

PENANDA RAPD UNTUK PENYAKIT PHYTOPHTHORA GUGUR BUAH PADA KELAPA

Runtunuwu, S.D.¹⁾, A. Hartana¹⁾, dan Suharsono²⁾,

¹⁾ Lab. Biologi Tumbuhan, PAU Ilmu Hayat IPB, Bogor

²⁾ Lab. Biologi Molekuler dan Seluler Tanaman, PAU Bioteknologi IPB, Bogor

ABSTRAK

Seleksi kelapa untuk ketahanan terhadap penyakit gugur buah, yang disebabkan oleh *Phytophthora palmivora* Butler, dilakukan dengan menginokulasi buah kelapa dengan patogen, sehingga seleksi tersebut tidak dapat dilakukan pada bibit kelapa. RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) bisa dijadikan sebagai penanda molekuler untuk menyeleksi secara tidak langsung ketahanan/kerentanan tanaman terhadap penyakit. Fragmen DNA tertentu yang diamplifikasi menggunakan primer acak bisa terpaut dengan gen-gen ketahanan tanaman terhadap penyakit. Tujuan penelitian ini adalah melacak penanda RAPD untuk ketahanan/kerentanan kelapa terhadap penyakit gugur buah yang diakibatkan oleh *P. palmivora*. DNA 5 pohon kelapa GSK (Genjah Salak) yang tahan dan 5 pohon kelapa GSK rentan terhadap penyakit tersebut diekstrak lalu diamplifikasi dengan 40 primer (Operon kit A dan B). Primer OB-17 menghasilkan polimorfisme DNA diantara tanaman kelapa GSK yang tahan dan rentan terhadap penyakit phytophthora, ditandai dengan adanya sebuah fragmen DNA berukuran 375 pb spesifik pada kelapa yang rentan.

Kata kunci : penanda molekuler, penyakit phytophthora kelapa, RAPD (*random amplified polymorphic DNA*), PCR (polymerase chain reaction), dan primer acak.

PENDAHULUAN

Penyakit busuk pucuk dan gugur buah, yang disebabkan oleh *Phytophthora palmivora* Butler (Bennett *et al.*, 1986), adalah salah satu penyakit penting pada tanaman kelapa di Indonesia (Novarianto dan Mahmud, 1991). Penyakit gugur buah menggugurkan buah kelapa muda sebelum matang panen. Sedangkan penyakit busuk pucuk mematikan tanaman kelapa dewasa (Warokka dan Mangindaan, 1993).

Pengendalian yang efektif bagi penyakit phytophthora tersebut belum ditemukan. Setiap tanaman kelapa yang terserang (terutama penyakit busuk pucuk) harus ditebang. Oleh karena itu perlu dirakit tanaman kelapa berproduksi tinggi yang tahan terhadap penyakit phytophthora (Novarianto *et al.*, 1994).

Program pemuliaan tanaman kelapa untuk ketahanan terhadap penyakit phytophthora meliputi beberapa kegiatan, seperti: seleksi individu pohon induk, persilangan dan seleksi hasil

silangan (Novarianto dan Mahmud, 1991). Seleksi tanaman kelapa untuk ketahanan terhadap penyakit *phytophthora* gugur buah kelapa dilakukan dengan menginokulasi buah kelapa dengan patogen (Sitepu *et al.*, 1988). Sehingga diperlukan waktu yang cukup lama untuk dapat menyeleksi suatu bibit kelapa yang diseleksi terhadap penyakit tersebut. Oleh karena itu perlu dicari suatu cara seleksi secara tidak langsung yang dapat menyeleksi ketahanan pohon kelapa terhadap penyakit *phytophthora* gugur buah kelapa sejak tanaman masih dalam stadia bibit. Penanda molekuler, seperti RAPD (*random amplified polymorphic DNA*), memungkinkan untuk digunakan dalam menyeleksi tanaman yang tahan terhadap penyakit pada tahap awal perkembangan tanaman (Melchinger 1990; Winter dan Kahl, 1995).

RAPD bisa digunakan sebagai penanda ketahanan tanaman terhadap suatu penyakit pada tingkat DNA karena adanya keterpautan antara gen ketahanan dengan sekuens DNA tertentu yang dapat digandakan dengan primer 10-mer acak. Fragmen DNA berukuran 1100 pb yang digandakan dengan primer OA14 terpaut dengan gen ketahanan *Up₂* tanaman kacang hijau terhadap penyakit karat (Miklas *et al.*, 1993). Fragmen DNA berukuran 600 pb yang digandakan dengan primer OPD 20 terpaut dengan gen ketahanan *Vf* tanaman apel terhadap penyakit kudis (Yang dan Kruger, 1994).

Penanda OPD 20/600 pada tanaman apel diidentifikasi dengan membandingkan polimorfisme DNA diantara gabungan (*bulk*) DNA antara tanaman apel yang tahan dan rentan terhadap penyakit kudis, lalu hasilnya dibandingkan dengan individu tanaman apel hasil silangan antara tanaman yang tahan dengan yang rentan terhadap penyakit tersebut (Yang dan Kruger, 1994).

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi penanda isozim dan penanda RAPD untuk ketahanan tanaman kelapa terhadap penyakit *phytophthora* gugur buah kelapa.

BAHAN DAN METODE.

Bahan. Bahan yang digunakan adalah 238 pohon kelapa Genjah Salak (GSK), 5 pohon kelapa Dalam Bali (DBI), 5 pohon kelapa hibrida PB-121, 5 pohon kelapa Genjah Kuning Nias (GKN), 5 pohon kelapa Genjah Hijau Nias (GHN) koleksi LOLITKA Pakuwon, Jawa Barat yang telah diseleksi ketahanannya terhadap *phytophthora*, dan 10 pohon kelapa GSK koleksi BALITKA Mapanget. Hasil seleksi kelapa GSK menunjukkan 10 pohon tahan, 216 pohon moderat tahan, 12 pohon kelapa rentan; kelapa DBI menunjukkan 1 pohon tahan

dan 4 pohon rentan; kelapa hibrida PB-121, GKN dan GHN kelima-lima pohon menunjukkan rentan terhadap penyakit gugur buah *phytophthora*. Sedangkan kelapa GSK koleksi BALITKA Mapanget yang dikoleksi langsung dari Kalimantan Selatan menurut laporan tahan terhadap penyakit tersebut (Billotte, 1996).

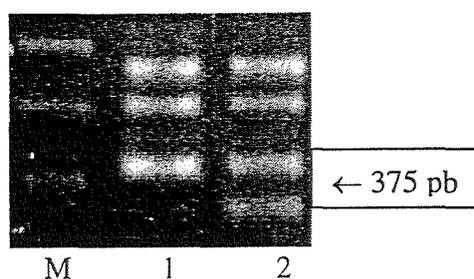
Analisis RAPD. Analisis RAPD dilakukan pertama membandingkan polimorfisme DNA diantara 5 pohon kelapa GSK yang ekstrim tahan dan 5 pohon kelapa GSK ekstrim rentan terhadap penyakit *phytophthora* gugur buah kelapa. Tahap ini meyeleksi 40 primer (Operon kit A dan B). Primer yang mengamplifikasi pita DNA spesifik diantara kedua kelompok ketahanan tanaman kelapa terhadap penyakit tersebut, diuji lagi pada 5 individu pohon kelapa GSK yang ekstrim tahan, 9 pohon kelapa GSK yang moderat tahan dan 7 individu pohon kelapa GSK yang rentan penyakit *phytophthora* gugur buah kelapa yang berasal dari populasi kelapa yang sama. Tahap akhir, primer spesifik tersebut diuji pada kultivar kelapa GSK yang dikoleksi oleh BALITKA Mapanget, Sulawesi Utara dan beberapa kultivar kelapa lain koleksi LOLITKA Pakuwon.

Isolasi DNA total kelapa dilakukan mengikuti Rohde *et al.* (1995) dengan beberapa perubahan. Amplifikasi DNA genomik kelapa menggunakan *Thermocycler Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400*, dengan reaksi dan kondisi PCR mengikuti protokol Promega dengan sedikit perubahan. DNA amplifikasi PCR dielektroforesis dalam 0,8 % gel agaros, diwarnai dengan etidium bromida, polimorfisme DNA diamati di atas UV transiluminator dan didokumentasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pola pita RAPD. Amplifikasi DNA genomik 5 pohon kelapa GSK yang ekstrim tahan dan 5 pohon kelapa GSK yang ekstrim rentan terhadap penyakit *phytophthora* gugur buah kelapa dengan 40 primer 10-mer acak (Operon kit A dan B) menghasilkan 52 pola pita DNA. Dua pola pita DNA diantaranya, yaitu yang diamplifikasi oleh primer OB17 (5'AGGGAACGAG3') mampu membedakan kelapa GSK yang ekstrim tahan dan kelapa GSK yang rentan terhadap penyakit tersebut. Perbedaan kedua pola pita tersebut ditandai dengan adanya sebuah pita DNA berukuran 375 pb (pasangan basa), yang spesifik terdapat kelapa GSK yang rentan. Selanjutnya dinamakan fragmen DNA OB17₃₇₅ (O adalah sumber

primer Operon, B17 adalah kit B nomor 17 dan 375 adalah ukuran pasangan basa fragmen DNA) (Gambar 1).



Gambar 1. DNA kelapa hasil amplifikasi PCR yang dielektroforesis pada gel agarose. M adalah penanda DNA 1 kb ladder. 1. Kelapa GSK tahan, dan 2. Kelapa GSK yang rentan terhadap penyakit *phytophthora* gugur buah kelapa. Tanda panah adalah fragmen DNA spesifik berukuran 375 pb

Selanjutnya, fragmen DNA OB17₃₇₅ ternyata spesifik hanya diamplifikasi oleh DNA 12 pohon kelapa GSK yang rentan dan tidak diamplifikasi oleh DNA 10 pohon kelapa GSK yang tahan maupun 9 pohon kelapa GSK yang moderat tahan terhadap penyakit *phytophthora* gugur buah kelapa. Fragmen DNA OB17₃₇₅ ini diduga terpaut dengan alel gen tahan tanaman kelapa GSK terhadap penyakit tersebut. Dugaan ini didukung oleh hasil RAPD 10 pohon kelapa GSK koleksi BALITKA Mapanget. Kelapa GSK ini tahan dan ternyata DNA kelapa ini tidak mengamplifikasi fragmen DNA OB17₃₇₅. Sebaliknya fragmen DNA ini teramplifikasi oleh DNA kelapa hibrida PB-121 koleksi LOLITKA Pakuwon yang rentan terhadap penyakit tersebut. Berdasarkan data-data ini, maka keberadaan fragmen DNA OB17₃₇₅ pada DNA kelapa GSK koleksi LOLITKA Pakuwon yang rentan terhadap penyakit gugur buah *phytophthora* diduga berasal dari silangan dengan kelapa hibrida PB-121.

Kelapa GSK koleksi LOLITKA Pakuwon dikoleksi dari buah kelapa GSK hasil persilangan terbuka di perkebunan kelapa Pagilaran, Jawa Tengah. Kelapa GSK di perkebunan kelapa ini ditanam sebagai tanaman pagar diantara blok-blok kelapa hibrida PB-121 (Saefuddin, 1998. Komunikasi pribadi). Berdasarkan seleksi yang dilakukan pada kelapa hibrida PB-121 koleksi LOLITKA Pakuwon ternyata kelapa hibrida ini rentan terhadap penyakit gugur buah *phytophthora*. Dipihak lain, kelapa GSK koleksi BALITKA Mapanget, Sulawesi Utara yang dikoleksi langsung dari Kalimantan Selatan tahan terhadap penyakit *phytophthora* (Billotte, 1996). Sehingga 12 pohon kelapa GSK koleksi LOLITKA Pakuwon

yang rentan terhadap penyakit tersebut diduga adalah hasil silangan terbuka diantara kelapa GSK dengan kelapa hibrida PB-121 yang berada disekitar pohon kelapa tetua kelapa GSK di perkebunan kelapa Pagilaran.

Secara teoritis, kelapa GSK menyerbuk sendiri tetapi terdapat kemungkinan menyerbuk silang dengan pohon kelapa lain. Bunga jantan dan bunga betina kelapa terletak terpisah pada tangkai bunga yang sama sehingga memungkinkan bunga betina kelapa diserbuki oleh kelapa lain. Peristiwa ini telah banyak ditemukan di alam (Menon dan Pandalay, 1960).

Dengan demikian fragmen DNA OB17₃₇₅ bisa dijadikan penanda RAPD kerentanan kelapa GSK terhadap penyakit *Phytophthora* gugur buah kelapa walaupun keberadaanya tidak konsisten pada kultivar kelapa lain (Tabel 1).

Tabel 1. Ketahanan terhadap penyakit *phytophthora* gugur buah kelapa dan keberadaan fragmen DNA OB17₃₇₅ pada beberapa kultivar kelapa

Kultivar	Fenotipe	Fragmen OB17 ₃₇₅
GSK	Tahan	-
GSK	Rentan	+
GSK *)	Tahan**)	-
DBI	Tahan	-
DBI	Rentan	+
PB-121	Rentan	+
GKN	Rentan	-
GHN	Rentan	-

Keterangan : *) = Koleksi BALITKA Mapanget, **) = data Billote (1996)
+ = ada, - = tidak ada

Sesuai data pada Tabel 1 ternyata fragmen OB17₃₇₅ terlacak pada kelapa GSK, DBI dan kelapa hibrida PB-121 yang rentan tetapi tidak ada pada kelapa GKN dan GHN yang juga rentan terhadap penyakit *phytophthora* gugur buah kelapa. Hal ini bisa dijelaskan juga melalui peristiwa rekombinasi antara gen tahan dengan fragman DNA tersebut. Sebagaimana model pada kelapa GSK, gen rentan diduga terpaut dengan fragmen DNA OB17₃₇₅. Kalau terjadi rekombinasi antara gen tahan dengan fragmen DNA tersebut, maka bila gen tahan bersegregasi dengan gen rentan maka gen tahan akan membawa fragmen DNA OB17₃₇₅ tersebut sehingga pada kelapa yang rentan, seperti GKN dan GHN tidak akan mempunyai

fragmen DNA tersebut. Peristiwa rekombinasi antara gen ketahanan dan penanda RAPD telah ditemukan pada beberapa tanaman yang lain, seperti; apel (Yang dan Kruger, 1994); kacang hijau (Young and Kelly, 1997); dan ubi jalar (Ukoskit *et al.*, 1997).

Penggunaan penanda RAPD OB17₃₇₅. Melihat keberadaan fragmen DNA OB17₃₇₅ pada beberapa kultivar kelapa yang rentan terhadap penyakit phytophthora gugur buah kelapa, maka fragmen DNA OB17₃₇₅ dapat dimanfaatkan untuk seleksi negatif pada kelapa GSK, DBI dan kelapa hibrida PB-121.

KESIMPULAN

1. Primer OB 17 mampu membedakan kelapa GSK dan kelapa DBI yang tahan terhadap penyakit phytophthora gugur buah kelapa, dicirikan oleh sebuah pita DNA berukuran 375 pb spesifik pada kelapa yang rentan, dinamakan penanda RAPD OB17₃₇₅.
2. Walaupun tidak konsisten pada kelapa lain, penanda RAPD OB17₃₇₅ bisa dijadikan penanda rentan terhadap penyakit phytophthora gugur buah kelapa pada kelapa GSK, DBI dan kelapa PB-121.

DAFTAR PUSTAKA

- Bennett, C.P.A., O. Roboth, D. Sitepu, and A. Lolong. 1986. Pathogenicity of *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler causing premature nutfall disease of coconut (*Cocos nucifera* L). Indonesian Journal Of Crop Science. 2 (2): 59 – 70.
- Billotte, N. 1996. Coconut Genetic Improvement Programme At Balitka, Final Report, 1989/1995. AARD-CIRAD-CP COOPERATION. 39pp.
- Menon, K. P. V., and K. M. Mandalai. 1960. The Coconut Palm. A Monograph. Indian Central Coconut Committee. Ernakulam. India. 385pp.
- Melchinger, A.E. 1990. Use of molecular markers in breeding for oligogenic disease resistance. Plant Breeding. 104 : 1 – 19.
- Miklas, P.N., J.R. Stavely, and J.D. Kelly. 1993. Identification and potential use of a molecular marker for rust resistance in common bean. Theor. Appl. Genet. 85 : 745 – 749.
- Novariantio, H., dan Z. Mahmud. 1991. Aspek pemuliaan dalam resistensi kelapa terhadap penyakit *Phytophthora palmivora*. BALITKA, Manado Buletin Balitka. 13 : 5 – 13.

- Novarianto, H., T. Rompas and S.N Darwis. 1994. Coconut breeding programme in Indonesia. p. 28 – 41. *In* P. A. Batugal and V. R. Rao (eds). Coconut Breeding. COGENT-IPGRI..
- Rohde, W. A. Kullaya, J. Rodrigues and E, Ritter. 1995. Genome analysis of *cocos nucifera* L. by PCR amplification of spacer sequences separating a subset of *copia*-like *EcoRI* repetitive elements. *J. Genet. and Breed.* 49 : 179 – 186.
- Sitepu, D., C.P.A. Bennett, M.D. Coffey, J.S. Warokka, H.F.J. Motulo, H. Mangindaan, S. Kharie, and P. Herling. 1988. Isolation of and artificial inoculation with *Phytophthora* for epidemiological and resistance studies. *In* Integrated Coconut Pest Control Project. Annual Report 1988. CRI, Manado, Indonesia. P. 38 – 44
- Ukoskit, K., P. G. Thompson, and C. E. Watson Jr. 1997. Identifying a randomly amplified polymorphic DNA (RPAD) marker linked to a gene for root-knot nematode resistance in sweetpotato. *J. Amer. Soc. Sci.* 122(6): 818 – 821.
- Warokka, J.S. dan H.F. Mangindaan. 1993. Busuk pucuk dan gugur buah serta usaha pengendaliannya. . Prosiding Konperensi Nasional Kelapa III. Balitbang Pertanian. Buku II. Hal. 157 – 166.
- Winter, P., and G. Khal. 1995. Molecular marker technologies for plant improvement. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 11 : 438 – 448.
- Yang, H., and J. Kruger. 1994. Identification of a RAPD marker linked to the *Vf* gene for scab resistance in apples. *Euphytica* 77 : 83 – 87.