

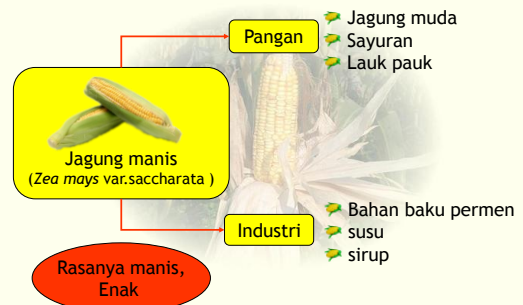
PEMANFAATAN MARKA MIKROSATELIT DALAM MENDETEKSI KEBERADAAN GEN *su* DAN *sh2* PADA GALUR JAGUNG MANIS UNTUK PERAKITAN VARIETAS HIBRIDA

Sriani Sujiprihati
Muhamad Syukur
A. Takdir Makkulawu
R. Neni Iriany M
Siti Hapsah



INSTITUT PERTANIAN BOGOR
Bekerjasama dengan
Sekretariat Badan Litbang Pertanian

Seminar Nasional "Genetik" 2009
08 Agustus 2009



Seminar Nasional "Genetik" 2009
08 Agustus 2009

- Permintaan: 1-1.5 ton/hari : pasaran lokal
- Di atas 1.5 ton/hari (Kompas, 2006)
- Populer di masyarakat

- Permintaan terus meningkat
- Kemampuan produksi rendah
- Harga benih mahal
- Serangan HP : P. Bulai (*downy mildew*)



Perusahaan swasta
Materi genetiknya : introduksi

Seminar Nasional "Genetik" 2009
08 Agustus 2009

Kelemahan jagung manis : rasa manis cepat hilang Karena terjadi konversi gula menjadi pati

Rasa manis dikontrol :

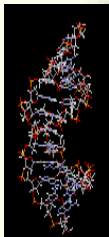
1. Gen sugary (*su*) : 9-16%
2. Gen sugary enhancer (*se*) : 14-22%
3. Gen shrunken2 (*sh2*) : 28-44% (Cobbedick-OMAF, 1997)

- Biji berkerut : manis
- Gen penyusunnya tidak bisa diketahui secara fenotipe

Marka molekuler

Seminar Nasional "Genetik" 2009
08 Agustus 2009

SSRs (*Simple Sequence Repeats*) atau mikrosatelit :



- Penampilannya kodominan sehingga dapat mengidentifikasi genotip homozigot dan heterozigot dalam populasi.
- Multiallelik
- Mudah diulang
- Terdistribusi merata dalam genom

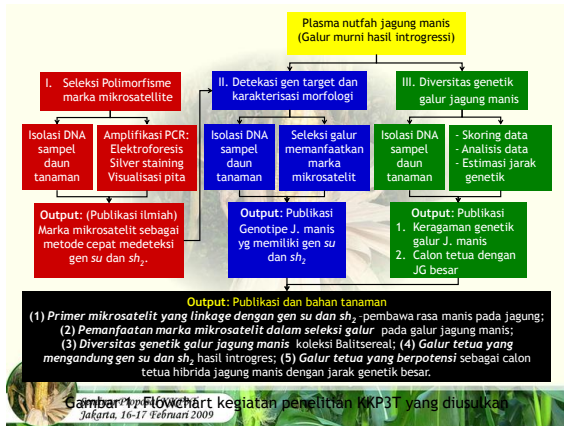
Seminar Nasional "Genetik" 2009
08 Agustus 2009

Tujuan Kegiatan

menghasilkan varietas jagung manis unggul berpotensi hasil tinggi, mengandung gen *su* dan atau *sh2*, dengan jarak genetik yang luas, serta resisten terhadap penyakit bulai yang disebabkan : *Perenosclerospora maydis*

3 PENDEKATAN

1. Studi polimorfisme marka mikrosatelit terhadap populasi galur jagung manis untuk membantu pemulia menyeleksi galur yang memiliki gen *su* dan *sh2*.
2. Studi tentang deteksi keberadaan gen *su* dan *sh2* penyebab rasa manis biji jagung pada beberapa jenis varietas yang telah disilang balik.
3. Studi tentang pemanfaatan marka mikrosatelit untuk analisis diversitas genetik jagung manis untuk membantu pemulia menentukan jarak genetik dan mengelompokkan koleksi galur yang dimiliki



METODOLOGI

1. Studi polimorfisme marka mikrosatelit terhadap populasi galur jagung manis untuk membantu pemulia menyeleksi galur yang memiliki gen *su* dan *sh₂*.

- Bahan tanaman: *Thai Super Sweet*, *Sweet Corn F1 Hybrid*, *Sweet Boy*, *Cai Thai seed*, dan Jagung Manis Madu.
- Marka SSR: *phi092*, *phi093*, *phi044*, *phi028*, *phi033*, *phi042*, *phi032*, dan *phi016* sebagai marka penyeleksi gen *su* dan *sh₂*.



Seminar Hasil Penelitian KKP3T
08 April 2009

Sekuen dari 8 marka mikrosatelit

No.	SSR	Bin	Repeat Sequence	Primer Sequence
1.	phi092	4.0B	GCAA	GTGGGGGAGCCTACTACAGG // GACGAGGCCATCATCACGGT
2.	phi093	4.0B	AGCT	AGTGCGTCAGCTTCATCGCTACAAG // AGGCCATGCATGCTTCAACAATGGATACA
3.	phi044	9.01	CCCT	TATTTGGTCCCTCTCCCGTCCAGA // AGCATACCCCAATGCTCAACAGGGA
4.	phi028	9.01	GAA	TCTCGTCTGCTCGATTAGTAGCGG // AATGCAGGCGATGGTCTCCGGCCT
5.	phi033	9.01	AAG	ATCGAAATGCAGGGGATGGTTCTC // ATCGAGATGTTCTACGCCCTGAAGT
6.	phi042	9.04	CATA	ATGTGGCCATCATTCAATGCTGTGAGC // ACACATGCAGGTGCAGCCAGA
7.	phi032	9.04	AAAG	CTCCAGCAAGTGATGGGTGAC // GACACCCGGATCAATGATGGAAC
8.	phi016	9.04	GGT	TTCCATCATTGATCCGGGTGTCG // AAGGAGCAACATCCCATCAGGAA



Seminar Hasil Penelitian KKP3T
08 April 2009

2. Studi tentang deteksi keberadaan gen *su* dan *sh₂* penyebab rasa manis biji jagung pada beberapa jenis varietas yang telah disilang balik.

- Bahan tanaman: 45 galur jagung manis (*sweet corn*) koleksi Balitsereal hasil silang balik, tetua Galur Mr4, Mr11, Mr12, dan Mr14 (rasanya tidak manis) dan *Thai supersweet* (rasanya manis) .
- Marka SSR: *phi092*, *phi093*, *phi044*, *phi028*, *phi033*, *phi042*, *phi032*, dan *phi016* sebagai marka penyeleksi gen *su* dan *sh₂*.



Seminar Hasil Penelitian KKP3T
08 April 2009

- Isolasi DNA sampel tanaman
- Elektroforesis menggunakan Gel Agarose
- Elektroforesis menggunakan Gel Polyacrylamide
- Silver Staining
- Penulisan laporan



Seminar Hasil Penelitian KKP3T
08 April 2009

Pengamatan:

1. Studi tentang deteksi keberadaan gen *su* dan *sh₂* penyebab rasa manis biji jagung pada beberapa jenis varietas yang telah dirilis.
 - Pola pita DNA hasil elektroforesis,
 - Tingkat polimorfis primer dengan calon tetua.
2. Studi tentang polimorfisme marka mikrosatelit terhadap populasi galur jagung manis untuk membantu pemulia menyeleksi galur yang memiliki gen *su* dan *sh₂*.
 - Pola pita DNA hasil elektroforesis,
 - galur terpilih mempunyai pola pita DNA = Thai SS



Seminar Hasil Penelitian KKP3T
08 April 2009

3. Studi tentang pemanfaatan marka mikrosatelit untuk analisis diversitas genetik dan pemetaan genetik genom jagung manis untuk membantu pemulia dalam menentukan jarak genetik dan mengelompok koleksi galur yang dimiliki.

Tujuan

- Mengetahui hubungan genetik dan tingkat keragaman genetik 40 galur J manis berdasarkan marka SSRs dalam rangka menunjang perakitan varietas hibrida.

Skoring data

- Jika ada pita diberi skor satu (1)
- Jika tidak ada pita diberi skor nol (0).
- Pita yang tidak sempurna dan kabur diskor 9 (missing data).



Seminar Hasil Penelitian XXXXX
08agc 23 Desember 2009

Analisis data

Tingkat polimorfisme (*PIC* = *Polimorphism Information Content*) dari primer yang digunakan dihitung untuk masing-masing marka SSRs (Smith *et al.* 1997), dengan formula:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n f_i^2 \quad i = 1, 2, 3, \dots, n$$

dimana f_i^2 adalah frekuensi alel ke-i.

Estimasi Kekerabatan Genetik dan Analisis Kluster

Kemiripan genetik dianalisis dengan menggunakan program NTSYS-pc versi 2.1 (Rohlf 2000).

Hasil yang diharapkan:

Diketahui hubungan genetik dan tingkat keragaman genetik galur jagung manis berbasis marka SSRs sebagai dasar menentukan pasangan persilangan yang berpeluang menghasilkan heterosis tertinggi.



Seminar Hasil Penelitian XXXXX
08agc 23 Desember 2009

HASIL DAN PEMBAHASAN

- I. Studi polimorfisme marka mikrosatelit terhadap populasi galur jagung manis untuk membantu pemulia menyeleksi galur yang memiliki gen su_2 dan sh_2 .



Penampilan DNA hasil ekstraksi tahapan pertama



Seminar Hasil Penelitian XXXXX
08agc 23 Desember 2009

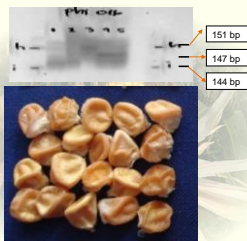
Profil 7 primer SSR penyandi gen manis pada lima varietas jagung

No.	Primer	Kromosom	Jumlah alel	Kisaran basa (bp)	No. Varietas
1	Phi016 (<i>su</i>)	9.04	3	151	3
				147	4 dan 5
				144	1 dan 2
2	Phi028 (<i>sh</i>)	9.01	2	82	2, 3, 4, 5
				76	1, 2, 3, 4, 5
				241	1, 2, 3, 4, 5
3	Phi032 (<i>su</i>)	9.04	3	237	3, 4, 5
				234	1 dan 2
				185	1, 2, 3, 4, 5
4	Phi042 (<i>su</i>)	9.04	1	185	1, 2, 3, 4, 5
5	Phi044 (<i>sh</i>)	9.01	1	88	1, 2, 3, 4, 5
6	Phi092 (<i>su</i>)	4.08	2	138	1, 2, 4, 5
				131	1, 2, 3, 4, 5
7	Phi093 (<i>su</i>)	4.08	2	295	1, 2, 3, 4, 5

Keterangan: varietas: 1) Chia Thai Sweet, 2) Jagung manis madu, 3) S & G Sugar 73, 4) S & G Sugar 75, 5) Thai Supersweet.



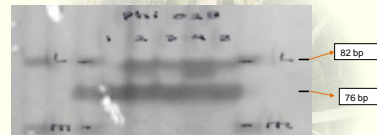
Seminar Hasil Penelitian XXXXX
08agc 23 Desember 2009



Visualisasi pola pita DNA menggunakan primer phi 016 (*su*); biji jagung yang mewakili bentuk pita.



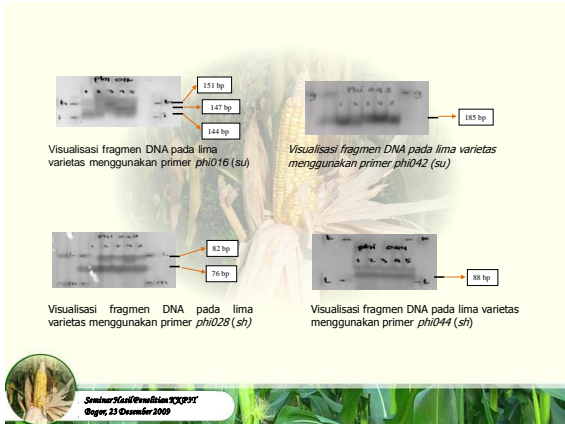
Seminar Hasil Penelitian XXXXX
08agc 23 Desember 2009



Visualisasi pola pita DNA menggunakan primer phi028 (*sh*); biji jagung yang mewakili bentuk pita.



Seminar Hasil Penelitian XXXXX
08agc 23 Desember 2009



2. DETEKSI KEBERADAAN GEN *su* DAN *sh2* PENYEBAB RASA MANIS

Gen yang memiliki alil lebih dari satu (polimorfis), diantara primer tersebut adalah *phi028*, *phi032*, *phi092* dan *phi093*, sedangkan *phi016*, *phi042*, dan *phi044* mendeteksi gen yang hanya memiliki satu alil (monomorfis).

Seminar Nasional Pemuliaan Tumpukan
Bogor, 23 Desember 2009

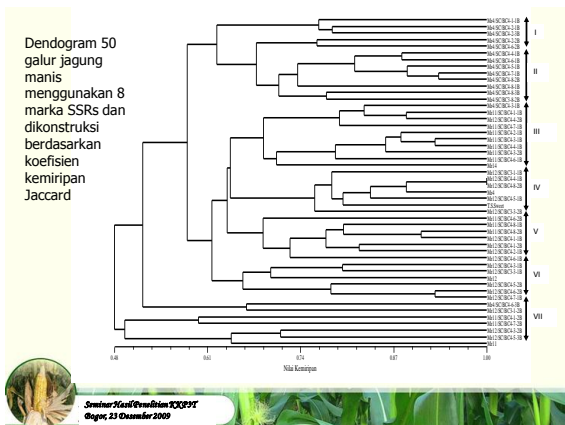
Jumlah pola pita 45 galur jagung manis BC5F3 berdasarkan tujuh primer

No	Primer	Variasi alil	Kisaran basa (bp)	No. Galur
1	Phi016 (<i>su</i>)	1	148,60	1 – 45
2	Phi028 (<i>sh</i>)	4	82,72	1, 3, 6, 7, dan 9-15
			78,08 dan 76,45	31-34 dan 38-40
			82,72 dan 76,45	2, 4, 5, 26, dan 27
3	Phi032 (<i>su</i>)	3	76,45	8, 16-25, 28-30, 35-37, dan 41-45
			243,67	1 – 4
			243,67 dan 237,28	5, 6, 8, 14-16, 18-22, 31-42, dan 45
4	Phi042 (<i>su</i>)	1	186,30	1 – 45
5	Phi044 (<i>sh</i>)	1	88,68	1 – 45
6	Phi092 (<i>su</i>)	3	137,13	1-30, 33-35, 38-41, 43, dan 44
			137,13 dan 129,47	31, 32, 37, 42, dan 45
			129,47	36
7	Phi093 (<i>su</i>)	3	293,28	12, dan 18-24
			293,28 dan 288,85	2, 4, 5, 15, 16, 25, dan 29
			288,85	1, 3, 6-11, 13,14, 17, 26-28, dan 30-45

3. ANALISIS DIVERSITAS

No.	Primer/Lokus SSRs	No Kromosom	Tingkat Polimorfis	Jlh Atel/Lokus	Kisaran
1	phi101049	2,10	0,81	7	221-309,27
2	phi374118	3,02	0,90	5	219,06-274,18
3	umc1136	3,00	0,73	3	136,16-159,16
4	phi213984	4,01	0,44	3	293,05-316,52
5	phi093	4,08	0,38	2	288,85-293,28
6	phi423796	6,01	0,24	2	127,84-135,36
7	umc1304	8,02	0,81	4	135,33-146,28
8	phi032	9,04	0,48	2	237,28-243,67
Total			4,79	28,00	
Rata-rata			0,60	3,50	
Kisaran			0,24-0,90	2-7	127,84 - 293,05

Seminar Nasional Pemuliaan Tumpukan
Bogor, 23 Desember 2009



KESIMPULAN

1. Tingkat polimorfisme tujuh primer yang digunakan cukup tinggi.
2. Berdasarkan hasil visualisasi DNA sampel dari lima kandidat calon tetua persilangan sebagai sumber gen manis diperoleh semuanya memiliki gen *su* dan *sh2* berdasarkan tujuh primer, dengan kisaran basa 76 sampai 295 bp dan kisaran jumlah alil per lokus 1 sampai 3 alil.
3. Beberapa primer mendeteksi gen yang memiliki alil lebih dari satu (polimorfis), diantara primer tersebut adalah *phi028*, *phi032*, *phi092* dan *phi093*, sedangkan *phi016*, *phi042*, dan *phi044* mendeteksi gen yang hanya memiliki satu alil (monomorfis).

Seminar Nasional Pemuliaan Tumpukan
Bogor, 23 Desember 2009

KESIMPULAN

4. Rata-rata tingkat polimorfisme dari 8 marka SSRs yang digunakan adalah 0,60 dan diperoleh total alel 28 dengan rata-rata 3.50 alel/lokus serta nilai koefisien korelasi kofenitik (r) 0,68 yang tergolong *good fit* (kelompok galur jagung manis yang ditangani).
- Pengelompokan galur berdasarkan marka SSRs diperoleh tujuh kluster atau kelompok heterotik.
- Galur yang dapat direkomendasikan untuk dipasangkan dengan galur lainnya adalah galur pada posisi kluster yang berbeda



Seminar Hasil Penelitian XXXXX
08 Agustus 2009



Seminar Hasil Penelitian XXXXX
08 Agustus 2009