

Perbandingan Tiga Metode Transformasi *Agrobacterium* Untuk Pencarian Gen-gen Terkait Toleransi Kekeringan Menggunakan Transposon Ac/Ds pada padi cv. Batutegi

E.S.Mulyaningsih¹, H.Aswidinnor², D.Sopandie², P.B.F.Ouwerkerk³, S. Nugroho¹, I.H. Slamet Loedin¹ Email: enungf@yahoo.com

¹Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, ²Departemen Agronomi Institut Pertanian Bogor, ³Institute of Biology IBL Leiden University Netherlands

ABSTRACT

Transformation Strategy for Indonesian Indica Rice in Attempt to Discover Drought-Tolerant Related Genes Using of Transposon Ac/Ds. Attempt to identify, isolate the gene, and study for gene function for several agronomical traits have been done including some drought tolerant traits. Japonica rice cultivars have been used due to its higher efficiencies compared with indica cultivars. Two plasmids namely pNU400 and pUR224 were used to generate mutants of these cultivars (Batutegi dan Kasalath cultivars). Those plasmids contain an element called Activator (*Ac*) and Dissociator (*Ds*) respectively. The pNU400 contains GFP (green fluorescence protein) as a selectable marker, whereas the pUR224 contains hygromycin resistant gene and *gusA* as a reporter gene. Each plasmid was transformed into rice genome of Batutegi and Kasalath cultivars by *Agrobacterium* mediated transformation using three methods of transformation (A, B and C). The transformation method A was not suitable for both cultivars, where none of plantlets were produced from pNU400 and pUR224 plasmids. The transformation method B produced some plantlets from the Kasalath cultivar only using pUR224 plasmid. The transformation method C was the best method to produce transgenic plants from both cultivars (Batutegi and Kasalath), using both plasmids (pNU400 and pUR224). The PCR analysis showed that 19 and 9 plants of Batutegi and Kasalath contained both *gusA* and *hpt* genes respectively. None of those plants contained of *gusA* gene. Southern blot analysis revealed 3 independent lines from Batutegi dan 7 independent lines from Kasalath. The integration of Ac transposon was analyzed based on expression *gfp* gene when observed under UV dark reader. This research has proved that indica rice cultivars, especially the Batutegi cultivar of Indonesian origin, could be transformed. The cultivar could be used as plant model for the indica transformation.

Key words: transformation, drought tolerant, indica rice, *Ac/Ds* transposons, *Agrobacterium*.

PENDAHULUAN

Padi merupakan makanan pokok bagi lebih dari separuh penduduk dunia. Selain itu tanaman padi juga dijadikan

sebagai model untuk studi sistem transformasi genetik dan fungsi genetik tanaman monokotil. Perbaikan sifat tanaman padi secara bioteknologi telah dilakukan untuk mendapatkan tanaman

yang sesuai harapan. Teknik rekayasa genetik ialah dengan memasukkan gen-gen tertentu yang diinginkan. Salah satu sifat yang diinginkan ialah toleransi tanaman terhadap cekaman abiotik, diantaranya kekeringan, karena kekeringan dapat menekan pertumbuhan dan menurunkan produktivitas tanaman sebesar 70% (Bray *et al.* 2000).

Transformasi genetik sangat penting untuk mempelajari sifat genetik dan mengetahui fungsi gen. Keberhasilan transformasi genetik padi kultivar japonica (niponbare) menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* (*Agrobacterium mediated transformation* = AMT) sangat penting karena teknik ini dapat diaplikasikan untuk kultivar lainnya (Hiei *et al.* 1994). Sekarang ini transformasi dengan *Agrobacterium* pada padi digunakan bukan hanya untuk memasukkan satu gen target untuk tujuan perbaikan sifat tetapi juga untuk tujuan mempelajari fungsi gen target dengan cara meningkatkan atau menghilangkan ekspresinya (Dong *et al.* 1996; Meijer *et al.* 2000; Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki 2001; Deng *et al.* 2002; Scarpella *et al.* 2005; Hu *et al.* 2006; Xiao *et al.* 2007). Selain itu, teknik AMT juga digunakan untuk membentuk populasi pustaka mutan menggunakan insersi T-DNA atau menggunakan elemen loncat (transposon) seperti *Ac/Ds* dari tanaman jagung atau kombinasinya (Greco *et al.* 2004; Izawa *et al.* 1991; Kolesnik *et al.* 2004).

Transposon *Ac/Ds* diintroduksi ke dalam genom tanaman padi dengan memanfaatkan T-DNA dari suatu vektor ganda. Transposon *Ds* yang telah masuk

dalam genom akan berpindah posisi jika diinduksi oleh protein *Ac* transposase pada generasi berikutnya, sehingga dapat dimanfaatkan untuk melakukan mutasi. Jika diperoleh tanaman *T0* yang cukup banyak, diharapkan dari setiap tanaman tersebut diperoleh generasi tanaman *T1* dengan insersi transposon yang berbeda. Insersi transposon diharapkan terjadi pada gen penting dan menghasilkan fenotipe tanaman tertentu sehingga fungsi gen yang dirusaknya (*knock out*) dapat diamati. Pada kenyataannya, tidak setiap *knock out* dapat menghasilkan fenotipe baru, hal ini disebabkan oleh adanya gen lain yang mampu menggantikan fungsi gen yang di-*knock out*. Oleh karena itu, vektor yang digunakan dalam penelitian ini mempunyai fungsi lain yaitu sebagai *gen-trap* (Gambar 1). Dengan fungsi ini meskipun insersi transposon tidak memunculkan fenotipe baru, tetapi aktivitas dari promotor gen tersebut dapat diidentifikasi dengan memperhatikan ekspresi gen pelapor yang diintroduksi bersama dengan transposon. Dengan melihat pola ekspresi gen pelapor maka fungsi gen disekitar daerah insersi dapat diperkirakan. Identifikasi gen dan prediksi fungsi gen prosesnya semakin dipercepat dengan telah dilaporkannya urutan DNA genom dari padi japonica cv. Niponbare (Buell 2002).

Jenis padi *indica* ditanam dan dikonsumsi secara luas di dunia termasuk di Indonesia, tetapi informasi keberhasilan transformasi genetik pada padi jenis ini masih terbatas. Hal ini dikarenakan jenis padi *indica* umumnya kurang responsif. Transformasi genetik padi *indica* dengan AMT dilaporkan mempunyai efisiensi

keberhasilan transformasi rendah (Rashid *et al.* 1996; Nayak *et al.* 1997; Khanna & Raina 2002). Efisiensi transformasi dapat ditingkatkan terhadap empat kultivar indica dengan melakukan perubahan variasi media dasar (Lin & Zhang, 2005). Hiei dan Komari (2006) dengan menggunakan material eksplan embrio belum masak (*immature embryo*) melaporkan efisiensi transformasi hingga 30% untuk setiap embrio pada 10 kultivar padi indica yang digunakan.

Berbagai upaya dilakukan untuk meningkatkan nilai efisiensi transformasi antara lain tipe eksplan yang digunakan. Material eksplan yang digunakan dapat berupa kalus yang dihasilkan oleh bagian skutelum benih (Hiei *et al.* 1994; Rashid *et al.* 1996; Kumar *et al.* 2005), transformasi menggunakan benih secara langsung (Toki *et al.* 2006), kalus dari embrio belum masak (Dong *et al.* 1996), embrio belum masak (Hiei & Komari 2006) dan tunas pucuk (Hiei *et al.* 1994).

Tujuan penelitian ini ialah membandingkan tiga metode transformasi *AMT* yaitu metode Hiei *et al.* 1994, Toki *et al.* 2006 dan Hiei dan Komari 2006 terhadap padi indica gogo Indonesia cv. Batutegi dan cv. Kasalath sebagai kultivar pembanding (padi lokal Thai-land), untuk memperoleh metode transformasi paling sesuai untuk kedua kultivar. Tanaman transgenik yang dihasilkan merupakan awal untuk membuat pustaka mutan *Ac/Ds* pada padi indica menggunakan *AMT*. Hasil penelitian ini juga diharapkan menjadi informasi penting untuk membuktikan bahwa padi indica cv. Batutegi dapat ditransformasi.

BAHAN DAN CARA KERJA

Benih padi cv. Batutegi dan Kasalath diperoleh dari Instalasi Penelitian Padi Muara Bogor. Plasmid rekombinan yang digunakan yaitu pNU400 dan pUR224 masing-masing mengandung transposon *Ac* dan *Ds*, diperoleh dari Dr. Narayana Uppadhyaya (CSIRO Plant Industry-Australia).

Benih masak atau benih belum masak (berumur 8-12 hari setelah anthesis) padi cv. Batutegi dan Kasalath dikupas dan disterilisasi. Sterilisasi benih mengikuti metode yang dikemukakan Toki *et al.* 2006. Eksplan berupa benih masak selanjutnya ditiriskan diatas kertas steril sebelum ditanam pada media induksi kalus (Hiei *et al.* 1994) atau sebelum ditransformasi langsung (Toki *et al.* 2006). Pada kedua metode ini selanjutnya eksplan disimpan dalam ruang gelap dengan suhu 26°C. Pada ekplan benih belum masak, embrio diperoleh dengan cara mengeluarkan embrio belum masak dari benih menggunakan pinset dalam ruang laminar. Embrio yang diambil berukuran antara 1,3 – 1,8 mm dan material ini selanjutnya digunakan untuk kegiatan transformasi.

Plasmid rekombinan (pNU400 and pUR224) ditransformasikan ke dalam sel kompetan *A. tumefaciens* strain Agl-1 dengan menggunakan elektroporator. *A. tumefaciens* ditumbuhkan dalam medium agar yang mengandung 100 mg/l carbeniksilin dan 50 mg/l kanamisin untuk pNU400. Bakteri yang ditransformasi dengan plasmid pUR224 ditumbuhkan dalam media AB yang mengandung 100 mg/l carbeniksilin dan 50mg/l

spectinomisin. Bakteri ditumbuhkan selama 3 hari pada suhu 28°C. Bakteri diambil dengan menggunakan spatula dan dilarutkan menggunakan media AAM (amino acid medium, yang mengandung 100 mM asetosiringone) hingga mencapai kerapatan sel tertentu sesuai dengan metode (Tabel 1).

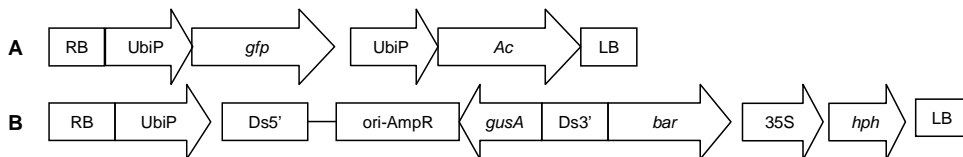
Transformasi *A.tumefaciens* strain Ag11 Metode Transformasi A (Hiei et al. 1994)

Metode transformasi ke dalam kalus embriogenik menggunakan *A.tumefaciens* seperti yang dikemukakan Hiei et al. (1994) dengan media yang dimodifikasi Loedin dkk. (1997). Benih masak yang telah disterilisasi ditanam pada media induksi kalus IK3 sehingga diperoleh kalus embriogenik IK3 (media dasar LS yang mengandung 2,5 mg/l 2,4-D dan dipadatkan dengan 0,2% phytigel). Induksi kalus dilakukan selama 2 minggu dalam ruang gelap. Pada saat infeksi, kalus direndam dalam kultur cair *Agrobacterium* selama 30 menit. Kalus dan bakteri di ko-kultivasi dalam media IK3-AS (IK3 yang mengandung 0,1 M

asetosiringone) dan diinkubasi pada suhu 25°C selama 3 hari dalam ruang gelap. Untuk transforman menggunakan plasmid pUR224, setelah ko-kultivasi kalus dicuci dengan 400 mg/l cefotaxime dan diseleksi pada media IK3C₂₅₀H₅₀ (IK3 yang mengandung 250 mg/l cefotaxime dan 50 mg/l higromisin. Sedangkan untuk transforman pNU400 setelah kalus dicuci kemudian ditanam pada media yang hanya mengandung 250 mg/l cefotaxime. Dua minggu kemudian kalus dipindah ke media seleksi IK3C₅₀H₅₀ (untuk pUR224) atau tanpa higromisin (pNU400). Kalus yang tahan terhadap antibiotik higromisin disubkultur ke dalam media regenerasi R3B (LS + 0,5 mg/l IAA + 0,3 mg/l BAP dan 0,5% phytigel). Transforman yang berasal dari pUR224, planlet yang diperoleh ditanam pada media MS tanpa hormon dan mengandung 50 mg/l higromisin.

Metode Transformasi B (Toki et al. 2006)

Benih masak yang telah disteril selanjutnya diprakultur dalam media



Gambar 1. Skema daerah T-DNA dalam vektor transformasi pNU400 dan pUR224.

Keterangan: (A). T-DNA vektor pNU400 – *iAc*: RB (border kanan), Ubi1P-*sgfpS65T* (gen penanda dikontrol oleh promotor ubi), Ubi1P-*iAc* transposon yang sudah didelesi pada posisi 5' (inaktif dikontrol oleh promotor Ubi), LB (border kiri). (B). T-DNA vektor pUR224 – *Ds*: RB (border kanan), Ubi1P-*Ds* (*disociator*), gen ketahanan terhadap ampisilin untuk perbanyakan di *E.coli*, *Ds* yang memiliki intron GPA1 dengan *splice acceptor* (SA) di depan gen penanda *gusA* yang berfungsi sebagai *gene trap*, gen ketahanan terhadap basta (*bar*) yang akan aktif setelah *Ds* mengalami transposisi, gen penyeleksi ketahanan terhadap higromisin yang dikendalikan oleh promotor 35S, LB (border kiri). Masing-masing T-DNA berada dalam pCAMBIA1300 sebagai vektor *back-bone*. (Sumber: Dr. Narayana Uppadhyaya, CSIRO Plant Industry-Australia).

induksi kalus (media dasar MS yang mengandung 1 mg/l 2,4-D) dan 3% phytigel sebagai bahan padat. Prakultur dilakukan 4 - 6 hari pada ruang gelap dengan suhu 26°C. Setelah prakultur, benih dimasukkan dalam tabung dan direndam dalam larutan *Agrobacterium* sambil dibolak balik selama 1,5 menit, kemudian ditiriskan di atas kertas saring steril. Benih selanjutnya ditempatkan di atas kertas filter steril (Whatman diameter 9 cm) yang telah dilembabkan dengan 0,5 ml larutan bakteri, lalu ditempatkan di atas media kokultivasi (MS+1mg/l2,4-D+0,1 M asetosiringone). Kokultivasi dilakukan pada kondisi gelap selama 3 hari pada suhu 25°C. Selanjutnya benih dicuci menggunakan air steril sebanyak 5 kali dan 1 kali dengan larutan yang mengandung 400 mg/l antibiotik cefotaksim untuk mematikan *Agrobacterium*. Benih dikeringkan di atas kertas saring steril dan dikultur dalam media seleksi (MS + 1 mg/l 2,4-D + 50 mg/l higromisin and 250 mg/l cefotaksime) untuk benih yang ditransformasi dengan pUR224 dan pada media yang sama tanpa higromisin untuk benih yang ditransformasi pNU400. Selama dalam media seleksi, kultur disimpan dalam kondisi terang dengan suhu 32°C selama 2 minggu. Kalus yang terbentuk dari bagian skutelum benih selanjutnya dipindahkan dalam media praregenerasi selama 2 minggu (MS+ 1 mg/l kinetin dan 1 mg/l NAA) dan ditambahkan 50 mg/l higromisin untuk transforman dari pUR224. Selanjutnya kalus di subkultur ke dalam media yang sama sebagai media regenerasi. Untuk transforman yang berasal dari pUR224,

planlet yang diperoleh ditanam pada media dasar MS tanpa hormon dan mengandung 50 mg/l higromisin.

Metode Transformasi C (Hiei & Komari 2006)

Embrio belum masak yang telah diperoleh ditempatkan dalam media kokultivasi NB-As (media dasar N6 + 2 mg/l2,4-D, 1 mg/lNAA, 1 mg/l BA, 0,1 M asetosiringone, dan 5,5 g/l agarose tipe 1). Infeksi dengan *Agrobacterium* dilakukan pada suhu 25°C dalam gelap selama 7 hari dalam media kokultivasi. Tunas yang terbentuk dipotong menggunakan skalpel. Setiap langkah subkultur yang dilakukan menggunakan suhu 30°C dalam kondisi terang. Embrio belum masak yang telah diinfeksi dipindahkan ke dalam media seleksi NBM-1 selama 5 hari (media NB + 2 mg/l 2,4-D, 1 mg/l NAA, 0,2 mg/l BA + 5 g/l gelrite + 250 mg/l cefotaxim dan 100 mg/l timentin) dengan bagian skutelum menghadap ke atas. Kultur dipindahkan ke dalam media seleksi NBM-2 (NBM-1 + 50 mg/l higromisin) selama 3 minggu untuk transforman dari plasmid pUR224 sedangkan transforman pNU400 dipindahkan ke dalam media NBM-1. Kalus transforman tahan higromisin dari pUR224 dipindahkan ke media pra regenerasi NBPR- hig (media NB + 2 mg/l 2,4-D, 2 mg/l NAA, 1 mg/l BA + 7 g/l gelrite + 50 mg/l higromisin) dan kalus transforman pNU400 ke media NBPR tanpa higromisin selama 10 hari. Selama dalam media NBPR pengamatan terhadap kalus transforman pNU400 yang berpendar dilakukan ketika diamati di atas lampu UV (*dark reader*). Kalus

yang telah cukup besar dan kehijauan asal pUR224 dipindahkan ke dalam media regenerasi RNM-hig (media NB + 1 mg/l NAA, 3 mg/l BA + 4 g/l agarose tipe-1 + 40 mg/l higromisin), serta kalus berpondar asal pNU400 dipindahkan ke dalam media regenerasi yang sama tanpa menggunakan higromisin. Dua minggu kemudian plantlet asal pUR224 dipindahkan ke media perakaran (MS + 2 mg/l NAA + 25 mg/l higromisin) dan tanpa higromisin untuk pNU400. Plantlet dengan perakaran cukup kuat dipindahkan ke dalam media tanah dalam pot. Perbedaan ketiga teknik transformasi disajikan dalam Tabel 1. Pengamatan dilakukan terhadap :

Efisiensi transformasi (%)

$$\text{pUR224} = \frac{\text{Kalus tahan higromisin}}{\text{Kalus awal ditransformasi}} \times 100\%$$

$$\text{pNU400} = \frac{\text{Kalus berpondar}}{\text{Kalus awal ditransformasi}} \times 100\%$$

Efisiensi regenerasi (%)

$$= \frac{\sum \text{kalus beregenerasi}}{\sum \text{kalus tahan higromisin/ berpondar}} \times 100\%$$

Analisis Integrasi Gen

Metode PCR (Polimerase chain reaction)

Analisis PCR dilakukan untuk mengkonfirmasi adanya transposon (*Ds*) pada tanaman generasi pertama (T_0) hasil transformasi pUR224. Konfirmasi berdasarkan keberadaan gen penanda yang ada dalam daerah T-DNA (*gusA* dan *hpt*) dalam genom. DNA genomik diisolasi dengan metode CTAB (hexaacyl

trimethyl ammonium bromide) terhadap tanaman kontrol (tidak ditransformasi) dan terhadap kandidat tanaman transgenik hasil transformasi.

Metode isolasi adalah sebagai berikut: daun muda sepanjang 5 cm dimasukkan ke dalam tabung 1.5 ml, diberi N_2 cair lalu digerus dan ditambahkan 750 μ l dapar isolasi. Dapar isolasi terdiri dari dapar lisis (Tris-HCl pH 7.5 0.2 M, EDTA 0.05 M, NaCl 2 M, dan CTAB 2%), dapar ekstraksi (sorbitol 0.35 M, Tris-HCl pH 7.5 0.1 M, 5 mM EDTA) dan 5% sarkosil. Selanjutnya reaksi diinkubasi pada suhu 65°C selama 1 jam. Kemudian ke dalam tube ditambahkan 750 μ l *chloroform:isoamylalkohol* (24:1) dan disentrifugasi selama 5 menit pada kecepatan 8.000 rpm pada suhu 4°C. Supernatan dipindahkan ke tabung baru dan ditambah dengan 400 μ l isopropanol dingin, lalu disentrifugasi selama 6 menit dengan kecepatan 8.000 rpm pada suhu 4°C. Supernatan dibuang dan pelet dicuci dengan 70% etanol. Pelet dalam tabung dikeringkan dan dilarutkan dengan 50 μ l dapar TE pH 8.0.

Primer yang digunakan ialah *gusA* forward 5'-TCACCGAAGTTC-ATGCCA GTCC-3' dan reverse 5'-ACGCTCACACCGATAACCATCAG-3' yang spesifik untuk gen penanda *gusA*, dan *hpt* forward 5'-GATGCCTCCG-CTCGAAGTAGCG-3' dan reverse 5'-GCATCTCCCGCCGTGCAC-3' untuk gen *hpt*. Volume untuk 1x reaksi PCR ialah 20 μ l dengan komposisi sebagai berikut: 1x dapar PCR, 0.05 mM dNTP, 0.05 U Taq polymerase, 0,2 μ M masing-masing primer (*gusA reverse* dan *forward* dan *hpt reverse* dan *forward*)

Tabel 1. Perbedaan dalam tiga teknik transformasi yang digunakan

Perbedaan	Metode A	Metode B	Metode C
Konsentrasi sel OD ₆₀₀	0,5 - 1	0,1	0,3
Umur benih	masak	masak	belum masak
Material tanaman	kalus embriogenik	benih	embrio belum masak
Pra inkubasi	Tidak	Ya	Tidak
Persiapan kalus	Ya	Tidak	Tidak
Waktu infeksi	15 menit	1,5 menit	Ditetes langsung
Bakteri disertakan saat kokultivasi	Tidak	Ya	Ya
Waktu kokultivasi	3 hari	3 hari	1 minggu
Waktu seleksi I	2 minggu	2 minggu,	1 minggu
Waktu seleksi II	2 minggu	2 minggu	3 minggu
Pra regenerasi	Tidak	Ya, suhu 25°C	Ya, suhu 30°C

dan 100 ng DNA hasil isolasi sebagai cetakan. Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan alat PCR Thermal Cycler (Biometra), pada kondisi PCR sebagai berikut satu siklus denaturasi (95°C, 3 menit); 30 siklus amplifikasi [denaturasi 95°C 1 menit, *annealing* 55°C 1 menit, sintesis 72°C 1 menit]; 72°C 10 menit (pemanjangan final); 4°C (penyimpanan). Hasil PCR dipisahkan dengan alat elektroforesis menggunakan 1% gel agarose selama 45 menit pada tegangan 100 volt. Gel diwarnai menggunakan ethidium bromida (0,5 mg/liter) untuk visualisasi pita DNA produk PCR. Produk amplifikasi yang diharapkan muncul masing-masing berukuran 500 pb (pasang basa) untuk gen *gusA* dan 400 pb untuk *hpt*.

Analisis integrasi *Ac* dari plasmid pNU400 adalah berdasarkan pendaran *gfp* yang diperoleh. Transforman kalus atau plantlet yang mengandung *Ac* akan ditunjukkan oleh pendaran warna hijau dari kalus atau tanaman tersebut ketika diamati di bawah UV.

Analisis *Southern blot* bertujuan untuk mengetahui pola integrasi gen sisipan dan jumlah salinan gen transposon *Ds* dengan menggunakan DNA pelacak *hpt* pada generasi tanaman pertama (*T0*). Metode deteksi dengan PCR maupun *Southern blot*, memerlukan DNA genom sebagai DNA cetakan yang dianalisis. DNA tanaman diisolasi dengan metoda CTAB. Selanjutnya DNA genom dipotong menggunakan enzim restriksi *ApaI* semalam. Setelah dipisahkan dalam agarose gel 0,8%, blotting dilakukan dengan metoda alkali transfer ke membran nilon bermuatan positif. Analisis pola integrasi T-DNA dilakukan dengan hibridisasi *Southern* mengacu kepada protokol kit dari GE Healthcare (Amersham, UK). Hibridisasi *Southern* dilakukan terhadap tanaman-tanaman hasil transformasi dengan pUR224 dengan menggunakan fragmen gen *hpt* sebagai pelacak.

HASIL

Perbandingan Metode Transformasi

Hasil transformasi dengan metode A (Hiei *et al.* 1994) tidak menghasilkan plantlet transgenik untuk kedua plasmid yang digunakan (pUR224 dan pNU400). Meskipun transformasi pUR224 telah dilakukan terhadap 900 kalus Batutegi dan 700 kalus Kasalath. Dengan plasmid pNU400 transformasi dilakukan terhadap 780 kalus Batutegi dan 540 kalus Kasalath. Dengan metode B (Toki *et al.* 2006), keberhasilan untuk mendapatkan tanaman transgenik hanya diperoleh dari kultivar kasalath dengan plasmid pUR224. Efisiensi transformasinya sebesar 2,36% dan efisiensi regenerasi sebesar 27,27%. Dengan menggunakan plasmid pNU400 tidak diperoleh kalus ataupun tanaman transgenik yang berpendar sebagai ciri terekspresinya gen penanda *gfp* (Tabel 2.).

Hasil transformasi menggunakan metode C (Hiei dan Komari, 2006) untuk cv. Batutegi dan Kasalath menunjukkan bahwa metode ini lebih baik dibandingkan metode A dan B. Hasil transformasi cv. Batutegi dan Kasalath dengan plasmid pNU400 disajikan pada Tabel 3.

Dengan menggunakan plasmid pUR224 diperoleh satu *event* transformasi pada cv kasalath dan dua *event* pada cv. Batutegi (Tabel 4 dan Gambar 2).

Analisis Integrasi Gen dengan PCR

Analisis PCR dengan menggunakan primer spesifik untuk gen *hpt* dan *gusA* dilakukan terhadap masing-masing 25 tanaman cv. Batutegi dan 17 tanaman cv. Kasalath. Tanaman-tanaman tersebut merupakan hasil transformasi dari plasmid pUR224. Hasil analisis dibedakan antara tanaman yang mengandung *hpt* dan *gusA*, mengandung *hpt* tapi tidak mengandung *gusA*, mengandung *gusA* tetapi tidak mengandung *hpt*, dan tanaman yang tidak mengandung *gusA* maupun *hpt* (Tabel 5 dan Gambar 3).

Analisis Integrasi Gen dengan Southern blot

Material tanaman yang digunakan ialah yang mengandung gen *hpt* dan *gusA* berdasarkan analisis PCR. Jumlah tanaman diuji masing-masing sebanyak 12 untuk cv. Batutegi dan 9 untuk Kasalath. Hasil analisis disajikan dalam Tabel 6 dan Gambar 4.

Tabel 2. Transformasi menggunakan metode B (Toki *et al.* 2006)

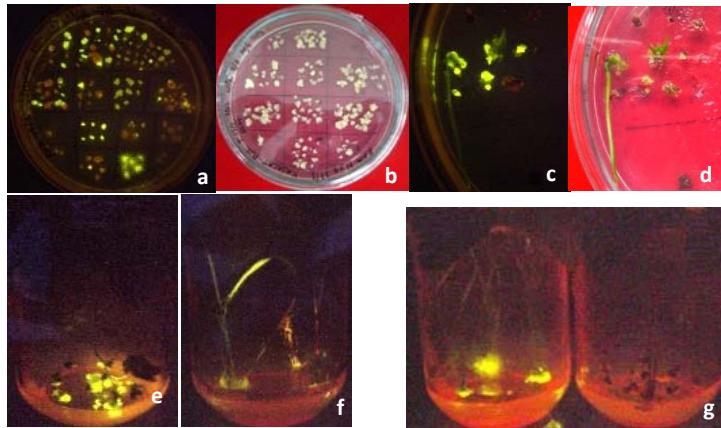
Kultivar	Plasmid	Jumlah benih	Kalus tahan hpt	Kalus regenerasi	Efisiensi transformasi (%)	Efisiensi Regenerasi (%)
Kasalath	pUR224	465	11	3	2.36	27.27

Tabel 3. Transformasi menggunakan metode C (Hiei dan Komari, 2006) dengan plasmid pNU400

Kultivar	Plasmid	Jumlah immature	Kalus GFP+	Kalus GFP + proliferasi	Kalus regenerasi	Efi.transf (%)	Efi. Reg (%)
Kasalath	pNU400	20	15	15	10	75.00	66.67
B. Tegi	pNU400	60	22	6	19	36.67	86.36

Tabel 4. Transformasi menggunakan metode C (Hiei dan Komari, 2006) dengan plasmid pUR224

Kultivar	Plasmid	Jumlah immature	Kalus tahan hpt	Kalus regenerasi	Efi.transf (%)	Efi. Reg (%)
Kasalath	pUR224	86	22	11	25.58	50.00
B. Tegi	pUR224	62	8	6	12.90	75.00
	pUR224	101	2	2	1.98	100.00



Gambar 2. Ekspresi gen penanda *gfp* dari kalus dan tanaman transforman plasmid pNU400 pada cv. Kasalath dan Batutege

Keterangan:

- a dan b kalus cv. Kasalath diamati pada *dark reader* (a) dan lampu neon (b)
- c dan d kalus cv. Batutege diamati pada *dark reader* (c) dan lampu neon (d)
- e dan f plantlet Kasalath dan Batutege, g Plantlet Kasalath GFP + (kiri) dan GFP- (kanan)

PEMBAHASAN

Padi tipe indica banyak dibudidayakan di Asia termasuk Indonesia, namun keberhasilan transformasi genetiknya masih terbatas. Kegiatan transformasi padi indica cv. Kasalath sangat sulit dilakukan terlebih pada cv. Batutege. Diduga bahwa kultivar indica yang digunakan dalam percobaan digolongkan dalam indica grup I, yang sebagian besar merupakan kultivar rekalsitran untuk kegiatan kultur jaringan dan transformasi genetik (Zhang *et al.* 1998; Wunn *et al.* 1996). Pada padi indica sering dijumpai

bahwa kondisi transformasi dan regenerasi yang optimum untuk suatu genotipe, menjadi tidak optimum untuk genotipe lainnya.

Untuk mendapatkan sejumlah kalus tahan higromisin dari hasil transformasi menggunakan plasmid pUR224 diperlukan jumlah eksplan yang sangat banyak. Selain itu, meskipun transformasi dilakukan sangat intensif, namun keberhasilannya masih sangat rendah dibandingkan menggunakan padi japonica (cv. Niponbare) yang pernah dilakukan sebelumnya (Nugroho *dkk.* 2007). Kondisi yang sama juga terjadi pada hasil

Tabel 5. Hasil analisis integrasi gen *hpt* dan *gusA* pada cv. Batutegi dan Kasalath

Kultivar	J. Tan. diuji	Jumlah Tanaman		
		Hpt +/Gus+	Hpt +/Gus-	Hpt -/Gus-
Batutegi	25	19	4	0
Kasalath	17	9	6	0
Total	Total	28	10	0
Total tan.	Total tan.	42		



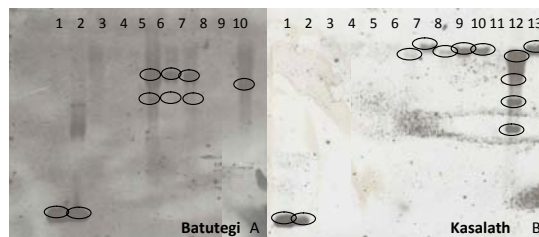
Gambar 3. Hasil analisis PCR menggunakan primer *hpt* dan *gusA* pada padi cv. Batutegi dan kasalath

Keterangan:

- λ hind III; 1. plasmid pUR224; 2. pCambia 1301; 3. K+ pUR224 (cv Nipponbare);
- 4. K- Nipponbare ; 5. K- Batutegi ; 6. K- Kasalath; 7. air ; 8 - 23 cv. Transforman Batutegi;
- 24 – 35 transforman Kasalath

Tabel 6. Hasil analisis Southern blot cv. Batutegi dan Kasalath menggunakan DNA pelacak *hpt*

No	Kode	Lajur	Jumlah salinan	
			cv. Batutegi	cv. Kasalath
1	K1 no. 8	6	2	
2	K1 no. 9	7	2	
3	K1 no. 10	8	2	
4	K2 no. 16	11	1	
5	K3 no. 3	Tidak ditampilkan	2	
6	K2 no. 2-a	7		1
7	K2 no. 2-b	8		1
8	K2 no. 5	9		1
9	K4 no. 1	10		1
10	K5 no. 2	11		1
11	K7 no. 4	13		4
12	K8 no. 2	14		1



Gambar 4. Contoh hasil analisis Southern pada cv. Batutegi (A) dan Kasalath (B) dengan DNA pelacak *hpt*.

Keterangan: Kolom 1 dan 2: kontrol plasmid pUR224

transformasi menggunakan plasmid pNU400 yang membawa transposon *Ac* dengan gen penanda *gfp*.

Berdasarkan hasil penelitian metode transformasi A yang paling tidak sesuai untuk kedua kultivar. Hasil ini bertolak belakang dengan percobaan sebelumnya pada padi japonica (cv. Nipponbare) dengan menggunakan kedua plasmid yang sama (pUR224 dan pNU400). Jumlah tanaman transgenik yang diperoleh lebih dari 1500 dari pUR224 dengan nilai efisiensi transformasi 95,6% (Nugroho *dkk.* 2007). Meskipun metode B (Toki *et al.* 2006) dapat digunakan untuk merakit tanaman transgenik dengan waktu lebih cepat pada padi tipe japonica tetapi pada tipe indica aplikasinya sangat sulit. Berdasarkan hasil penelitian, metode transformasi C (Hiei & Komari 2006) adalah yang terbaik untuk kedua kultivar tersebut.

Tingkat kesulitan yang paling dominan ialah terjadinya pencoklatan jaringan setelah dilakukan infeksi dengan *agrobacterium*, diduga ada pengaruh negatif penggunaan antibiotik sehingga dapat meracuni kalus seperti pada penelitian sebelumnya (Khanna & Raina. 1999). Pada metoda A dan B juga dialami kesulitan terbentuknya kalus embriogenik. Sering pula dihadapi bahwa meskipun kalus bersifat embriogenik tetapi kemampuan kalus untuk membentuk plantlet sangat rendah.

Meskipun keberhasilan yang diperoleh dalam penelitian ini masih relatif kecil, tapi membuktikan bahwa cv. Batutegi padi gogo asal Indonesia dapat ditransformasi. Adanya respon dalam kegiatan transformasi pada cv. Batutegi

telah membuka peluang dapat digunakan sebagai model untuk kegiatan pembentukan populasi mutan dari jenis indica, atau untuk tujuan perbaikan genetik melalui rekayasa.

Analisis PCR dilakukan untuk melihat keberhasilan integrasi gen sisipan dalam genom tanaman. Analisis ini hanya dilakukan terhadap tanaman hasil transformasi menggunakan plasmid pUR224. Analisis dilakukan dengan menggunakan dua pasang primer spesifik masing-masing untuk gen penyeleksi *hpt* dan gen penanda *gusA*. Kedua gen ini berada dalam daerah T-DNA yang sama dengan transposon *Ds*. Analisis PCR menunjukkan keberadaan gen-gen tersebut, sehingga dapat dipastikan bahwa transposon *Ds* telah terintegrasi dalam genom tanaman generasi pertama ini (*T0*).

Berdasarkan data hasil analisis PCR diperoleh bahwa dari 25 tanaman cv Batutegi, 19 tanaman diantaranya menunjukkan keberadaan pita yang berukuran 500 pb (*gusA*) dan 400 pb (*hpt*). Sedangkan pada cv. Kasalath dari 17 tanaman yang diuji, 9 tanaman menunjukkan adanya kedua pita hasil amplifikasi. Diperoleh pula informasi bahwa tidak ada satupun tanaman yang hanya mengandung pita amplifikasi *gusA* saja. Analisis integrasi dengan PCR dan Southern blot hanya dilakukan untuk tanaman hasil transformasi dengan plasmid pUR224, sementara integrasi gen *gfp* yang membawa transposon *Ac* dilakukan berdasarkan ekspresi gen tersebut yang diamati pada alat *uv dark reader*.

Analisis Southern blot selain bertujuan untuk mengetahui integrasi gen sisipan juga untuk melihat pola integrasinya dalam genom. Hasil analisis Southern blot pada cv. Batutegi menunjukkan bahwa K1 no. 8, K1 no. 9, K1 no. 10 adalah merupakan galur yang sama (*sister line*) dengan 2 salinan gen sisipan. Tanaman-tanaman tersebut berasal dari embrio yang sama saat transformasi. Diduga tanaman-tanaman tersebut berasal dari satu sel yang kemudian berploriferasi membentuk tanaman sendiri-sendiri. Galur K2 no. 16 dan K3 no. 3 masing-masing memiliki 1 dan 2 gen sisipan. Dengan demikian pada cv Batutegi diperoleh 3 galur tanaman yang berbeda. Pada cv Kasalath diperoleh 7 galur yang berbeda yaitu K2 no. 2-a, K2 no. 2-b, K2 no. 5, K4 no. 1, K5 no. 2, K7 no. 4, K8 no. 2. Meskipun tanaman K2 no. 2-b dan K2 no. 5 berasal dari embrio yang sama saat transformasi tetapi diduga mereka berkembang dari sel berbeda. Ketiadaan pita dari hasil hibridisasi Southern pada beberapa galur yang diuji diduga karena kualitas DNA yang kurang baik, meskipun galur-galur tersebut menunjukkan keberadaan pita gen *hpt* saat PCR.

KESIMPULAN

Metode transformasi C (Hiei dan Komari 2006) adalah yang terbaik untuk cv. Batutegi dan Kasalath.

Diperoleh 19 tanaman cv Batutegi dan 9 tanaman cv. Kasalath yang menunjukkan keberadaan gen *gusA* dan *hpt* berdasarkan analisis PCR.

Integrasi gen *gfp* yang membawa transposon *Ac* dibuktikan berdasarkan ekspresi gen tersebut yang berpendar.

Hasil Southern blot menunjukkan terdapat 3 galur tanaman berbeda pada cv Batutegi dan 7 galur pada Kasalath.

Keberhasilan penelitian ini membuktikan bahwa kultivar Batutegi yang merupakan padi gogo asal Indonesia dapat ditransformasi.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Dr. Narayanan Upadhyaya and Dr Satya Nugroho atas perkenannya menggunakan plasmid dalam penelitian ini. Terima kasih kepada Dr Satya Nugroho dan Dr Ami Estiati atas bantuan penyediaan bahan kimia, diskusi dan sarannya. Terimakasih pula disampaikan untuk Nurhayati dan Oktri Yurika atas bantuannya di laboratorium.

DAFTAR PUSTAKA

- Bray, EA., J. Bailey-Serres, & E. Weretilniyk. 2000. Response to abiotic stresses. *In*: Eds. Gruissem W, Buchannan B, Jones R Biochemistry and molecular Biology of Plants. *American Society of Plant Physiologists*, Rockville. Pp 1158-1249.
- Buell, CR. 2002. Current status of the sequence of the rice genome and prospects for finishing the first monocot genome. *Plant physiol.* 4:1585-1586.
- Deng, X., J. Philips, AH. Meijer, F. Salamini, & D. Bartels. 2002.

- Characterization of five novel dehydration responsive homeodomain leucine zipper genes from resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Mol. Bio.*49:601-610.
- Dong, J., W. Teng, W.G. Buchhold, & T.C. Hall. 1996. *Agrobacterium* mediated transformation of Javanica rice. *Mol. Breed.* 2:267-276.
- Greco, R., P.B. Ouwkerk, A.J. Taal, C.Sallaud, E.Guiderdoni, A.H. Meijer, & J.H.Hoge. 2004. Transcription and somatic transposition of maize En/Spm transposons system in rice. *Mol.Gen. Genomics.* 270: 514-523.
- Hiei, Y., S. Ohta, T. Komari, & T. Kumashiro. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 6(0): 001-011.
- Hiei, Y., & T. Komari. 2006. Improved protocols for transformation of Indica rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* .85(3): 271-283.
- Hu H., M. Dai, J. Yao, B. Xiao, X. Li, Q. Zhang, & L. Xiong. 2006. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *PNAS.* 103(35): 12987-12992.
- Izawa. T., C. Miyazaki, M. Yamamoto, R. Terada, S. Lida, & K. Shimamoto. 1991. Introduction and transposition of maize transposable element Ac in rice (*Oryza sativa* L). *Mol Gen Genet.* 227:391-396.
- Khanna, H.K., SK. Raina. 1999. *Agrobacterium*-mediated transformation of indica rice cultivars using binary and super binary vectors. *Aust. J. Plant Physiol.* 26: 311-324.
- Khanna, H.K. & SK. Raina. 2002. Elite indica transgenic rice plants expressing modified cryIAC endotoxin of *Bacillus thuringiensis* show enhanced resistance to yellow stem borer (*Scirpophaga incertulas*). *Transgenic Res.* 11:411-423.
- Kolesnik, T., I. Szeverenyi, D. Bachmann, C.S.Kumar, S.Jiang, R.Ramamoorthy. M. Cai, Z.G.Ma, V. Sudaresan, & S.Ramachandran. 2004. Establishing an efficient Ac/Ds tagging system in rice: large scale analysis of Ds flanking sequences. *Plant J.* 37:301-314
- Kumar, K.K., S. Maruthasalam, M. Loganathan, D. Sudhakar, & P. Balasubramanian. 2005. An improved *Agrobacterium*-mediated transformation protocol for recalcitrant elite indica rice cultivars. *PMB* 23:67-73.
- Lin, Y.J., & Q. Zhang. 2005. Optimising the tissue culture conditions for high efficiency transformation of Indica rice. *Plant Cell Rep.* 23:540-547.
- Meijer, A.H., R.J. De Kam, I. d'Erfurth, W. Shen, & J.H.C. Hoge. 2000. HD-Zip protein of family I and II

- from rice: interaction and functional properties. *Mol Gen Genet.* 236: 12-21.
- Nayak, P., D. Basu, S. Das, A. Basu, D. Ghosh, NA. Ramakrishnan, M. Ghosh, & KS. Soumitra. 1997. Transgenic elite indica rice plant expressing *cry IAc* δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* are resistant against yellow stem borer (*Scirpophaga incertulas*). *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 94:211-216.
- Nugroho, S., ES. Mulyaningsih, D. Astuti, & CF. Pantouw. 2007. Upaya Pengembangan Populasi padi mutan dengan mutasi insersi transposon Ac/Ds pembawa gene trap untuk pencarian gen-gen penting dari padi. Prosiding Simposium, Seminar dan Kongres IX PERAGI 2007. Bandung, 15-17 November 2007. hal 105-110.
- Rashid, H., S. Yokoi, K. Toriyama, & K. Hinata. 1996. Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in Indica rice. *Plant Cell Rep.* 15:727-730.
- Scarpella, E., EJ. Simons, & AH. Meijer. 2005. Multiple regulatory elements contribute to the vascular-specific expression of the rice HD-Zip gene *oshox1* in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 46(8), 1400-1410.
- Slamet-Loedin, IH., W. Rahayu, S. Hutajulu, & J. Wibowo. (1997). Penggunaan dua strain *Agrobacterium tumefaciens* supervirulen untuk ko-kultivasi tanaman padi kultivar Cisadane dan Rojolele. Prosiding Seminar Perhimpunan Bioteknologi Indonesia. Surabaya, 12-14 Maret 1997. hal 140-148.
- Toki, S., N. Hara, K. Ono, H. Onodera, A. Tagiri, S. Oka, & H. Tanaka. 2006. Early infection of scutellum tissue with *agrobacterium* allows high-speed transformation of rice. *Plant J.* 47:969-976.
- Wünn, J., A. Kloti, PK. Burkhardt, GCG. Biswass, K. Launis, VA. Iglesias, & I. Potrykus. 1996. Transgenic Indica rice breeding line IR-58 expressing a synthetic *cryIAb* gene from *Bacillus thuringiensis* provides effective insect pest control. *Bio.Technol.* 14:171-176.
- Xiao, B., Y. Huang, N. Tang, & L. Xiong. 2007. Over-expression of LEA gene in rice improves drought resistance under the field conditions. *Theor. Appl. Genet.* DOI 10.1007/s00122-007-0538-9.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., & K. Shinozaki. 2001. Improving plant drought, salt and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor, in: Rice biotechnology: Improving yield, stress tolerance and grain quality – No. 236. (Novartis Foundation Symposium), Wiley, Chichester, 176-189.
- Zhang, S., W. Song, L. Chen, D. Ruan, N. Taylor, P. Ronald, R. Beachy, & C. Fauquet. 1998. Transgenic elite indica varieties, resistant to *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. *Mol. Breed.* 4: 551-558.

Perbandingan Tiga Metode Transformasi *Agrobacterium*

Memasukkan: Agustus 2009

Diterima: Mei 2010