Jumat, Kotak Pos 7002 JKSKL, Jakarta 12070

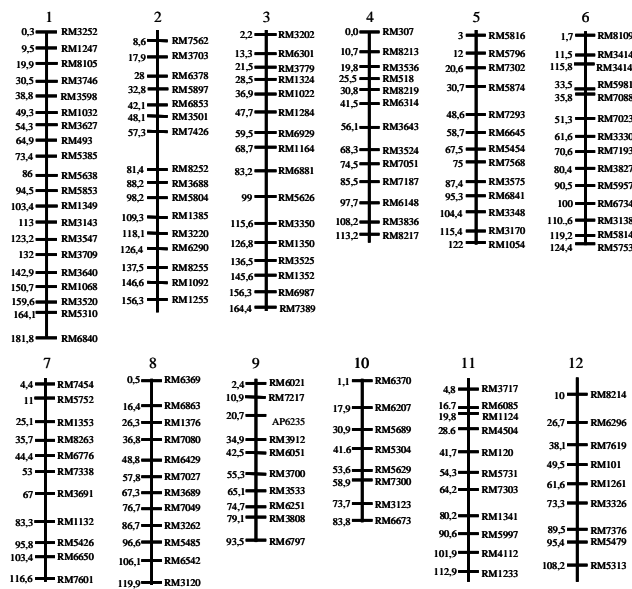
Penelitian ini bertujuan untuk membuat galur mutan pemulih kesuburan secara mutasi induksi melalui iradiasi biji CMS dengan sinar gamma dosis 0,2 kGy, dan melihat terjadinya mutasi pada kandidat galur mutan pemulih kesuburan melalui survei genom dengan menggunakan marka *simple sequence repeat* (SSR). Terjadinya mutasi dalam hal ini ditandai dengan terlihatnya *polymorfisme* antara mutan dengan tanaman asalnya.

BAHAN DAN METODA

Galur CMS yang ditemukan pada saat pembuatan galur introgresi *Oryza glumaepatula* (Sobrizal *et al.*, 1999) mempunyai genom sitoplasmik berasal dari padi liar *Oryza glumaepatula* dan genom inti dari padi budidaya *Oryza sativa*, cv. Taichung 65. Untuk menjaga kemurniannya, galur CMS dilestarikan dengan menggunakan serbuk sari (*pollen*) dari Taichung 65. Kandidat galur mutan pemulih kesuburan dibuat melalui iradiasi sinar gamma dosis 0.2 kGy pada 9000 biji CMS. Seleksi terhadap kemampuan tanaman menghasilkan biji dilakukan pada generasi M₁, M₂ dan M₃. Iradiasi biji dan seleksi pada generasi M₁ dilakukan pada tahun 2003, sedangkan seleksi pada generasi M₂ dan M₃ dilakukan pada tahun 2004. Iradiasi biji dan seleksi pada generasi M₁, M₂ dan M₃ dilakukan di PATIR-BATAN, Pasar Jumat, Jakarta. Pertanaman pada setiap generasi dilakukan di bak sawah yang terbuat dari semen dan tidak terisolasi secara ketat sehingga memungkinkan untuk terjadinya persilangan liar (*outcrossing*), mengingat CMS sangat peka terhadap persilangan liar. Sungguhpun demikian karena latar belakang genetik dari CMS adalah Japonica sedangkan tanaman yang ada di sekitarnya pada umumnya Indica,

kalaupun terjadi persilangan liar akan dapat dikenali pada generasi berikutnya.

Pada tahun 2005, biji M₄ yang berasal dari tanaman M₃ yang terseleksi ditanam dan diamati fertilitas serbuk sarinya. Gabah (*spikelet*) tanaman M₄ yang sehari sebelum antesis dipilih dan anteranya dikeluarkan untuk diamati serbuk sari yang melekat pada anter tersebut melalui pewarnaan dengan menggunakan 0,5% acetocarmine. Pada tahun yang sama, survei genom dengan menggunakan marka SSR (McCouch *et al.*, 2002) dilakukan pada enam kandidat galur mutan pemulih kesuburan yang terseleksi. Untuk itu, sebanyak 153 marka SSR dipilih secara acak dengan interval antara 10 – 15 cM hingga mencakup ke 12 khromosom tanaman padi secara merata (Gambar 1). DNA galur CMS, Taichung 65 dan enam kandidat galur mutan pemulih kesuburan diekstraksi secara alkali (Maxime and Meredith, 2000) dan digunakan sebagai *template* DNA pada reaksi *polymerase chain reaction* (PCR). Amplifikasi PCR dilakukan pada total volume 15 µl, terdiri dari: primer 20 pmol, Taq polymerase 0.03 U/µl (promega), 1 x buffer mix (gotaq), dNTP 40 µM dan H₂O. Kondisi PCR diatur sebagai berikut; 94 °C selama 5 menit sebagai *initial denaturation*, kemudian dilanjutkan dengan 35 X (95 °C – 10 detik; 55 °C – 20 detik; 72 °C – 20 detik). Produk PCR dipisahkan pada 0.4% *gel agarose* dengan pewarna *ethidium bromide*. Skening dilakukan dengan menggunakan *scanner typhoon* 9410. Pengamatan fertilitas serbuk sari dan survei genom kandidat galur mutan pemulih kesuburan dilakukan di *Biological Resources Laboratory, Japan International Research Center for Agricultural Sciences* (JIRCAS), Jepang.



Gambar 1. Peta keterpautan memuat marka SSR yang digunakan pada survei genom kandidat galur mutan pemulih. 1 – 12 adalah nomor khromosom; angka di sebelah kiri masing-masing khromosom adalah posisi marka yang digunakan (McCouch *et al.*, 2002).

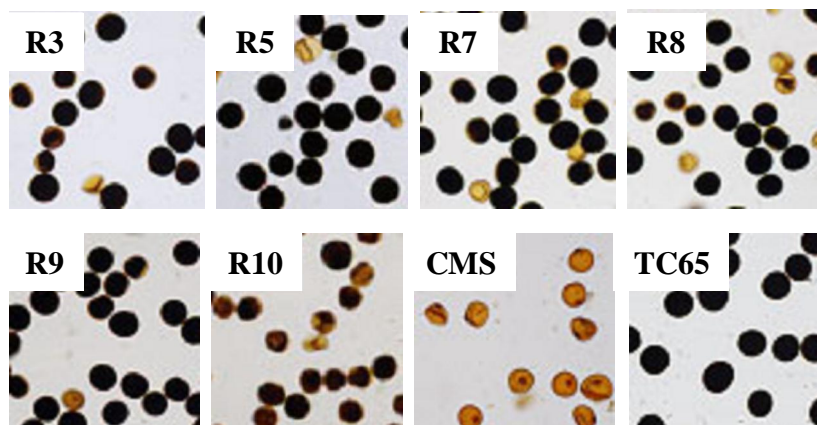
HASIL DAN PEMBAHASAN

Melalui pemuliaan silang balik (*backcross breeding*) antara spesies padi liar *Oryza glumaepatula* (Acc. IRGC 105668) dengan spesies padi budidaya *Oryza sativa* cv. Taichung 65 (Sobrizal *et al.*, 1999), diperoleh galur CMS. Pada persilangan untuk mendapatkan tanaman F₁, *Oryza glumaepatula* digunakan sebagai tanaman induk betina dan Taichung 65 sebagai induk jantan, selanjutnya disilangbalik lebih dari 10 kali dengan menggunakan serbuk sari Taichung 65. Dengan demikian galur CMS yang dihasilkan dipastikan mempunyai genom sitoplasmik berasal dari *Oryza glumaepatula* dan genom inti berasal dari Taichung 65.

Dari 9000 benih yang diiradiasi dan disemai, hanya 4316 tanaman M₁ yang dapat tumbuh baik sampai mencapai stadia keluar malai, dan diantaranya hanya 69 tanaman yang dapat menghasilkan biji dengan total biji M₂ sebanyak 93 biji. Semua biji M₂ yang diperoleh ditanam pada musim tanam berikutnya menjadi 93 tanaman M₂. Dari 93 tanaman M₂, hanya 10 tanaman yang dapat menghasilkan biji M₃. Tanaman M₂ yang tidak dapat menghasilkan biji M₃ kemungkinan tanaman yang berasal dari persilangan liar (*outcrossing*), bukan sebagai mutan. Selanjutnya biji M₃ dipanen terpisah menurut masing-masing tanaman asalnya. Untuk pemurnian, biji M₃ ditanam secara pedigri. Galur M₄ yang dihasilkan disebut kandidat galur mutan pemulih kesuburan, dan masing-masing galur M₄ diberi nama R1, R2, dan seterusnya R10. Sifat agronomi kandidat galur mutan pemulih kesuburan mirip dengan sifat agronomi Taichung 65 yang merupakan pelestari dari galur CMS. Dari 10 kandidat

galur mutan pemulih kesuburan yang diperoleh, 6 diantaranya digunakan pada penelitian ini.

Serbuk sari masing-masing kandidat galur mutan pemulih kesuburan yang diteliti disajikan pada Gambar 2. Sebagai pembanding juga diikuti serbuk sari dari galur CMS dan serbuk sari Taichung 65. Serbuk sari galur CMS terlihat 100 % steril yang ditandai dengan warna terang pada butiran serbuk sari, sedangkan serbuk sari Taichung 65 terlihat hampir 100% fertil yang ditandai dengan warna gelap. Walaupun belum sempurna fertilitas serbuk sari Taichung 65, fertilitas serbuk sari semua kandidat galur mutan pemulih kesuburan terlihat jauh lebih baik bila dibandingkan dengan fertilitas serbuk sari galur CMS. Hal ini sudah cukup untuk dapat membuahi bunga betina normal, karena menurut Namai dan Kato (1986), satu atau dua serbuk sari saja yang jatuh pada kepala putik (*stigma*) dapat berkembang menjadi biji. Tetapi kenyataannya fertilitas gabah semua kandidat galur mutan pemulih kesuburan masih agak rendah, yaitu sekitar 60 – 70 %. Rendahnya fertilitas gabah semua kandidat galur mutan pemulih kesuburan kemungkinan bersumber dari bunga betina galur pemulih kesuburan itu sendiri. Sterilnya bunga betina dapat disebabkan oleh interaksi alel pada satu lokus (Wan *et al.*, 1996), atau interaksi epistatik antara suatu lokus dengan lokus lainnya (Kubo dan Yoshimura, 2005). Pada penelitian ini mutasi dapat saja terjadi pada gen lain selain gen pemulih kesuburan, yang mempengaruhi fertilitas bunga betina, menyebabkan rendahnya fertilitas gabah. Untuk mengatasi hal ini, latar belakang genetik dari galur pemulih kesuburan perlu dibebaskan dari pengaruh iradiasi dengan mengembalikannya seperti latar belakang genetik galur CMS dengan menyilangbalik galur-galur pemulih kesuburan tersebut dengan galur CMS.

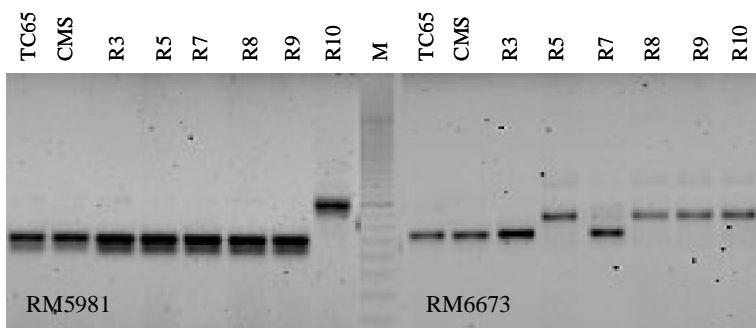


Gambar 2. Serbuk sari kandidat galur mutan pemulih kesuburan, CMS dan Taichung 65 (TC65)

Sebagaimana disebut di atas bahwa kandidat galur mutan pemulih kesuburan diperoleh melalui iradiasi sinar gamma biji CMS. Dengan demikian genom sitoplasmik kandidat galur mutan pemulih tersebut sama dengan genom sitoplasmik galur CMS yang berasal dari genom sitoplasmik padi liar *O. glumaepatula*, kalau pada genom sitoplasmik tidak terjadi mutasi. Untuk dapat menghasilkan serbuk sari yang fertil, tentu kandidat galur mutan pemulih kesuburan mempunyai gen pemulih kesuburan pada inti sel yang merupakan hasil mutasi dari iradiasi sinar gamma biji CMS.

Untuk mendeteksi mutasi pada kandidat galur mutan pemulih kesuburan, dilakukan survei genom pada kandidat galur mutan pemulih kesuburan tersebut dengan menggunakan marka SSR. Dengan telah diketahui posisi marka pada peta khromosom seperti

terlihat pada Gambar 1, maka posisi terjadinya mutasi juga akan dapat diketahui. Hasil survei disajikan pada Gambar 3 dan Tabel 1. Pada survei dengan menggunakan marka RM5981 (Gambar 3) terlihat pola pita yang sama (non polimorfisme) antara TC65, CMS, galur R3, R5, R7, R8, dan R9, sedangkan pola pita berbeda (polimorfisme) terlihat pada galur R10. Hal ini menunjukkan bahwa galur R10 telah mengalami mutasi pada lokus RM5981. Begitu juga mutasi yang ditandai dengan terlihatnya polimorfisme antara kandidat galur mutan pemulih kesuburan dengan tanaman asalnya telah terjadi pada lokus RM 6673 untuk galur, R5, R8, R9, dan R10. Demikian seterusnya hasil survei pada 6 kandidat galur mutan pemulih kesuburan yang menggunakan 153 marka disajikan pada Tabel 1.



Gambar 3. DNA *gel-blot* dari Taicung 65 (TC65), galur CMS dan 6 kandidat galur mutan pemulih kesuburan setelah diamplifikasi dengan primer RM5981 dan RM6673. M adalah marka berat molekul (20 base pair ladder DNA).

Tabel 1. Persentase marka yang memperlihatkan polimorfisme antara kandidat galur mutan pemulih kesuburan dengan tanaman asal (TC65 dan CMS)

Galur	Jumlah marka			Polimorfisme (%)
	Polimorfisme	Non Polimorfisme	Total	
R3	27	126	153	17.6
R5	28	125	153	18.3
R7	16	137	153	10.5
R8	20	133	153	13.1
R9	1	140	153	8.5
R10	18	135	153	11.8

Pada Tabel 1 terlihat frekuensi polimorfisme yang terjadi antara kandidat galur mutan pemulih kesuburan dengan tanaman asalnya. Frekuensi tertinggi yaitu pada galur R5 sebanyak 18.3% dan terendah pada galur R9 sebanyak 8.5%. Angka ini jauh lebih rendah bila dibandingkan dengan tingkat polimorfisme yang terdeteksi antara varietas Indica IR36 dengan varietas Japonica Koshihikari yaitu sebanyak 72% (data tidak dipublikasi). Namun demikian tingkat polimorfisme yang diperoleh antara kandidat galur mutan pemulih kesuburan dengan tanaman asalnya diperkirakan akan mampu untuk mendeteksi keterpautan antara marka dengan gen pemulih kesuburan.

Tidak ditemukan satupun marka yang sama yang memperlihatkan polimorfisme antara ke enam kandidat galur mutan pemulih kesuburan dengan tanaman asalnya mengindikasikan bahwa keenam kandidat galur mutan pemulih kesuburan tidak membawa gen pemulih kesuburan yang sama. Untuk memastikannya diperlukan *allelic test* atau studi keterpautan agar diketahui keterkaitan marka dengan gen pemulih kesuburan pada masing-masing kandidat galur mutan pemulih kesuburan. Selain itu, analisis genetik juga perlu diarahkan untuk mengetahui jumlah gen yang terlibat dalam pemulihan kesuburan serbuk sari. Semua informasi ini akan memberi kemudahan dalam penggunaan gen tersebut pada perakitan varietas padi hibrida.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat ditarik beberapa kesimpulan sebagai berikut;

1. Melalui iradiasi sinar gamma dengan dosis 0.2 kGy pada 9000 biji CMS didapat 10 kandidat galur mutan pemulih kesuburan.
2. Dari hasil survei genome menggunakan 153 marka SSR pada enam kandidat galur mutan pemulih kesuburan terdeteksi mutasi yang ditandai dengan terlihatnya polimorfisme antara kandidat galur mutan pemulih kesuburan dengan tanaman asalnya.
3. Frekuensi polimorfisme bervariasi pada masing-masing kandidat galur mutan pemulih kesuburan, yang terendah sebanyak 8.5% ditemukan pada galur R9 dan yang tertinggi 18.3% pada galur R5.
4. Tidak ditemukan satupun marka yang sama yang memperlihatkan polimorfisme antara ke enam kandidat galur mutan pemulih kesuburan dengan tanaman asalnya mengindikasikan bahwa keenam kandidat galur mutan pemulih kesuburan tidak membawa gen pemulih kesuburan yang sama. Untuk memastikannya perlu dilakukan *allelic test* atau studi keterpautan agar diketahui keterkaitan marka dengan gen tersebut pada masing-masing kandidat galur mutan pemulih kesuburan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami sampaikan kepada Dr. Hiroshi Tsunematsu, *Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS)* yang telah membantu menyediakan fasilitas untuk melakukan survei genom di laboratorium *Agrobiological Resources, JIRCAS, Tsukuba, Jepang*. Terima kasih juga kami sampaikan kepada kolega di Balai Iradiasi, Elektromekanik dan Instrumentasi, PATIR-BATAN yang telah membantu dalam iradiasi biji CMS, serta kepada bapak Carkum, Kel. Pemuliaan Tanaman PATIR-BATAN yang telah membantu pelaksanaan penelitian di lapangan.

DAFTAR PUSTAKA

- Fujimura, T., H. Akagi, M. Oka, A. Nakamura, R. Sawada. 1996. Establishment of a rice protoplast culture and application of an asymmetric protoplast fusion technique to hybrid rice breeding. *Plant Tissue Cult. Lett.* 13:243-247.
- Ismachin, M., Sobrizal. 2006. A significant contribution of mutation techniques to rice breeding in Indonesia. *Plant Mutation Reports.* 1:18-21.
- Kubo, T., A. Yoshimura. 2005. Epistasis underlying female sterility detected in hybrid breakdown in a Japonica-Indica cross of rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet.* 110: 346-355.
- McCouch, S. R., L. Teytelman, Y. Xu, K. B. Lobos, K. Clare, M. Walton, B. Fu, R. Maghirang, Z. Li, Y. Xing, Q. Zang, I. Kono, M. Yano, R. Fjellstrom, G. DeClerc, D. Scheneider, S. Cartinhour, D. Ware, L. Stein. 2002. Development and mapping of 2,240 new SSR markers of rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Res.* 9:199-207.
- Maxime, P., C. Meredith. 2000. Cereal DNA: rapid high-throughput extraction method for marker assisted selection. *Plant Molecular Biology reporter.* 18: 357-360.
- Namai, H., H. Kato. 1988. Improving pollination characteristics of japonica rice. *In: Hybrid Rice. International Rice Research Institute, Manila, Philippines.* p. 165-173.
- Newton, K. J. 1988. Plant mitochondrial genomes: Organization, expression and variation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol. Biol.* 39:503-532.

- Sobrizal, K. Ikeda, P. L. Sanchez, K. Doi, E. R. Angeles, G. S. Khush, A. Yoshimura. 1999. Development of *Oryza glumaepatula* introgression lines in rice, *Oryza sativa* L. RGN 16:107-108.
- Virmani, S. S., B. C. Viraktamath, C. L. Casal, R. S. Toledo, M. T. Lopez, J. O. Manalo. 1997. Hybrid Rice Breeding Manual. International Rice Research Institute, Los Banos, Laguna, Philippines, p 11.
- Wan, J., Y. Yamaguchi, H. Kato, H. Ikehashi. 1996. Two new loci for hybrid sterility in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). Theor Appl Genet. 92:183-190.
- Yamaguchi, H., T. Morishita, K. Degi, A. Tanaka, N. Shikazono, Y. Hase. 2006. Effect of carbon-ion irradiation on mutation induction in rice. Plant Mutation Reports. 1:25-27.
- Yuan, L. P. 1994. Increasing yield potential in rice by exploitation of heterosis. In: Virmani, S. S. (ed). Hybrid Rice Technology. New Developments and Future Prospects. International Rice Research Institute, Manila, Philippines, p 1-6.