

MOLECULAR GENETIC ANALYSIS OF MITOCHONDRIAL GENE ASSOCIATED WITH NEW CYTOPLASMIC MALE STERILITY LINES IN RICE

ABSTRACT

Hybrid technology in rice required to exploit heterosis plant in large scale commercially. Self-fertilization and single fertilization in rice disabled manual hybrid technique due to high labor cost for manual emasculation. Therefore Cytoplasmic Male Sterility (CMS) systems in rice have mainly developed to overcome the prevention of self pollination and increased genetic diversity by facilitating the heterosis occurrence. Research was conducted and three new CMS lines were developed: WRC20-CMS, WRC27-CMS and WRC36-CMS line. The aim of this research was to determine the novel candidate of CMS-associated gene in new CMS lines. Characterization of morphology was observed by I₂KI pollen staining and seed setting rate calculation. Genomic DNAs and RNAs extracted from leaf samples were then subjected to be characterized using Southern Blot and Northern Blot analysis with probes of known CMS-associated genes: *atp6*, *orf79*, *orf288* and *orf352*. Pollen morphology of new CMS lines were morphologically normal but showed no seed set. Southern blot analysis indicated that three CMS lines do not carry *orf79* nor *orf352*. The *orf288* probes detected bands, yet the full-length *orf288* was not detected using PCR analysis. Bioinformatics analysis revealed that one of WRC20 contigs, LQHF01073980, shared significant homology (93% amino acid identity) with *orf288*, encoding a novel ORF containing 312 aa protein, hereinafter this *orf* called as *orf312*. This ORF312 showed particular characteristics of CMS-associated genes: chimeric in structure to that of COX2 and was encoded peptide with one transmembrane domain. It could be concluded that *orf312* was predicted as a novel mitochondrial gene associated with new CMS lines in rice.

Key words: cytoplasmic male sterility, rice, *orf312*, chimeric structure, transmembrane domain

ANALISIS GENETIKA MOLEKULER GEN MITOKONDRIA YANG BERKAITAN DENGAN STERILITAS GALUR MANDUL JANTAN SITOPLASMIK BARU PADA PADI

INTISARI

Teknologi hibrida pada padi membutuhkan aplikasi sifat heterosis tanaman secara komersial pada skala luas. Sifat penyerbuk sendiri dan penyerbukan tunggal pada padi menyebabkan teknik hibrida manual tidak memungkinkan untuk dilakukan karena tingginya biaya emaskulasi. Pemanfaatan sistem Galur Mandul Jantan Sitoplasmik (GMJS) dilaporkan dapat mencegah proses penyerbuk sendiri dan meningkatkan keragaman genetik dengan membentuk sifat heterosis. Terdapat tiga galur mandul jantan sitoplasmik baru pada padi yang telah dikembangkan, yakni: GMJS-WRC20, GMJS-WRC27 dan GMJS-WRC36. Tujuan dari penelitian ini adalah menentukan kandidat gen *novel* mitokondria penentu sifat mandul jantan pada ketiga galur baru tersebut. Karakterisasi morfologi polen dilakukan dengan pengecatan butir pollen menggunakan I₂KI, dan perhitungan *seed setting rate*. Total DNA dan RNA genom diisolasi dari sampel daun dan digunakan sebagai bahan untuk analisis *Southern blot* dan *Northern blot* menggunakan *probe* spesifik, yakni: *atp6*, *orf79*, *orf352*, dan *orf288*. Morfologi polen ketiga galur mandul jantan menunjukkan sifat normal namun tidak memiliki kemampuan membentuk benih. Hasil analisis *Southern blot* mengindikasikan bahwa genom pada ketiga galur mandul jantan tidak mengandung fragmen gen *orf79* dan *orf352*, namun mengandung fragmen yang memiliki kemiripan dengan *orf288* walaupun tidak utuh. Analisis bioinformatika menunjukkan bahwa salah satu data *contigs* WRC20, LQHF01073980, memiliki struktur homologi yang signifikan (93% sekuens asam amino) dengan *orf288*, dan mengkode ORF *novel* dengan 312 asam amino, yang kemudian disebut *orf312*. ORF312 memiliki karakter spesifik dari gen-gen yang berkaitan dengan penentu sterilitas, yakni: memiliki struktur kimera dengan COX2 dan diprediksi mengkode peptida dengan satu domain transmembran. Maka dari itu dapat disimpulkan jika *orf312* merupakan salah satu kandidat gen *novel* mitokondria yang berkaitan dengan penentu sterilitas ketiga GMJS baru pada padi.

Kata kunci: galur mandul jantan sitoplasmik, padi, *orf312*, struktur kimera, domain transmembran