

Analisis Molekuler Tanaman Padi Transgenik cv. Rajalele yang Mengandung gen *chiI*

Molecular Analysis of Transgenic Rice cv. Rajalele Containing chiI gene

ENUNG SRI MULYANINGSIH^{1*}, AGUS PURWITO², INEZ H. SLAMET-LOEDIN¹

¹Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Jalan Raya Bogor Km. 46, Cibinong 16911

²Jurusan Budi Daya Pertanian, Faperta, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor 16680

Diterima 18 Maret 2002/Disetujui 11 Desember 2002

This research showed that Indonesian indigenous rice cultivar Rajalele was successfully transformed with a rice-origin chitinase gene *chiI*. The *chiI* gene cassette flanked with CaMV 35s promoter and terminated by nos terminator. The construct gene was introduced into embryogenic calli employing *Agrobacterium tumefaciens* transformation system. The integration of recombinant DNA into the rice genome was analysed using three methods, i.e., polymerase chain reaction (PCR), GUS assay and chitinase assay. Results of the GUS assay showed that 100% of the transformed calli expressed *gusA* on three day-old calli after co-cultivation. This percentage of expression decreased to 20-40% on older calli i.e. 15 day-old calli after co-cultivation. In the plantlet stage, 0.2% (2 plantlets) and 0.4% (4 plantlets) of the transformed calli derived plantlets gave positive to GUS expression after the X-gluc assay for pESMI-88A and pESMI-88B, respectively. These percentages were unchanged until plant maturity. PCR analysis, using primers specific for *chiI* gene showed independent lines of transformants had *chiI* gene sequences in their genomes. Chitinase assay of mature plants showed that 5 of 25 transgenic plants showed chitinase activities higher than the control plants.

PENDAHULUAN

Meskipun produksi pangan dunia telah meningkat dua kali lipat sejak dimulai revolusi hijau, namun masih banyak tantangan yang harus dihadapi untuk memenuhi kebutuhan pangan pokok. Guna dapat memenuhi kebutuhan pangan tersebut, maka diperkirakan produksi pangan harus ditingkatkan sekitar 60% pada 25 tahun mendatang (Tyagi & Mohanty 2000). Indonesia berhasil mencapai swasembada pangan pada tahun 1984, tetapi saat ini merupakan negara pengimpor beras. Salah satu penyebab keadaan tersebut ialah terjadi konversi lahan pertanian dan tidak memungkinkan perluasan lahan sawah.

Upaya peningkatan produksi padi dapat dilakukan melalui pemanfaatan lahan marginal dengan cara menanam padi huma yang selama ini belum banyak mendapat perhatian. Produktivitas padi huma hanya berkisar 1 ton/ha (Evenson *et al.* 1996) dan peningkatan produksinya relatif rendah dibandingkan padi sawah. Rendah atau stagnansi produktivitasnya ini antara lain disebabkan oleh kemampuan genetika suatu varietas dalam menghadapi cekaman biotik dan abiotik di lapangan. Rendahnya produktivitas padi ladang, umumnya disebabkan oleh serangan penyakit oleh cendawan.

Penyakit utama padi yang disebabkan oleh cendawan di antaranya ialah hawar pelepah daun oleh *Rhizoctonia solani* dan blas oleh *Magnaporthe grisea* sin: *Pyricularia oryzae*. Keduanya masih sulit diatasi sehingga dapat menurunkan

produksi padi dunia setiap tahun (Lin *et al.* 1995, Chao *et al.* 1999). Gen ketahanan terhadap penyakit sering kali tidak terdapat secara alami pada padi dan kerabatnya. Jikapun ada, ekspresi gen yang muncul sering kali tidak cukup untuk melindungi tanaman dari serangan patogen tersebut. Masalah lain yang sering kali sulit diatasi ialah beberapa patogen tertentu mempunyai galur yang banyak. Usaha untuk mendapatkan tanaman yang memiliki ketahanan terhadap penyakit tertentu cukup sulit diperoleh jika hanya melalui persilangan biasa. Transformasi genetika dengan gen asing merupakan cara alternatif untuk memperoleh tanaman yang memiliki sifat yang diinginkan.

Transformasi genetika dengan *Agrobacterium tumefaciens* merupakan cara transformasi tidak langsung. Keuntungan transformasi dengan *A. tumefaciens* antara lain ialah secara teknis pengulangan percobaan memberikan hasil serupa, relatif lebih murah, jumlah salinan gen sedikit, kemungkinan terjadi perubahan susunan DNA kecil karena gen asing terlindungi oleh pembatas T-DNA, dan tanaman transgenik bersifat fertil (Hiei *et al.* 1997).

Tanaman yang terinfeksi patogen sering kali mensintesis sejumlah protein tertentu. Protein ini berperan sebagai penolak terhadap aktivitas patogen (Velazhahan *et al.* 1998). Jenis protein terinduksi tersebut antara lain ialah kitinase dan β -1,3 glukukanase, suatu enzim yang mampu menghidrolisis kitin dan β -1,3 glukukan (Patil *et al.* 2000). Kitinase umum terdapat pada tanaman dan berperan dalam pertahanan terhadap cendawan. Aktivasinya terjadi pada substrat yang mengandung N-asetil glukosamina (kitin), yang merupakan penyusun utama dinding

* Penulis untuk korespondensi, Tel. +62-21-8754587,
Fax. +62-21-8754588, E-mail: enungf@yahoo.com

sel cendawan. Bagian hifa cendawan merupakan target awal hidrolisis kitinase. Secara alamiah ekspresi gen kitinase sering kali belum cukup untuk melindungi tanaman dari serangan cendawan. Peningkatan ekspresi gen kitinase padi dapat diupayakan dengan menggunakan promotor konstitutif *cauliflower mosaic virus* (CaMV) 35s seperti yang pernah dilakukan sebelumnya (Lin *et al.* 1995, Nishizawa *et al.* 1999). Penelitian ini bertujuan menganalisis galur-galur independen padi kultivar Rajalele yang ditransformasi dengan gen *chil* menggunakan *A. tumefaciens*.

BAHAN DAN METODE

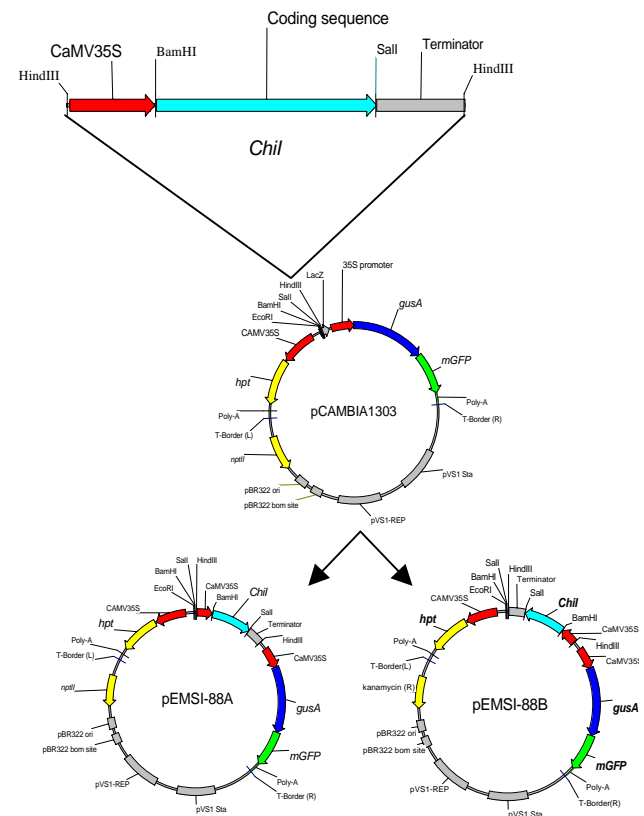
Bahan. Bahan yang diperlukan untuk uji GUS ialah kalus dan daun (daun planlet dan daun tanaman dewasa) padi cv. Rajalele (Javanica) yang telah ditransformasi dengan plasmid rekombinan pESMI-88A dan pESMI-88B (Gambar 1) hasil penelitian sebelumnya (Mulyaningsih *et al.* 2001). DNA tanaman diamplifikasi dengan primer spesifik kitinase, yaitu *chil forward* 5'-TCGCTCTTCGACCAGATGCT-3' dan *reverse* 5'-AAT CCAGGTTATCGCCATAG-3' (Huang *et al.* 1991), primer *gos-5 forward* 5'-CGACCT CGAGGACATC GGCAACACC-3' dan *reverse* 5'-GCCGAGCAGCAGGAA CTTGAGCAGG -3' (Meyer *et al.* 1991). Daun tanaman padi pada fase vegetatif digunakan untuk aktivitas kitinase.

Uji GUS. Uji ekspresi transgen dilakukan dengan uji GUS. Uji ini dilakukan pada tahap dini setelah kokultivasi, saat sel belum membelah (ekspresi *transient*) atau setelah terbentuk planlet (ekspresi stabil). Uji GUS bersifat sensitif, dengan substrat berbeda, hasilnya dapat bersifat kuantitatif dan kualitatif. Substrat 4-MUG bersifat kuantitatif (berdasarkan tingkat ekspresi) sedangkan jika substrat X-gluc yang digunakan hanya bersifat kualitatif (terekspresi hanya pada jaringan tertentu) dengan gen reporter (*gusA*) yang sama. Uji GUS terhadap kalus, planlet, dan tanaman dilakukan mengacu pada metode Rueb dan Hensgens (1989) yang dimodifikasi. Setelah kokultivasi 3 dan 15 hari, kemudian masing-masing 10 kalus diambil secara acak. Kalus direndam dalam bufer fosfat pH 6.8 (KH_2PO_4 0.1 mM) yang mengandung triton X-100 1%, diinkubasi pada 37°C selama 1 jam, kemudian dicuci dengan bufer fosfat 2 kali lalu direndam dalam larutan X-gluc (X-gluc 2.0 mM, bufer fosfat 0.2 M, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0.5 mM, Na_2EDTA 10 mM) dan divakum selama 10 menit, lalu diinkubasi semalam pada suhu 37°C. Keesokan harinya larutan X-gluc diganti dengan alkohol 70%. Pengujian pada daun dilakukan pada semua nomor plantlet atau tanaman dengan metode yang sama seperti pada kalus, tetapi menggunakan larutan X-gluc 0.1 mM dan metanol 20%. Pengujian GUS akan menghasilkan warna biru jika sel atau jaringan mengandung transgen *gusA* yang diekspresikan.

Uji PCR. Integrasi transgen ke dalam genom tanaman dianalisis dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan primer spesifik gen *chil* dan gen internal padi *gos-5*. Uji PCR dilakukan terhadap 12 galur independen transgenik yang ditransformasi dengan pESMI-88A, 20 galur pESMI-88B dan tanaman kontrol. Isolasi DNA tanaman menggunakan metode CTAB (Ausubel *et al.* 1994) yang telah

dimodifikasi sebagai berikut. Daun sebanyak 0.5 g digerus dengan nitrogen cair dan dicampur dengan 7 ml bufer S (Tris-HCL 110 mM pH 8.0, EDTA 55 mM pH 8.0, NaCl 1.54 M, CTAB 1.1%) yang telah dipanaskan pada 65°C di dalam tabung sentrifuse 50 ml. Selanjutnya 7 ml SDS 20% dicampurkan ke dalam larutan tersebut. Inkubasi dilakukan selama 1 jam pada 65°C dan setiap 15 menit dihomogenkan. Ke dalam larutan tersebut ditambahkan 7 ml kloroform lalu tabung berisi larutan disimpan di atas rotator selama 15 menit dalam suhu ruang sehingga membentuk emulsi. Larutan disentrifugasi selama 15 menit pada 4 024 x g. Fase bagian atas (*aqueous*) dipindahkan ke dalam tabung baru kemudian isopropanol ditambahkan sebanyak 0.6 kali volume, lalu tabung dibolak-balikkan hingga presipitasi DNA terjadi. Campuran kemudian disentrifugasi selama 20 menit pada 1 006 x g. Supernatan dibuang, endapan dilarutkan dengan bufer Tris EDTA (TE) pH 8.0. Untuk mendegradasi RNA, ke dalam larutan DNA ditambahkan RNaseA 4-10 mg/ml (SIGMA) dan DNA disimpan pada -20°C.

Volume untuk 1x reaksi PCR adalah 10 µl yang terdiri atas 100 ng DNA, 1x bufer PCR, 0.05 mM dNTP, 0.5 U enzim taq polimerase, 0.285 pmol primer *gos-5 reverse* dan 0.369 pmol *forward*, 0.389 pmol primer *chil reverse* dan 0.387 pmol *forward* serta dH_2O . Kontrol negatif menggunakan DNA tanaman kontrol dan air sedangkan kontrol positif menggunakan plasmid rekombinan pESMI-88A yang mengandung *chil* dan fragmen gen *chil*. Kondisi PCR yang



Gambar 1. Kaset gen *chil* disisipkan pada situs *HindIII* dari pCambia1303 (Mulyaningsih *et al.* 2001).

digunakan ialah satu siklus denaturasi awal (pra PCR) (95°C, 1 menit); 35 siklus amplifikasi (denaturasi 95°C, 1 menit; *annealing* 52°C, 1 menit; sintesis 72°C, 1 menit); dan penyimpanan (4°C, ∞). Hasil PCR dielektroforesis pada agarose gel 1.2% dengan 0.5 x bufer TBE (basa tris 0.54 g/l, asam borat 0.275 g/l, EDTA 0.05 M, pH 8.0), 70 volt selama 90 menit. Hasil elektroforesis diamati dan difoto dalam alat transiluminator Gel Doc UV.

Uji Aktivitas Kitinase. Pengujian dilakukan terhadap semua galur tanaman. Uji aktivitas kitinase dilakukan menggunakan protein total (Hirano *et al.* 1992). Konsentrasi protein diukur dengan metode Bradford (1976) dengan menggunakan *bovine serum albumin* (BSA, Biorad) sebagai standar. Pengukuran aktivitas enzim kitinase dilakukan berdasarkan metode Imoto dan Yashigita (1971) dengan koloidal kitin sebagai substrat dan N-asetil glukosamina (GlcNAc) sebagai standar. Satu unit enzim didefinisikan sebagai µmol GlcNAc yang dibebaskan per menit pada kondisi analisis yang dilakukan. Pengukuran aktivitas kitinase dilakukan melalui 2 tahap reaksi (Tabel 1). Reaksi I diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C, kemudian disentrifugasi selama 4 menit pada 11 180 x g dan supernatan digunakan untuk reaksi II. Reaksi II dididihkan selama 10 menit kemudian gula pereduksi yang terbentuk diukur pada λ 420 nm.

HASIL

Uji GUS. Hasil uji GUS kalus, plantlet dan tanaman dewasa disajikan pada Tabel 2. Pada 3 hari setelah kokultivasi (hsk), semua kalus yang ditransformasi dengan pESMI-88A dan pESMI-88B mengekspresikan gen *gusA*, tetapi persentasi tersebut menurun saat kalus berumur 15 hsk. Penurunan

ekspresi GUS pada tingkat kalus ini terjadi pula pada hasil penelitian Hiei *et al.* (1994). Dari transforman plantlet hanya 0.2% (pESMI-88A) dan 0.4% (pESMI-88B) yang positif mengekspresikan GUS. Hasil ini tidak berubah sampai tanaman dewasa. Tanaman dewasa yang mengekspresikan GUS diperoleh dari plantlet yang juga mengekspresikan GUS (Gambar 2).

Uji PCR. Hasil amplifikasi PCR dengan primer spesifik menghasilkan pita DNA berukuran 679 pasang basa (pb) dan 231 pb masing-masing untuk gen *chiI* dan *gos-5* (Gambar 3). Pengujian PCR menunjukkan bahwa ke 12 galur independen tanaman transgenik hasil transformasi dengan vektor pESMI-88A mengandung gen *chiI* dan gen internal padi *gos-5*. Sedangkan dari 20 galur independen tanaman yang ditransformasi vektor pESMI-88B yang diuji menghasilkan 19 galur mengandung fragmen gen *gos-5* dan 17 di antaranya mengandung *chiI*.

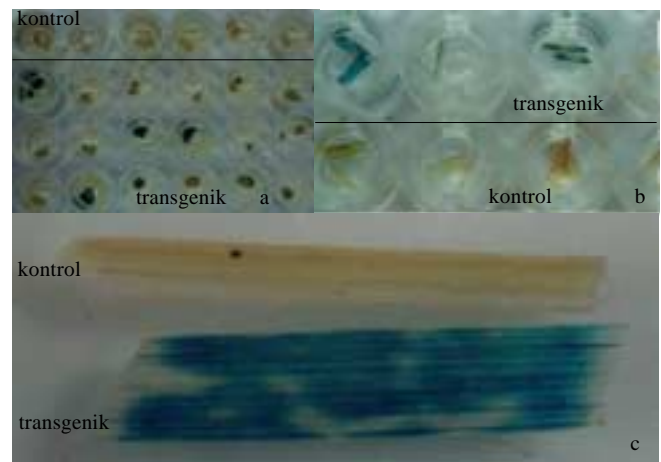
Tabel 2. Hasil uji GUS kalus, plantlet dan tanaman dewasa

Parameter	Jumlah kalus/tanaman yang ditransformasi dengan	
	Vektor pESMI-88A	Vektor pESMI-88B
Jumlah kalus positif GUS (3 hsk)*	100%	100%
Jumlah kalus positif GUS (15 hsk)*	20%	40%
Plantlet independen positif GUS**	0.2%	0.4%
Tanaman dewasa independen positif GUS**	0.2%	0.4%

*Uji menggunakan 10 kalus yang diambil secara acak, **Uji menggunakan semua plantlet/tanaman, hari setelah kokultivasi (hsk)

Tabel 1. Bahan dan Reaksi yang digunakan pada uji aktivitas kitinase

Reaksi	Bahan	Sampel (ul)	Kontrol (ul)
I	Substrat (0.3% koloidal kitin)	300	300
	Bufer fosfat (pH 7.0, 50 mM)	150	150
	Enzim kitinase dari ekstrak tanaman	150	-
II	Supernatan dari reaksi I	500	350
	Enzim kitinase dari ekstrak tanaman	-	150
	dH ₂ O	500	500
	Pereaksi Schales (K ₃ Fe(CN) ₆) 1.99 mM dalam Na ₂ CO ₃ 0.5 M)	1000	1000



Gambar 2. a. Ekspresi gen *gus-A* pada kalus, b. Daun dari plantlet, c. Daun dari tanaman dewasa.



Gambar 3. Hasil amplifikasi dengan PCR terhadap gen *chiI* dan *gos-5*. M = λ marker, A = air, B = kontrol tanaman negatif, C = fragmen *chiI*, D = plasmid rekombinan, 1-24 = sampel tanaman pESMI-88B, 25-36 = sampel tanaman pESMI-88A.

Uji Aktivitas Kitinase. Uji aktivitas kitinase menunjukkan ada 5 galur tanaman yang mempunyai aktivitas lebih tinggi dari tanaman kontrol (Tabel 3).

PEMBAHASAN

Uji GUS. Gen penanda *gusA* yang menyandikan enzim β -glukoronidase akan menguraikan substrat X-gluc (5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-glukoronida) sehingga membentuk senyawa antara melalui reaksi dimerisasi oksidatif membentuk senyawa dikloro-dibromoindigo (ClBr-indigo) yang berwarna biru (Stomp 1992). Berdasarkan hasil uji GUS terhadap 2 DNA rekombinan (pESMI-88A dan pESMI-88B) yang digunakan diduga perbedaan orientasi tidak berpengaruh terhadap jumlah planlet atau tanaman yang mengekspresikan GUS. Jumlah plantlet dan tanaman dewasa yang mengekspresikan GUS pada penelitian ini rendah, diduga karena beberapa hal antara lain gen GUS atau bagian dari gen tersebut hilang dan terjadi fenomena *gene silencing* (Hiei *et al.* 1997). Dalam penelitian ini tidak dilakukan analisis integrasi gen penanda *gusA* dengan PCR dan hanya dilakukan uji ekspresinya. Uji molekuler hanya dilakukan pada gen target *chiI*.

UJI PCR. Hasil PCR dari semua galur tanaman hasil transformasi menunjukkan bahwa beberapa tanaman hanya mengandung gen *gos-5* atau hanya *chiI*, tetapi ada pula yang membawa keduanya. Galur tanaman yang tidak mengandung gen *chiI* dan hanya mengandung gen *gos-5* merupakan galur bukan transgenik. Beberapa tanaman hasil transformasi dan tanaman kontrol hanya menunjukkan pita gen *gos-5* yang berukuran 231 pb. Sebaliknya, galur tanaman transgenik mengandung gen *chiI* sesuai dengan sekuen gen yang diintroduksi. Analisis PCR dengan primer spesifik untuk gen *chiI* pada galur transgenik menghasilkan pita DNA berukuran 679 pb. Berdasarkan hal tersebut diperoleh 12 dan 17 galur independen tanaman transgenik dari perlakuan pESMI-88A dan pESMI-88B. Uji GUS pada tingkat tanaman dewasa menunjukkan bahwa hanya 4 galur tanaman dari total 29 galur tanaman transgenik mengekspresikan gen *gus*. Hal ini dapat disebabkan antara lain gen *gus* tidak terekspresi

atau gen *chiI* dan *gus* terintegrasi pada lokus berbeda. Peluang terjadi kemungkinan yang kedua lebih kecil dibandingkan dengan kemungkinan kesatu karena kedua gen berada pada konstruksi plasmid yang sama sehingga kemungkinan gen *gusA* tidak terekspresi lebih besar. Berkaitan dengan hal ini tingkat ekspresi gen yang diintroduksi juga bersifat spesifik baik secara kualitas maupun kuantitas. Dengan kata lain galur tanaman yang diperoleh tersebut mengandung berbagai ekspresi yang berbeda dari transgen yang sama (Block 1993).

Uji Aktivitas Enzim Kitinase. Uji aktivitas enzim kitinase bertujuan melihat produk gen *chiI* pada tanaman transgenik dan membandingkannya terhadap kontrol. Pengujian ini berdasarkan reaksi reduksi-oksidasi yang menghasilkan perubahan warna sebagai parameter, dengan koloidal kitin sebagai substrat (Imoto & Yashigita 1971). Proses dialisis dilakukan untuk mendapatkan protein murni dan bebas dari molekul-molekul kecil sehingga menekan terjadi hasil semu negatif. Selain itu pada saat pengukuran aktivitas dibuat perlakuan kontrol sebagai faktor koreksi. Faktor koreksi yang dimaksud ialah tidak mereaksikan protein (enzim kitinase) dengan substrat (reaksi kontrol).

Berdasarkan uji aktivitas enzim kitinase, beberapa tanaman transgenik mempunyai aktivitas kitinase yang tinggi, berkisar dari 1.5 hingga 17 kali tanaman kontrol. Aktivitas kitinase pada tanaman kontrol (0.0165 U/mg) diperoleh dari kitinase endogen pada padi. Tanaman yang mempunyai aktivitas kitinase tinggi merupakan tanaman berpotensi tahan terhadap cendawan patogen. Galur transgenik yang mempunyai aktivitas kitinase tinggi akan diuji ketahanannya terhadap penyakit hawar pelepah daun dan blas yang disebabkan oleh *R. solani* dan *M. grisea*.

Perbedaan orientasi kaset gen *chiI* di dalam vektor tidak berpengaruh terhadap ekspresi gen penanda *gusA*. Dari 29 galur transgenik yang mengandung gen *chiI*, ada 5 galur yang mengespresikan aktivitas enzim kitinase lebih tinggi dibandingkan tanaman kontrol.

DAFTAR PUSTAKA

- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (ed). 1994. Preparation of genomic DNA from plant tissue. Di dalam: *Current Protocols in Molecular Biology*. Canada: Wiley. hlm 2.3.3-2.3.7.
- Block MD. 1993. The cell biology of plant transformation: current state, problems, prospects and the implications for the plant breeding. *Euphytica* 71:1-14.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of the protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Chao CT, Moldenhauer KAK, Ellingboe AH. 1999. Genetic analysis of resistance/susceptibility in individual F3 families of rice against strain of *Magnaporthe grisea* containing different avirulence gene. *Euphytica* 109:183-190.
- Evenson RE, Dey MM, Hossain M. 1996. Rice research priorities: an application. Di dalam: Evenson RE, Herdt RW, Hossain M (ed). *Rice Research in Asia: Progress and Priorities*. Philippines: International Rice Research Institute. hlm 347-392.
- Hiei Y, Komari T, Kubo T. 1997. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol Biol* 35:205-218.
- Hiei Y, Otha S, Komari T, Kumashiro T. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J* 6:271-282.

Tabel 3. Aktivitas spesifik enzim kitinase pada padi cv. Rajalele transgenik dan kontrol

Galur	Aktivitas spesifik (U/mg protein)	Galur	Aktivitas spesifik (U/mg protein)	Galur	Aktivitas spesifik (U/mg protein)
pESMI-88A		pESM-88B		pESMI-88B	
1	0.089*	1	0.009	16	0.011
2	0.017	2	0.001	17	0.006
3	0.024*	3	0.011	19	0.011
4	0.016	5	0.012	20	0.316*
5	0.005	7	0.002	21	0.007
6	0.017	8	0.006	22	0.011
7	0.033*	9	0.033*	24	0.009
9	0.009	11	0.010	25	0.007
11	0.010	12	0.005		
12	0.016	13	0.019		
13	0.017	14	0.015		
14	0.005	15	0.005		
Kontrol					
K11	0.018				
K14	0.015				

*Aktivitas kitinase lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol

- Hirano H, Inui, Kosake H. 1992. Induction of chitinase in rice callus derivatives and with microbial cell walls. Di dalam: Charles JB, Paul AS, Zikakis JP (ed). *Advances in chitin and chitosan*. New York: Elsevier Applied Science. hlm 397-407.
- Huang JK, Wen L, Swegle M, Tran H, Thin TH, Naylor HM, Muthukrishnan S, Reek GR. 1991. Nucleotide sequence of rice genomic clone that encodes a class I endochitinase. *Plant Mol Biol* 16:479-480.
- Imoto T, Yashigita K. 1971. A simple activity measurement of lysozyme. *Agric Bio Chem* 35:1154-1156.
- Lin W, Anuratha CS, Datta K, Potrykus I, Muthukrishnan S, Datta SK. 1995. Genetic engineering of rice for resistance to sheath blight. *Biotechno* 13:686-691.
- Meyer A, Zondag GB, Hengens LAM. 1991. A simple screening method for transgenic rice tissue based on PCR. *J Rice Gen* 8:161-165.
- Mulyaningsih ES, Rahman F, Purwito A, Slamet-Loedin IH. 2001. Construction and transformation of binary vectors containing chitinase gene controlled by CaMV 35s promoter into *Oryza sativa* cv. Rajalele using Agrobacterium mediated transformation method. Di dalam: *Proceeding Seminar Advancing Biotechnology in the 21 st Century*. Indonesian Biotechnology Conference II. Yogyakarta, 24-26 Okt 2001. hlm 641-649.
- Nishizawa Y, Nishio Z, Nakazano K, Soma M, Nakajima E, Ugaki M, Hibi T. 1999. Enhanced resistance to blast (*Magnaporthe grisea*) in transgenic Japonica rice by constitutive expression of rice chitinase. *Theor Appl Genet* 99:383-390.
- Patil RS, Ghormade V, Despande MV. 2000. Chitinolytic on enzyme: an exploration enzyme and microbial technology. *Enzyme and Microb Tech* 26:473-483.
- Rueb S, Hengens LAM. 1989. Improved histochemical staining for β -D-glucuronidase activity in monocotyledonous plants. *Rice Genet* 6:168-169.
- Stomp AM. 1992. Histochemical localization of β -glucuronidase. Di dalam: Gallagher SR (ed). *Gus Protocols: Using the gus Gene as a Reporter of Gene Expression*. London: Academic Pr. hlm 103-113.
- Tyagi AK, Mohanty A. 2000. Rice transformation for crop improvement and functional genomics [Review]. *Plant Sci* 158:1-18.
- Velazhahan R, Chen-Cole K, Anuratha CS, Muthukrishnan S. 1998. Induction of thautomatin like protein (TLPs) in *Rhizoctonia solani* infected rice and characterization of two new cDNA clones. *Physiol Plant* 102: 21-28.