

## Isolasi dan Karakterisasi Gen *Pto* Asal 20 Aksesori Anggrek *Phalaenopsis*

### *Isolation and Characterization of Pto Gene from 20 Phalaenopsis Orchid Genotypes*

Juanita Elina<sup>1</sup>, Dewi Sukma<sup>2</sup>, Giyanto<sup>3</sup>, dan Sudarsono<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Pemuliaan dan Bioteknologi Tanaman, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor

<sup>2</sup>Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor (Bogor Agricultural University), Jl. Meranti, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680, Indonesia

<sup>3</sup>Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor (Bogor Agricultural University), Jl. Meranti, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680, Indonesia

Diterima 13 Oktober 2016/Disetujui 11 April 2017

#### ABSTRACT

Bacterial soft rot disease because of *Dickeya* sp. infection is the main problem in *Phalaenopsis* production in Indonesia, but the percentage of infected plants has never been recorded in detail. Isolation and characterization of *Pto* gene from *Phalaenopsis* could be useful to support breeding for resistance *Phalaenopsis*. Encoding serine-threonine kinase, *Pto* gene confers resistance to bacterial infection of *Pseudomonas syringae* in tomato. The objectives of this study were to isolate, sequence and characterize fragment of *Pto* gene from 20 genotypes of *Phalaenopsis* (16 species and 4 hybrids) and to evaluate their molecular diversity. Genomic fragments of *Phalaenopsis* were amplified using *Pto* specific degenerate primers; and the PCR amplicons were sequenced. Searching the identity of determined sequences was done using BLAST against all accessions in NCBI GenBank DNA database and in Conserve Domain Database. PCR amplification using *Pto* specific primers produced a single DNA fragment of ~500 bp. The determined nucleotide sequences from the amplicon were ~449 bp. The nucleotide sequences of the amplicons from 20 *Phalaenopsis* genotypes showed high sequence identity to *Pto* from *Musa acuminata*. Translation of the amplicon results in ~149 amino acid residues. Comparison of the translated polypeptides identify indicated there were low variations of *Pto* gene among accessions since they contain the PTO catalytic domain and the Serine/Threonine kinases, sub family of Interleukin-1 Receptor Associated Kinase (STK\_IRAK) which are the conserved domains for PTO.

Keywords: catalytic domain, disease resistance, fragment *Pto* gene, phylogenetic, RGA

#### ABSTRAK

Masalah utama dalam budidaya *Phalaenopsis* di Indonesia adalah penyakit busuk lunak yang disebabkan oleh infeksi *Dickeya* sp, namun persentase tanaman yang terserang di Indonesia belum pernah didata secara mendetail. Isolasi dan karakterisasi gen *Pto* dari anggrek *Phalaenopsis* diharapkan bermanfaat bagi pengembangan program pemuliaan anggrek *Phalaenopsis* khususnya ketahanan terhadap penyakit. Gen *Pto* dikenal sebagai gen penyandi serine-threonine kinase yang memberikan ketahanan pada tomat terhadap infeksi bakteri *Pseudomonas syringae*. Tujuan penelitian ini adalah mengisolasi dan mengkarakterisasi fragmen gen *Pto* dari 20 anggrek *Phalaenopsis* (16 spesies dan 4 hibrida) sehingga diperoleh keragaman molekuler gen *Pto* untuk mengidentifikasi anggrek *Phalaenopsis* tahan. Fragmen gen *Pto* diamplifikasi menggunakan primer spesifik *Pto* dilanjutkan dengan sekuensing. Identitas sekuen diperoleh dengan menggunakan BLAST terhadap semua aksesori yang terdeposit di NCBI GenBank DNA database dan conserve domain database. Hasil amplifikasi PCR menggunakan primer spesifik *Pto* menghasilkan produk ~500 pb. Berdasarkan runutan nukleotida, fragmen DNA yang teramplifikasi sepanjang ~449 pb. Runutan nukleotida dari fragmen DNA asal 20 aksesori *Phalaenopsis* menunjukkan kesamaan identitas yang tinggi dengan gen *Pto* *Musa acuminata*. Translasi amplicon asal *Phalaenopsis* menyandikan 149 asam amino. Analisis penjejangan asam amino menunjukkan terdapat keragaman yang rendah dari protein PTO antar genotipe *Phalaenopsis* dan amplicon merupakan bagian dari domain katalitik PTO, yaitu domain serine/threonine kinase sub-famili Interleukin-1 Receptor Associated Kinases (STK\_IRAK).

Kata kunci: domain katalitik, filogenetik, fragmen gen *Pto*, ketahanan penyakit, RGA

\* Penulis untuk korespondensi. e-mail: [s\\_sudarsono@ymail.com](mailto:s_sudarsono@ymail.com)

## PENDAHULUAN

*Phalaenopsis* merupakan salah satu jenis anggrek yang paling digemari dan banyak dikembangkan masyarakat. Anggrek ini memiliki keunggulan warna bunga yang beragam, bentuk bunga yang unik dan *vase life* yang panjang. Dalam pengembangan dan budidaya anggrek *Phalaenopsis* sering ditemukan serangan penyakit busuk lunak akibat infeksi bakteri *Dickeya dadantii* (sinonim dari *Erwinia chrysanthemi* [Toth *et al.*, 2011]), namun persentase tanaman yang terserang di Indonesia belum pernah didata secara mendetail. Salah satu alternatif cara pengendalian penyakit yang efektif adalah dengan menggunakan varietas resisten terhadap infeksi patogen penyebabnya (Yusnita *et al.*, 2005).

Keberadaan aksesi yang resisten sangat bermanfaat dalam pemuliaan tanaman *Phalaenopsis* karena dapat digunakan sebagai donor sifat resisten (Fu dan Huang, 2011). Evaluasi keragaman respon ketahanan tanaman terhadap penyakit (resistensi) dapat dilakukan secara langsung dengan inokulasi tanamannya menggunakan isolat patogen yang diuji (Zainal *et al.*, 2011; Sutanto *et al.*, 2014) atau dengan mengevaluasi keragaman gen ketahanan (*R gene* atau *resistance gene analog*) yang ada pada genom tanamannya (Quirin *et al.*, 2012).

Produk protein dari gen ketahanan (*R gene*) memiliki kemampuan untuk mendeteksi awal terjadinya infeksi dan mengaktifkan mekanisme ketahanan tanaman terhadap infeksi patogen (Han *et al.*, 2011). Tanaman mampu mendeteksi awal infeksi melalui interaksi spesifik antara protein yang disandi oleh gen ketahanan (*R gene*) dengan faktor avirulen (*avr factor*) yang dihasilkan oleh patogen (Rose *et al.*, 2007).

Gen ketahanan (*R gene*) dikelompokkan menjadi delapan kelas berdasarkan motif domain terkonservasi pada polipeptidanya (Zhai *et al.*, 2014). Sejumlah 91 gen ketahanan asal tanaman telah berhasil diisolasi dan dikarakterisasi (Gurunani *et al.*, 2012), baik dari tanaman dikotil ataupun monokotil (Meyers *et al.*, 2005). Sebagian besar polipeptida yang disandi oleh gen resisten tersebut mempunyai domain terkonservasi *nuclear binding site – leucine rich repeat* (NBS – LRR [Quirin *et al.*, 2012]). Gen *Pto* merupakan salah satu kelompok gen ketahanan yang tidak mempunyai domain terkonservasi NBS-LRR tetapi tergolong sebagai gen ketahanan enzimatis (*enzymatic R-gene* [Gurunani *et al.*, 2012]).

Gen *Pto* merupakan salah satu anggota kelompok *resistance gene analog* (RGA) yang produk proteinnya berperan dalam pengenalan awal terjadinya infeksi dan proses transduksi sinyal terjadinya infeksi untuk mengaktifkan mekanisme respon ketahanan tanaman (Wan *et al.*, 2009). Isolasi dan karakterisasi domain terkonservasi dari gen *Pto* telah berhasil dilakukan untuk kakao (~540 pb, Kurniasih, 2012), pisang (~550 pb, Peraza-Echeverria *et al.*, 2007) dan sejumlah tanaman lainnya. Domain terkonservasi pada produk protein PTO berupa kinase serin-treonin (*Serine-Threonine Kinase*), berfungsi sebagai enzim yang dapat melakukan fosforilasi protein kinase tertentu

(Castells dan Casacuberta, 2007) dan meneruskan sinyal awal infeksi ke nukleus untuk aktivasi mekanisme resistensi terhadap infeksi patogen. Wan *et al.* (2013) menyatakan bahwa *Pto* mengkode serine/threonine kinase yang menjadi perantara ketahanan tanaman tomat terhadap infeksi isolat bakteri *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* dengan faktor avirulensi *avrPto*. Keberadaan gen penyandi serine/threonine kinase diharapkan dapat menghambat penyebaran busuk lunak akibat infeksi *Dickeya dadantii* pada anggrek *Phalaenopsis*.

Meskipun telah diisolasi dan dikarakterisasi dari berbagai tanaman, informasi tentang keberadaan gen *Pto* pada *Phalaenopsis*, isolasi dan karakterisasinya belum dilaporkan. Tersedianya informasi tentang gen *Pto* asal *Phalaenopsis* dan keragaman molekulernya dapat digunakan untuk identifikasi ketahanan *Phalaenopsis* terhadap infeksi *D. dadantii*, patogen penyebab busuk lunak pada *Phalaenopsis* di Indonesia (Sudarsono *et al.*, 2017; Sukma *et al.*, 2017). Penelitian yang dilakukan bertujuan untuk (1) mengisolasi fragmen gen *Pto* dengan amplifikasi PCR, (2) mengkarakterisasi fragmen DNA yang teramplifikasi dengan *DNA sequencing*, dan (3) mempelajari keragaman residu asam amino yang ditranslasikan dari fragmen gen *Pto* asal *Phalaenopsis*. Informasi tentang karakter *Pto* asal *Phalaenopsis* dan keragaman residu asam amino yang diperoleh sangat berguna dalam pengembangan marka molekuler untuk sifat ketahanan *Phalaenopsis* terhadap serangan patogen yang kemudian akan digunakan dalam perakitan varietas tahan.

## BAHAN DAN METODE

### Isolasi DNA Total dari 20 Aksesi *Phalaenopsis*

Penelitian dilaksanakan mulai tahun 2014 sampai dengan 2015 di Laboratorium Biologi Molekuler Tanaman (PMB Lab.), Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor. Total DNA tanaman diisolasi menggunakan metode CTAB yang dimodifikasi (Sudarsono *et al.*, 2017; Handini, 2014; Sutanto *et al.*, 2014). Bahan tanaman yang digunakan adalah daun muda 20 aksesi anggrek *Phalaenopsis*. Contoh daun muda (0.3-0.4 g) digerus dengan larutan penyangga-lisis (700 mL) serta penambahan PVP (0.007 g). Hasil gerusan jaringan diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 65 °C selama 60 menit. Campuran diendapkan dengan sentrifugasi menggunakan WEALTEC *E-Centrifuge* kecepatan 6000 rpm selama 30 menit. Supernatan dipindahkan ke tabung *eppendorf* baru dan ke dalamnya ditambahkan kloroform: isoamil-alkohol (24:1) sebanyak volume supernatan. Setelah dicampur perlahan dan merata selama 3 menit, contoh disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 30 menit. Setelah sentrifugasi, supernatannya dipindahkan ke tabung yang baru. Ke dalam tabung *Eppendorf* ditambahkan sodium asetat (0.1x volume supernatan) dan isopropanol dingin (2x volume total supernatan). Setelah dicampur perlahan selama 3 menit, suspensi disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 30 menit hingga diperoleh endapan DNA.

Endapan DNA dibilas dengan 100  $\mu$ L etanol dingin (70%), disentrifugasi dan dikeringkan. Endapan DNA yang telah kering disuspensikan dalam 100  $\mu$ L *aquabidest*.

#### Amplifikasi PCR dengan Primer Spesifik *Pto*

Pasangan primer *degenerate* spesifik *Pto* yang digunakan terdiri atas primer *forward* (PtoF: 5'-*ggaggatttggaargntayaar-3'*) dan *reverse* (PtoR: 5'-*accacaccaaagtartanacrtc-3'*). Amplifikasi PCR dilakukan menggunakan PtoF dan PtoR serta templat total DNA dari 20 aksesi *Phalaenopsis*. Setiap reaksi amplifikasi PCR dilakukan dengan menggunakan 4  $\mu$ L suspensi DNA, 0.75  $\mu$ L (10  $\mu$ M) masing-masing primer, 12.5 PCR Ready Mix (KAPA Biosystem), dan 7  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O. Tahapan amplifikasi dilakukan sebagai berikut: denaturasi awal pada suhu 95 °C selama 3 menit, diikuti dengan 35 siklus amplifikasi yang masing-masing siklus terdiri atas denaturasi pada 95 °C selama 10 detik, penempelan primer dengan temperatur 45.9 °C selama 15 detik, dan pemanjangan primer pada suhu 72 °C selama 1 detik, serta diakhiri dengan pemanjangan primer pada suhu 72 °C selama 10 menit sesuai rekomendasi kit PCR KAPA Biosystem. Amplikon dievaluasi dengan elektroforesis gel agarose (1%) menggunakan *buffer* SB 1x dan diwarnai dengan GelRed™ (Biotium Inc.). Visualisasi amplikon dilakukan dengan UV transilluminator dan elektroforegram di foto menggunakan kamera digital.

#### Penentuan Runutan Nukleotida Amplikon

Amplikon berupa pita tunggal dari masing-masing aksesi *Phalaenopsis* dikirim ke perusahaan penyedia layanan DNA *sequencing* (BASE-Asia, Malaysia) untuk proses penentuan runutan nukleotida. Penentuan runutan nukleotida menggunakan BigDye *terminator sequencing* kit (*Applied Biosystems*) dan produk *sequencing* dipisahkan dengan ABI 3730 *automatic sequencer* (*Applied Biosystems*).

Runutan basa nukleotida hasil amplifikasi PCR dianalisis menggunakan program Geneious Basic 5.6.6 (Biomatters, USA) untuk menentukan keberadaan primer PtoF dan PtoR yang digunakan di ujung-ujung amplikon. Runutan nukleotida amplikon dan runutan asam amino hasil translasi dari amplikon dibandingkan dengan semua aksesi yang tersedia di *NCBI GenBank DNA Database* menggunakan *basic local alignment search tool* (BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>). Hasil BLAST digunakan untuk menduga secara umum identitas amplikon yang didapatkan.

#### Penentuan Identitas Amplikon

Protein PTO diketahui mempunyai domain katalitik dengan runutan asam amino yang terkonservasi (Oh dan Martin, 2011). Keberadaan domain katalitik PTO pada hasil translasi dari amplikon dapat menjadi indikator bahwa amplikon tersebut merupakan bagian dari gen *Pto*. Untuk memastikan identitas amplikon, keberadaan domain katalitik PTO dievaluasi dengan data yang tersedia di *NCBI Conserved Domain Database* ([ncbi.nlm.nih.gov/](http://ncbi.nlm.nih.gov/)

[Structure/cdd/wrpsb.cgi](http://ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi)). Hasil positif analisis keberadaan domain katalitik PTO mengindikasikan bahwa amplikon yang didapat merupakan bagian dari gen *Pto*.

Protein PTO merupakan salah satu anggota dari *serine-threonine kinase protein super family*, yang diketahui mempunyai *conserved domain* (CD) dengan runutan asam amino tertentu (Singh *et al.*, 2012). Keberadaan CD pada hasil translasi amplikon dapat digunakan untuk mengkonfirmasi bahwa amplikon yang dievaluasi merupakan bagian dari gen *Pto*. Untuk itu, translasi dari amplikon dievaluasi kesamaannya dengan CD yang tersedia di database *Conserved Domain NCBI* ([ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi](http://ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi)). Hasil positif analisis keberadaan CD memastikan identitas amplikon sebagai bagian dari gen *Pto*.

#### Filogenetika Polipeptida Hasil Translasi dari Amplikon Asal *Phalaenopsis*

Analisis filogenetik runutan asam amino hasil translasi dari amplikon dilakukan untuk mengevaluasi hubungan kekerabatan antara amplikon dengan aksesi lain dari *NCBI GenBank database*. Runutan asam amino hasil translasi yang diperoleh dibandingkan dengan runutan asam amino gen *Pto* dari *Musa acuminata* (AAM97914.1), *Triticum aestivum* (AAL51075.1), *Arachis hypogaea* (AFB69787.1), *Capsicum chinense* (AAQ82660.1), *Nicotiana repanda* (ACO25565.1), dan *Lycopersicon esculentum* (AF220603.1). Konstruksi pohon filogenetika dibangun menggunakan metode *Neighbour-Joining* (NJ) dengan bantuan perangkat lunak MEGA versi 5 (Tamura *et al.*, 2011). Nilai *bootstrap* berdasarkan 1000 kali pengulangan digunakan untuk menguji keakuratan data.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

#### Amplifikasi PCR dengan Primer Spesifik *Pto*

Disain pasangan primer *degenerate* spesifik *Pto* (PtoF dan PtoR) dilakukan berdasarkan sejumlah aksesi gen *Pto* dan posisi relatif primer terhadap PTO asal tomat dapat dilihat pada Gambar 1.A. Primer PtoF dimulai dari kodon penyandi asam amino ke-65 dan PtoR berakhir pada kodon penyandi asam amino ke-210 dari PTO tomat. Berdasarkan hal tersebut, amplikon yang diharapkan didapat sepanjang ~440 pb.

Dari 20 aksesi *Phalaenopsis* yang dievaluasi, PCR dengan PtoF dan PtoR menghasilkan amplikon ~500 pb (Gambar 1B). Setelah DNA *sequencing* seluruh fragmen amplikon, berhasil diidentifikasi runutan nukleotida sebanyak antara 423-449 pb. *Sequencing* langsung dilakukan terhadap produk PCR, sehingga sejumlah nukleotida di bagian ujung 5' ataupun ujung 3' tidak dapat ditentukan karena rendahnya kualitas identitas runutan DNA yang didapat. Dengan demikian, terdapat perbedaan panjang (51-77 pb) antara ukuran fragmen masing-masing amplikon dengan total runutan nukleotida yang teridentifikasi.

Primer *degenerate* spesifik *Pto* telah digunakan untuk mengamplifikasi bagian gen *Pto* dan menghasilkan

amplikon sepanjang ~540 pb untuk kakao (Kurniasih, 2012) serta ~550 pb untuk karet (Zhai *et al.*, 2014). Amplikon dari kakao dan karet tersebut merupakan bagian dari total *open reading frame* (ORF, 963 pb) gen *Pto* (Orsi *et al.*, 2011).

**Runutan Nukleotida Hasil Amplifikasi PCR**

*DNA sequencing* amplikon untuk 20 akses *Phalaenopsis* menghasilkan 38 runutan nukleotida yang berbeda dan teridentifikasi terdiri atas 423-449 pb (salah satu contohnya disajikan pada Gambar 1C). Dibandingkan dengan gen *Pto* asal tomat (AF220603.1), amplikon asal *Phalaenopsis* mengalami insersi 9 basa nukleotida pada posisi 265 dan delesi satu basa pada posisi 442. Translasi amplikon asal *Phalaenopsis* menyandikan 149 asam amino, tanpa intron dan stop kodon (Gambar 1C).

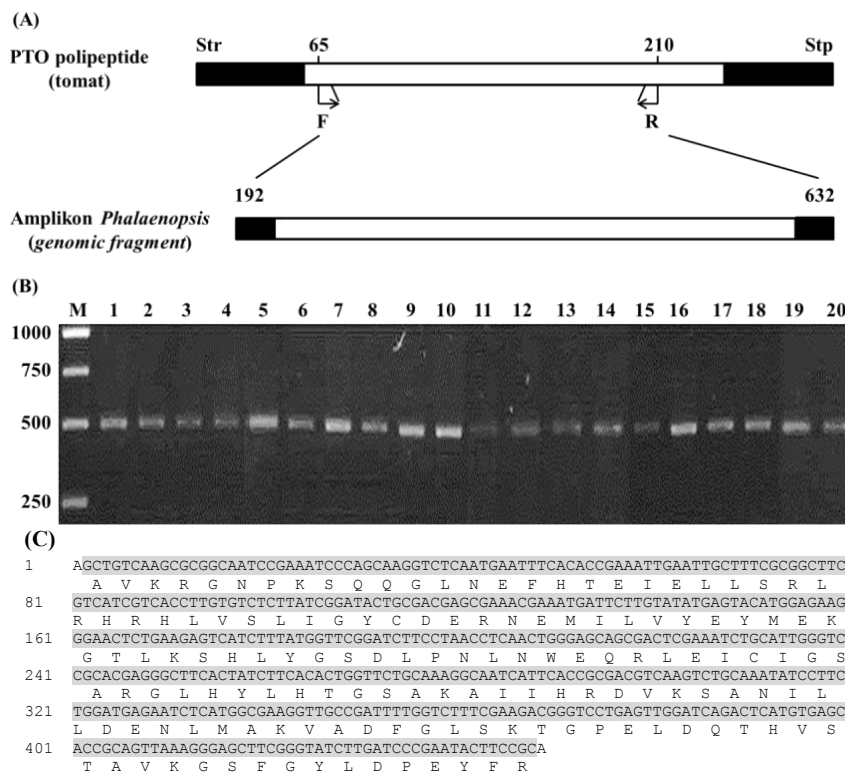
Analisis BLAST dengan semua akses di pangkalan data GenBank NCBI menunjukkan bahwa runutan asam amino yang ditranslasikan dari amplikon asal *Phalaenopsis* memiliki tingkat identitas yang tinggi (88-95%) dengan protein PTO (Tabel 1), antara lain dari: *Musa acuminata* (identitas 95%, AAM97914.1), *Capsicum chinensis* (89%, AAQ82660.1), *Nicotiana repanda* (89%, ACO25565.1) dan *Arachis hypogaea* (88%, AFB69787.1), sehingga amplikon tersebut diduga merupakan fragmen gen *Pto*. Runutan nukleotida amplikon asal *Phalaenopsis* (38 akses) yang teridentifikasi telah disimpan di pangkalan data GenBank

NCBI dengan nomor akses KR184099-KR184118 dan KR259359-KR259376.

**Identitas Amplikon Asal Phalaenopsis**

Domain katalitik merupakan bagian terkonservasi pada semua protein PTO (Oh dan Martin, 2011) sehingga dapat digunakan untuk memastikan identitas amplikon asal *Phalaenopsis*. Polipeptida hasil translasi dari amplikon asal *Phalaenopsis* merupakan bagian dari domain katalitik PTO (Gambar 2A), yaitu pada posisi nukleotida ke-192-632 (residu asam amino ke-65-210) jika dibandingkan dengan PTO tomat. Bagian tersebut mempunyai kesamaan identitas yang tinggi dengan domain *serine threonine kinase* sub-famili *Serine/Threonine kinases, Interleukin-1 Receptor Associated Kinases* (STK\_IRAK) yang merupakan bagian dari domain katalitik PTO (Gambar 2A). Hal ini mengindikasikan bahwa amplikon asal *Phalaenopsis* memang benar merupakan bagian dari gen *Pto*. Protein PTO memiliki domain katalitik protein kinase yang berperan penting dalam aktivasi respons ketahanan terhadap patogen bakteri (Lehti-Shiu dan Shiu, 2012). Pada domain katalitik PTO terdapat situs aktif enzim kinase (Castells dan Casacuberta, 2007) tipe *serine/threonine kinase* (Afzal *et al.*, 2008).

Analisis pensejajaran runutan asam amino hasil translasi amplikon *Phalaenopsis* dengan runutan domain katalitik PTO asal *M. acuminata*, *T. aestivum* dan domain



Gambar 1. (A) Diagram representasi protein yang disandi oleh gen *Pto* tomat *Lycopersicon esculentum* (aksesi AF220603.1, NCBI, 2003) dan posisi amplikon hasil PCR dengan primer spesifik *Pto* dan templat total DNA *Phalaenopsis* (NCBI, 2003). (B) Elektrofogram amplikon *Phalaenopsis* (*genomic fragment*) menggunakan sepasang primer spesifik *Pto*. (C) Runutan nukleotida dan hasil translasi amplikon *Phalaenopsis schilleriana*. Nukleotida yang diarsir merupakan bagian dari *catalytic domain* PTO. Str: Asam amino metionin. Stp: posisi kodon stop. Posisi primer F = *forward*, R = *reverse*, pb = pasang basa. Kolom 1-20: 20 akses anggrek *Phalaenopsis*; M = marka DNA (1 kb ladder)

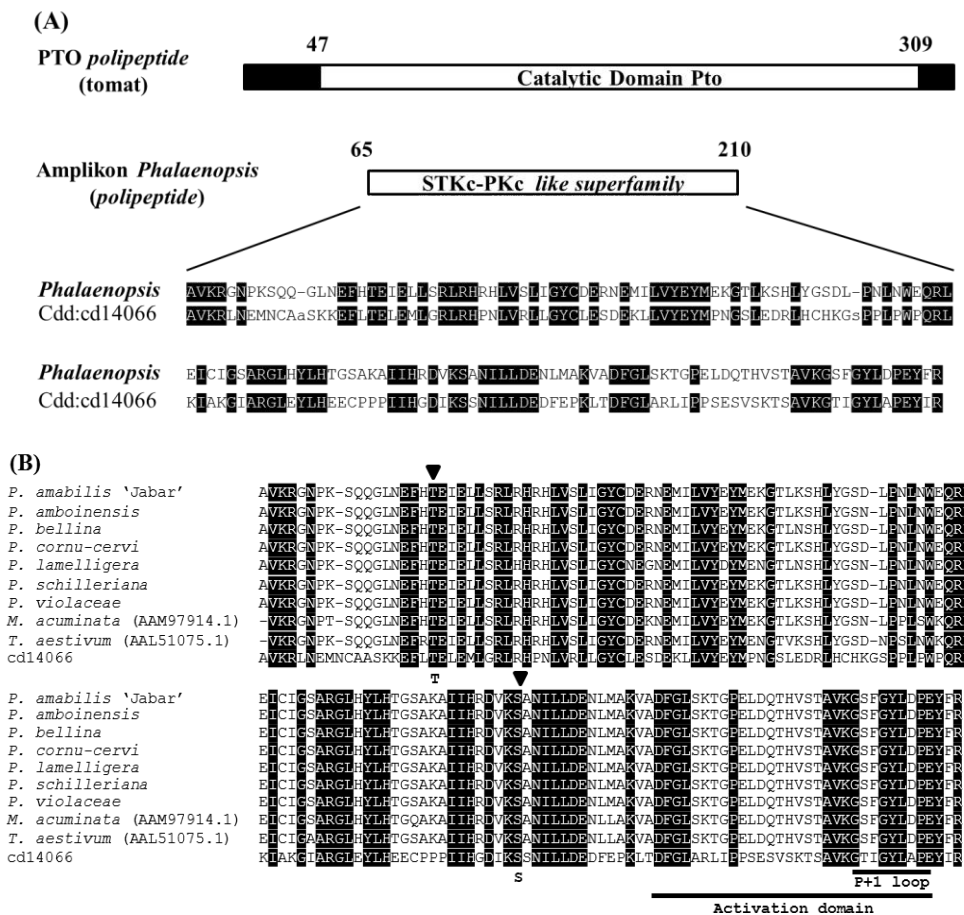
Tabel 1. *Sequence identity* antara runutan asam amino dari fragmen DNA hasil PCR asal *Phalaenopsis bellina* dengan fragmen *Pto* aksesori lain pada data GenBank

Akses GenBank	Deskripsi aksesori	Query coverage (%)	Nilai E	Identity (%)
AAM97914.1	Pto-like serine/threonine kinase ( <i>Musa acuminata</i> )	100	2.00E-99	95
ACO25565.1	Protein kinase-coding resistance protein ( <i>Nicotiana repanda</i> )	100	3.00E-93	89
AAQ82660.1	Pto-like serine/threonine kinase ( <i>Capsicum chinense</i> )	100	10.00E-94	89
AFB69787.1	Pto-like receptor kinase resistance protein ( <i>Arachis hypogaea</i> )	100	2.00E-94	88

terkonservasi STK\_IRAK (cd14066) juga menunjukkan identitas yang tinggi dan adanya situs aktif yang sama (Gambar 2B). Situs aktif sebagai bagian dari domain katalitik PTO diawali dengan motif residu asam amino DFG dan diakhiri motif PE, kedua motif tersebut dipisahkan oleh 25 residu asam amino (Gambar 2B). Pada situs aktif juga ditemukan domain *P+1 loop* yang ada di ujung akhir dari domain aktivasi (Gambar 2B). Residu asam amino terkonservasi, yang merupakan ciri domain katalitik PTO, terdiri atas asam amino threonine (T), serine (S) dan situs

*P+1 loop* internal (G[S/T][F/L]GY[L/I]DPE) sama-sama ditemukan pada hasil translasi amplikon asal *Phalaenopsis*, PTO asal *M. acuminata*, *T. aestivum*, dan CDD14066 (Gambar 2B). Hasil ini mengkonfirmasi identitas amplikon asal *Phalaenopsis* yang didapatkan menggunakan primer PtoF dan PtoR adalah bagian gen *Pto*, salah satu gen ketahanan yang ada dalam genom *Phalaenopsis*.

Residu asam amino S dan T merupakan situs autofosforilasi, sedangkan *P+1 loop* merupakan domain yang berasosiasi dengan *AvrPto* (Zhai et al., 2014). Parravicini



Gambar 2. Posisi relatif antara polipeptida yang ditranslasi dari amplikon asal *Phalaenopsis* dengan *catalytic domain* (cd) protein PTO (cd14066) (Marchler-Bauer et al., 2017). (A) Representasi *catalytic domain* (cd) protein PTO, posisi relatif polipeptida yang ditranslasi dari amplikon asal *Phalaenopsis* dan kesamaan residu asam aminonya dengan cd PTO. (B) Pensejajaran runutan asam amino polipeptida yang ditranslasi dari amplikon asal *Phalaenopsis* dengan *conserve domain* STKc-PKc (*Serine/Threonine Kinase – Protein Kinase catalytic*). AAM97914.1, AAL51075.1 merupakan aksesori PTO yang berasal dari NCBI DNA database dan cd14066 = bagian terkonservasi dari domain katalitik protein kinase. Residu asam amino aktif ditandai dengan segitiga hitam

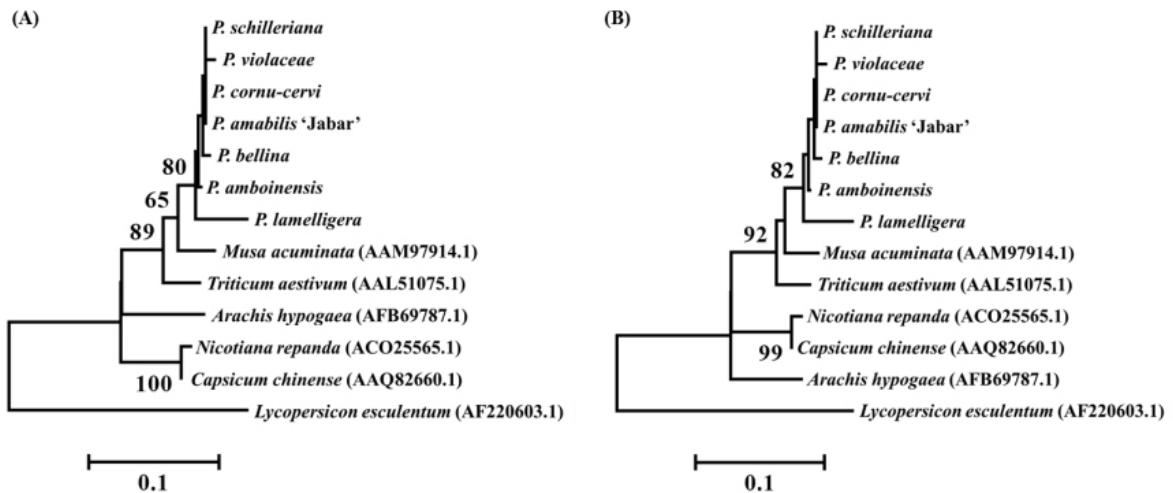


*et al.* (2011) menambahkan ketika *P+1 loop* berinteraksi dengan *AvrPto* maka residu asam amino *serine/threonine* mengalami autofosforilasi dan menyebabkan terjadinya transduksi sinyal untuk mengaktifkan mekanisme resistensi tanaman.

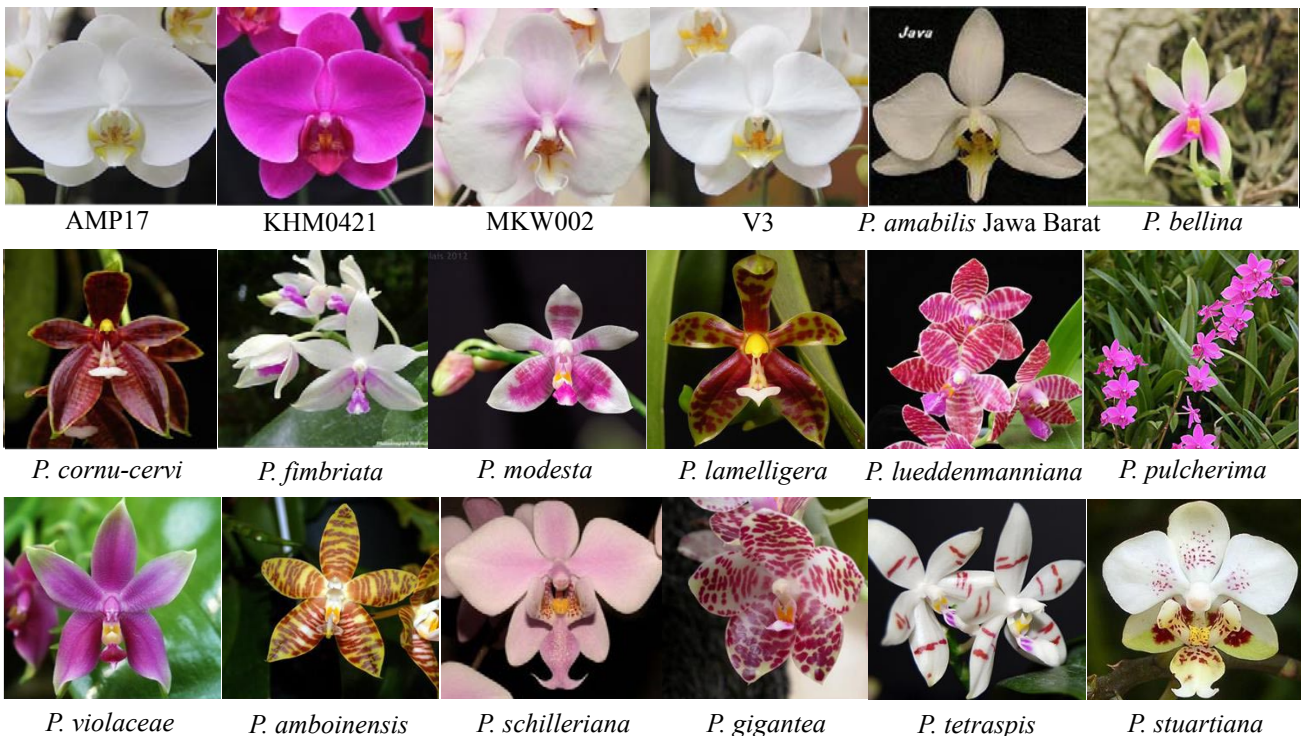
*Analisis Filogenetika Runutan Asam Amino Amplikon Asal Phalaenopsis*

Analisis filogenetik berdasarkan seluruh residu asam amino yang ditranslasikan dari amplikon, mengindikasikan adanya keragaman residu asam amino yang rendah dari gen *Pto* antar genotipe *Phalaenopsis* (Gambar 3.A).

Berdasarkan seluruh residu asam amino yang ditranslasikan dari amplikon dan berdasarkan *catalytic domain* PTO-nya, PTO asal *Phalaenopsis* diduga memiliki progenitor yang sama dengan PTO asal *M. Acuminata*, *T. aestivum*, *Arachis hypogaea*, *Capsicum chinensis* dan *Nicotiana repanda* (Gambar 3.A dan 3.B). Sebaliknya, PTO asal *Phalaenopsis* diduga memiliki progenitor yang berbeda dengan PTO asal tomat (Gambar 3.A dan 3.B). Sebaliknya, PTO asal *Phalaenopsis* diduga memiliki progenitor yang berbeda dengan PTO asal tomat (Gambar 3.A dan 3.B). Pada Gambar 4 disajikan keragaman karakteristik bunga dari 20 aksesi anggrek *Phalaenopsis* yang digunakan dalam penelitian.



Gambar 3. Hasil analisis filogenetik menggunakan: (A) Runutan asam amino hasil translasi dari amplikon, dan (B) Runutan asam amino dari domain terkonservasi gen *Pto*, untuk 20 aksesi anggrek *Phalaenopsis* dan tanaman lain dengan metode Neighbor-Joining. Angka pada sumbu percabangan menunjukkan nilai hasil analisis *bootstrap* dengan 1000 ulangan



Gambar 4. Representasi keragaman karakteristik bunga dari berbagai aksesi anggrek *Phalaenopsis* yang digunakan dalam penelitian

## KESIMPULAN

PCR dengan pasangan primer PtoF dan PtoR serta templat genom *Phalaenopsis* menghasilkan amplikon sepanjang ~500 pb, tetapi hasil *DNA sequencing* hanya mampu mengidentifikasi 449 pb. Amplikon asal *Phalaenopsis* menyandi 149 residu asam amino, yang kesamaan identitasnya mencapai 88% sampai 95% dengan sejumlah aksesori PTO di pangkalan data GenBank NCBI. Hasil analisis perbandingan urutan asam amino menunjukkan bahwa amplikon merupakan penyandi bagian dari domain katalitik PTO dan domain *serine threonine kinase* subfamili Serine/Threonine kinases, Interleukin-1 Receptor Associated Kinases (STK\_IRAK). Berdasarkan urutan asam aminonya, keragaman protein PTO antar genotipe *Phalaenopsis* tergolong rendah. Berdasarkan *catalytic domain*-nya, PTO asal *Phalaenopsis* diduga memiliki progenitor yang sama dengan PTO asal *M. acuminata*, *T. aestivum*, *A. hypogaea*, *C. chinensis* dan *N. repanda* tetapi berbeda dengan PTO asal tomat.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini merupakan bagian dari tesis magister Juanita Elina yang berjudul “Respon Ketahanan Inang terhadap Penyakit Busuk Lunak dan Karakterisasi Molekuler dengan Marka SNAP pada Anggrek *Phalaenopsis*.” Penelitian didukung dana dari Hibah Kompetensi, No. Kontrak: 083/SP2H/PL/Dit.Litabmas/II/2015 tahun 2015, Ditjen Dikti, Kementerian Pendidikan Nasional RI, yang dikoordinir Dr Dewi Sukma.

## DAFTAR PUSTAKA

- Afzal, A.J., A.J. Wood, D.A. Lightfoot. 2008. Plant receptor-like serine threonine kinases: roles in signaling and plant defense. *MPMI* 21:507-517.
- Castells, E., J.M. Casacuberta. 2007. Signalling through kinase-defective domain: the prevalence of atypical receptor-like kinases in plants. *J. Exp. Bot.* 58:3503-3511.
- Fu, S.F., H.J. Huang. 2011. Molecular characterization of the early response of orchid *Phalaenopsis amabilis* to *Erwinia chrysanthemi* infection. *Orchid Biotech* II:283-308.
- Gurunani, M. A., J. Venkatesh, C. P. Upadhyaya, A. Nookaraju, S. K. Pandey, S. W. Park. 2012. Plant disease resistance genes: current status and future directions. *Physiol. Molec. Plant Pathol.* 78:51-65.
- Handini, A.S. 2014. Analisis keragaman morfologi dan biokimia pada anggrek *Phalaenopsis* serta analisis keragaman genetik dengan marka SNAP. Tesis. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Han, X., L. Li, L. Cui, J. Xing, L. Tang, M. Cao. 2011. Isolation of candidate disease resistance genes from enrichment library of *Oryza minuta* based on conserved domains. *African J. Biotechnol.* 10:14738-14745.
- Kurniasih, S. 2012. Pemanfaatan marka molekuler untuk mendukung perakitan kultivar unggul kakao (*Theobroma cacao* L.). Disertasi. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Lehti-Shiu, M.D., S. Shiu. 2012. Diversity, classification and function of the plant protein kinase superfamily. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 367:2619-2639.
- Marchler-Bauer, A., Y. Bo, L. Han, J. He, C.J. Lanczycki, S. Lu, F. Chitsaz, M.K. Derbyshire, R.C. Geer, N.R. Gonzales, M. Gwadz, D.I. Hurwitz, F. Lu, G.H. Marchler, J.S. Song, N. Thanki, Z. Wang, R.Z. Yamashita, D. Zhang, C. Zheng, L.Y. Geer, S.H. Bryant. 2017. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Res.* 45(D1):D200-D203.
- Meyers, B.C., S. Kaushik, R.S. Nandety. 2005. Evolving disease resistance genes. *Current Opinion Plant Biol.* 8:129-134.
- NCBI. 2003. *Lycopersicon esculentum* VFNT Cherry Pto locus, complete sequence. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/8547233/> [8 Agustus 2017].
- Oh, C., G.B. Martin. 2011. Effector-triggered immunity mediated by the *Pto* kinase. *Trends Plant Sci.* 16:1360-1385.
- Orsi, I., M. Malatrasi, E. Belfanti, M. Gulli, N. Marmioli. 2011. Determining resistance to *Pseudomonas syringae* in tomato, a comparison of different molecular markers. *Molec. Breeding* 30:967-974.
- Parravicini, G., C. Gessler, C. Denance, P. Lasserre-Zuber, E. Vergne, M. Brisset, A. Patocchi, C. Durel, G.A.L. Broggin. 2011. Identification of serine/threonine kinase and nucleotide-binding site-leucine-rich repeat (NBS-LRR) genes in the fire blight resistance quantitative trait locus of apple cultivar ‘Evereste’. *Molec. Plant Pathol.* 12:493-505.
- Peraza-Echeverria, S., A. James-Kay, B. Canto-Canche, E. Castillo-Castro. 2007. Structural and phylogenetic analysis of *Pto*-type disease resistance gene candidates in banana. *Molec. Genet. Genomics* 278:443-453.

- Quirin, E.A., H. Mann, R.S. Meyer, A. Traini, M.I. Chiusano, A. Litt, J.M. Bradeen. 2012. Evolutionary meta-analysis of solanaceous resistance gene and *Solanum* resistance gene analog sequences and a practical framework for cross-species comparisons. *MPMI* 25:603-612.
- Rose, L.E., R.W. Michelmore, C.H. Langley. 2007. Natural variation in the *Pto* disease resistance gene within species of wild tomato (*Lycopersicon*). II. Population genetics of *Pto*. *Genetics* 175:1307-1319.
- Singh, S.P., S. Vivek, R.L. Bezbaruah, M. Barooah. 2012. Prediction of the three-dimensional structure of serine/threonine protein kinase PTO of *Solanum lycopersicum* by homology modelling. *Bioinformatics* 8:212-215.
- Sudarsono, M.D. Haristianita, A.S. Handini, D. Sukma. 2017. Molecular marker development based on diversity of genes associated with pigment biosynthetic pathways to support breeding for novel colors in *Phalaenopsis*. *Acta Hort.* 1167:305-312.
- Sudarsono, S., J. Elina, Giyanto, D. Sukma. 2017. Pathogen Causing *Phalaenopsis* Soft Rot Disease – 16S rDNA and Virulence Characterisation. *Plant Protection Sci.* [http://www.agriculturejournals.cz/web/pps.htm?type=article&id=18\\_2017-PPS](http://www.agriculturejournals.cz/web/pps.htm?type=article&id=18_2017-PPS). DOI:10.17221/18/2017-PPS.
- Sukma, D., J. Elina, Giyanto, Sudarsono. 2017. Disease resistance breeding of *Phalaenopsis* spp. for tropical environment and molecular marker development for plant selection. *Acta Hort.* 1167:237-243.
- Sutanto, A., D. Sukma, C. Hermanto, S. Sudarsono. 2014. Isolation and characterization of Resistance Gene Analogue (RGA) from *Fusarium* resistant banana cultivars. *Emir. J. Food Agric.* 26:508-518.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, S. Kumar. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28:2731-2739.
- Toth, I.K., J.M. van der Wolf, G. Saddler, E. Lojkowska, V. Helias, M. Pirhonen, L. Tsrer (Lahkim), J.G. Elphinstone. 2011. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. *Plant Pathol.* 60:385-399.
- Wan, H., C. Qian, A.A. Malik, Z. Zhao, J. Chen. 2009. Isolation, phylogeny and evolutionary analysis of *Pto*-type disease resistance gene analogues from a *Cucumis hystrix* introgression line of cucumber (*C. sativus*). *Funct. Plant Biol.* 37:513-523.
- Wan, H., W. Yuan, M. Ruan, Q. Ye, R. Wang, Z. Li, G. Zhou, Z. Yao, Y. Yang. 2013. Identification, phylogeny, and expression analysis of *Pto*-like genes in pepper. *Plant Molec. Biol. Rep.* 31:901-916.
- Yusnita, Y. W. Widodo, S. Sudarsono. 2005. In vitro selection of peanut somatic embryos on medium containing culture filtrate of *Sclerotium rolfsii* and plantlet regeneration. *HAYATI J. Biosci.* 12:50-56.
- Zainal, A., A. Anwar, S. Ilyas, Sudarsono, Giyanto. 2011. Uji inokulasi dan respon ketahanan 38 genotipe tomat terhadap *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *J. Agron. Indonesia* 39:85-91.
- Zhai, W., Y. Zhao, L.X. Zhang, X.J. Li. 2014. Structural and phylogenetic analysis of *Pto*-type disease resistance gene candidates in *Hevea brasiliensis*. *Genet. Molec. Res.* 13:4348-4360.