


TESIS

 **KERAGAMAN GENETIK *Peronosclerospora* spp.
YANG MENYERANG TANAMAN JAGUNG DI INDONESIA
MENGUNAKAN PENANDA MIKROSATELIT DAN
*AMPLIFIED RIBOSOMAL DNA RESTRICTION ANALYSIS (ARDRA)***



AHMAD AFIFUDDIN

080942020

**PROGRAM STUDI MAGISTER KIMIA
DEPARTEMEN KIMIA FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

2012

7. Ibu Dr. Muji Harsini, M.Si. sebagai dosen penguji tesis atas masukan untuk perbaikan penelitian ini.
8. Ibu Dr. Pratiwi Pudjiastuti, M.Si. sebagai dosen penguji tesis atas saran untuk menyempurnakan penelitian ini.
9. Bapak-ibu dosen pengajar Program studi Magister Kimia atas segala kebaikan dan transfer ilmunya.
10. Bapak Dr. Rudy Lukman yang telah memberikan kesempatan dan dukungannya kepada penulis untuk melanjutkan studi di UNAIR .
11. Ba dan Mama yang senantiasa memberikan doa dan dukungannya.
12. Istriku (Ika Yuni Setyowati) dan anakku tercinta Queensha Almahyra Afifuddin yang telah memberikan semangat dan inspirasi yang sangat luar biasa.
13. Mbak Henny yang baru saja menyelesaikan pendidikan S2 di UI dan Adik-adikku (Toton, Ihsan dan Joan). Terima kasih atas support dan bantuannya.
14. Teman-teman S2 Kimia terutama kepada Pak Rai, Agus, Malik, Ratnani, dll. Terima kasih teman-teman atas dorongan dan bantuan morilnya selama ini.
15. Teman-teman staf dan Asisten Lab Molecular Breeding yang telah membantu penelitian ini serta
16. Seluruh staf dan karyawan Departemen Kimia atas bantuannya selama ini.

Penulis menyadari bahwa di dalam penyusunan tesis ini, masih banyak kekurangannya. Oleh karena itu saran dan kritikan yang sifatnya memperbaiki sangat penulis harapkan demi kesempurnaan tesis ini.

Surabaya, Juli 2012
Penulis

Ahmad Afifuddin

RINGKASAN

Keragaman genetik *Peronosclerospora* spp. yang menyerang tanaman jagung di Indonesia menggunakan penanda Mikrosatelit dan *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis* (ARDRA)

Jagung termasuk salah satu bahan pangan utama setelah padi. Kebutuhan jagung bertambah seiring dengan meningkatnya pertumbuhan penduduk dan berkembangnya industri pakan ternak dan pangan. Pusat Data Pertanian Nasional (2009) melaporkan bahwa kebutuhan jagung domestik rata-rata meningkat 10% pertahunnya sementara produksi relatif lebih lamban. Laju produksi yang rendah tersebut salah satunya disebabkan oleh adanya serangan hama dan penyakit pada tanaman jagung. Bulai merupakan penyakit pada tanaman jagung yang disebabkan oleh *Peronosclerospora* spp.. Penyakit ini dilaporkan menyebabkan gagal panen (puso) di beberapa daerah di Indonesia (Subandi, 1996).

Identifikasi *Peronosclerospora* spp. sangat diperlukan untuk pengembangan varietas jagung yang tahan terhadap penyakit bulai. Meskipun telah banyak teknik molekuler digunakan untuk identifikasi terhadap spesies ini, tetapi hasilnya belum optimal terkait dengan rendahnya variasi genetik yang teridentifikasi dan hasilnya yang kurang *reproducible* (Perumal *et al.*, 2006)

Pada penelitian ini akan dikembangkan identifikasi dan karakterisasi genetik untuk mengetahui keragaman isolat *Peronosclerospora* spp. di Indonesia menggunakan penanda mikrosatelit dan ARDRA. Secara spesifik tujuan penelitian ini adalah mengetahui keragaman genetik isolat-isolat *Peronosclerospora* spp. di beberapa wilayah Indonesia menggunakan penanda mikrosatelit dan ARDRA dan mengetahui perbandingan dendogram antara kedua

penanda serta mengetahui keragaman genetik isolat-isolat *Peronosclerospora* spp. berdasarkan penggabungan dendogram mikrosatelit dan ARDRA.

Amplifikasi mikrosatelit dilakukan menggunakan 41 pasang mikrosatelit berdasarkan penelitian Perumal *et al.* (2008) sedangkan ARDRA mengamplifikasi daerah ITS1-5.8S-ITS2 dan D1-D2 28S rDNA yang dilanjutkan proses restriksi dengan 6 enzim restriksi yang berbeda yaitu, *AclI*, *Sau96I*, *HaeIII*, *MboI*, *NciI* dan *Taq⁶¹I*. Fragmen-fragmen DNA yang didapat, dianalisis dengan program NTSYSpc- 2.02 (Rohlf, 1998). Dengan program tersebut kemiripan genetik antar isolat ditentukan berdasarkan koefisien genetik dari dendogram.

Hasil amplifikasi mikrosatelit *Peronosclerospora* spp. mengidentifikasi 196 alel yang tersebar di 40 lokus. Perbedaan jumlah dan ukuran alel antar isolat di berbagai lokus mikrosatelit dan pola restriksi fragmen ARDRA dari 31 isolat *Peronosclerospora* spp. yang bersifat khas dan unik menunjukkan variasi dan keragaman genetik antar isolat yang dikoleksi.

Berdasarkan konstruksi dendogram menggunakan metode UPGMA, isolat *Peronosclerospora* spp. dikelompokkan menjadi 3 kluster. Isolat dari 3 daerah Jawa terpisah dengan kelompok isolat Lampung dan Gorontalo dengan kemiripan genetik antar isolat berkisar antara 66-98% untuk mikrosatelit dan 58-100% untuk ARDRA. Perbandingan dendogram diantara keduanya menunjukkan bahwa kemiripan genetik antar isolat dari mikrosatelit sedikit lebih rendah dari ARDRA sehingga mikrosatelit relatif lebih diskriminatif daripada ARDRA. Selain itu analisis kluster berdasarkan gabungan mikrosatelit dan ARDRA menghasilkan kemiripan genetik antar isolat berkisar antara 64-98% yang memiliki kecenderungan pembagian kluster berdasarkan penanda mikrosatelit.

SUMMARY

Genetic Diversity of Maize Downy Mildew (*Peronosclerospora* spp.) in Indonesia using Microsatellite and ARDRA Markers

Maize is one of the main foodstuffs after rice. Increasing of maize production as increasing of population growth and development of animal feed and food industries. National Agricultural Data Centre (2009) reported that domestic maize demand increased an average of 10% per year while production is relatively slow. Low production rate is one of them caused by the presence of pests and diseases in maize. Downy mildew is a disease caused by *Peronosclerospora* spp. Heavy losses in maize have been recorded due to *Peronosclerospora* spp. pathogens in Indonesia, where the losses may be as high as 100% in some fields (Subandi, 1996).

Identification of *Peronosclerospora* spp. indispensable to the development of maize varieties to downy mildew disease. Although molecular techniques have been widely used for the identification of this species, but the results have not been associated with a lower optimal genetic variation were identified and the results are less reproducible (Perumal et al., 2006).

In this study, the identification and characterization will be developed to determine the genetic diversity of isolates *Peronosclerospora* spp. in Indonesia using microsatellite and ARDRA markers. The specific purpose of this study was to determine the genetic diversity of isolates *Peronosclerospora* spp. in several regions in Indonesia using microsatellite and ARDRA markers and comparing of between the two markers as well as knowing the genetic diversity of isolates

Peronosclerospora spp. based on the incorporation of microsatellite and ARDRA dendogram.

Amplification of microsatellite was performed using 41 microsatellite primer pairs based on Perumal et al. (2008) study while the ARDRA amplified ITS1-5.8S-ITS2 and D1-D2 28S rDNA regions followed restriction process by six different restriction enzymes, namely, *AluI*, *Sau96I*, *HaeIII*, *MboI*, *NciI* dan *Taq^αI*. Obtained DNA fragments were then analyzed by NTSYSpc- 2.02 program (Rohlf, 1998) in which the genetic similarity between isolates were determined based on the genetic coefficient of the resulting dendogram.

The amplification results identified 196 microsatellite alleles scattered across 40 microsatellite loci. Differences of allele number and sizes between isolates in microsatellite loci and distinctive and unique restriction patterns of ARDRA fragments of 31 isolates *Peronosclerospora* spp. shows genetic diversity among of isolates collections.

Based on dendogram construction using UPGMA method, *Peronosclerospora* spp. isolates were grouped into 3 clusters. Isolates from three regions of Java separated by a group Gorontalo and Lampung isolates with genetic similarity between isolates ranged between 66-98% for microsatellites and 58-100% for ARDRA. Dendogram comparison of them showed that the genetic similarity between isolates of microsatellite slightly lower than ARDRA. It means microsatellite relatively more discriminative than ARDRA. In addition, cluster analysis based on combining data of two markers showed that genetic similarity of isolates ranged between 64-98% where the distribution of clusters formed following of microsatellite markers.