

Introduksi Gen *cryIB-cryIAa* ke dalam Genom Padi (*Oryza sativa*) cv. Rojolele Menggunakan Transformasi *Agrobacterium*

Introduction of cryIB-cryIAa Hybrid Gene Into Rice (Oryza sativa) Genom cv. Rojolele using Agrobacterium-Mediated Transformation

SYAMSIDAH RAHMAWATI*, INEZ HORTENSE SLAMET-LOEDIN

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

Diterima 4 April 2005/Disetujui 14 Desember 2005

Rojolele is one of Indonesian local variety from Javanica group that susceptible to yellow stem borer (*Scirpophaga incertulas*). Previous study showed that Rojolele can be cultured and regenerated *in vitro*. Two *cry* genes, *cryIB-cryIAa* were fused and introduced into rice cv. Rojolele in an attempt to improve resistance and to obtain durable resistance rice against the yellow stem borer. Two-week old embryogenic calli of Rojolele rice were inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* harbored with binary vector pCAMBIA 1301, 1303, or 1304 carrying *cryIB-cryIAa* hybrid gene, hygromycin resistant gene (*hpt*), and β -glucuronidase (*gus*) gene interrupted with an intron. The transformed calli were selected gradually on medium containing hygromycin (50, 100 mg/l) and regenerated on medium containing 0.5 mg/l IAA and 0.3 mg/l BAP. GUS activity in infected calli was detected by histochemical assay 3 days after inoculation. The highest (100%) transformation efficiency were obtained from calli transformed with pCAMBIA 1303 and 1304. Thirty four out of 77 transformed shoots were tested positive for the *cryIB-cryIAa* gene using PCR analysis. These shoots were grown in the soil to maturity and to collect the seeds. PCR analysis of the T₁ progeny revealed that two out of six lines tested showed a Mendelian segregation pattern. These two lines were also potentially resistant to yellow stem borer based on bioassay *in planta*.

Key words: *cryIB-cryIAa* hybrid gene, yellow stem borer

PENDAHULUAN

Penggerek batang kuning (*Scirpophaga incertulas*) tergolong serangga Ordo Lepidoptera, Famili Pyralidae, yang merupakan salah satu hama utama tanaman padi sawah yang menyebabkan kehilangan padi rata-rata 13%/tahun (BPS 1996). Hama ini menyerang fase vegetatif dan generatif dengan gejala yang dikenal sebagai sundep dan beluk. Hama penggerek batang sulit diberantas dengan pestisida, karena larva yang baru menetas segera masuk ke dalam batang dan berkembang hingga menjadi pupa. Salah satu pendekatan alternatif untuk mengatasi hama penggerek batang kuning adalah dengan membuat tanaman yang mempunyai kemampuan internal menghasilkan toksin bagi larva kupu-kupu penggerek batang. Namun, pembuatan padi unggul tahan penggerek batang melalui persilangan tanaman mengalami hambatan, hal tersebut karena belum ditemukannya sumber gen ketahanan pada tanaman padi dan kerabat liarnya (Wunn *et al.* 1996).

Introduksi gen *cry*, umumnya *cryIAb* dan *cryIAc*, yang diperoleh dari bakteri tanah *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) telah berhasil dilakukan pada berbagai kultivar tanaman padi. Introduksi tersebut dilakukan umumnya pada kelompok Japonica dan Indica. Tanaman padi transgenik yang mengekspresikan toksin *Bt* tersebut dilaporkan efektif mengendalikan penggerek batang kuning (Wunn *et al.* 1996; Nayak *et al.* 1997; Datta *et al.* 1998; Wang *et al.* 2002).

Seperti halnya varietas unggul tahan hama hasil persilangan konvensional, maka tanaman transgenik diharapkan dapat efektif mengendalikan hama penggerek batang dalam jangka waktu lama atau tidak mudah patah ketahanannya. Cohen (2000) ahli entomologi dari IRRI menganjurkan penggunaan tanaman transgenik poligenik untuk menghambat munculnya serangga resisten baru. Tanaman poligenik adalah tanaman yang mengekspresikan dua atau lebih toksin dalam tanaman. Kedua toksin tersebut terekspresi dengan dosis tinggi, bekerja secara sinergis, dan tidak terjadi resistensi silang (*cross resistance*). Resistensi silang dapat terjadi bila kedua toksin memiliki situs pengikatan yang sama, sehingga mutasi pada situs pengikatan mengakibatkan larva tahan terhadap kedua toksin tersebut.

Penelitian ini dilaksanakan dengan mengintroduksi fusi dua gen *cryIB-cryIAa* sintetik ke dalam genom kultivar padi lokal Rojolele menggunakan transformasi *Agrobacterium*. Padi kultivar Rojolele yang tergolong dalam kelompok Javanica, merupakan kultivar padi lokal Indonesia yang sudah dapat diregenerasikan menggunakan teknik kultur jaringan dan sudah berhasil ditransformasi dengan gen *cryIAb* menggunakan teknik penembakan DNA (Slamet-Loedin *et al.* 1998). Gen *cryIB* dan *cryIAa* merupakan dua gen yang mempunyai situs pengikatan yang berbeda dalam usus bagian tengah larva dari kupu-kupu penggerek batang padi (Breitler *et al.* 2000). Kemungkinan mutasi dua gen lebih kecil dibandingkan dengan satu gen, sehingga diharapkan dapat

*Penulis untuk korespondensi, Tel. +62-21-8754587 Pes 109, Fax. +62-21-8754588, E-mail: syamsidah_rahmawati@yahoo.com

memperlambat munculnya hama dengan resisten baru. Selanjutnya Breitler *et al.* (2000) melaporkan bahwa kedua gen ini sangat efektif mengendalikan larva kupu-kupu penggerek batang bergaris (*Chilo suppressalis*) yang merupakan hama utama di daerah beriklim sedang. Namun, belum ada laporan mengenai efektifitas toksin CryIB maupun CryIAa terhadap penggerek batang kuning. Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan tanaman padi lokal Rojolele transgenik yang mengandung fusi dua gen *cryIB-cryIAa* tahan terhadap penggerek batang kuning. Selain itu, tanaman yang mengandung fusi dua gen *cry* ini diharapkan dapat bermanfaat dalam jangka yang lama atau tidak mudah patah ketahanannya.

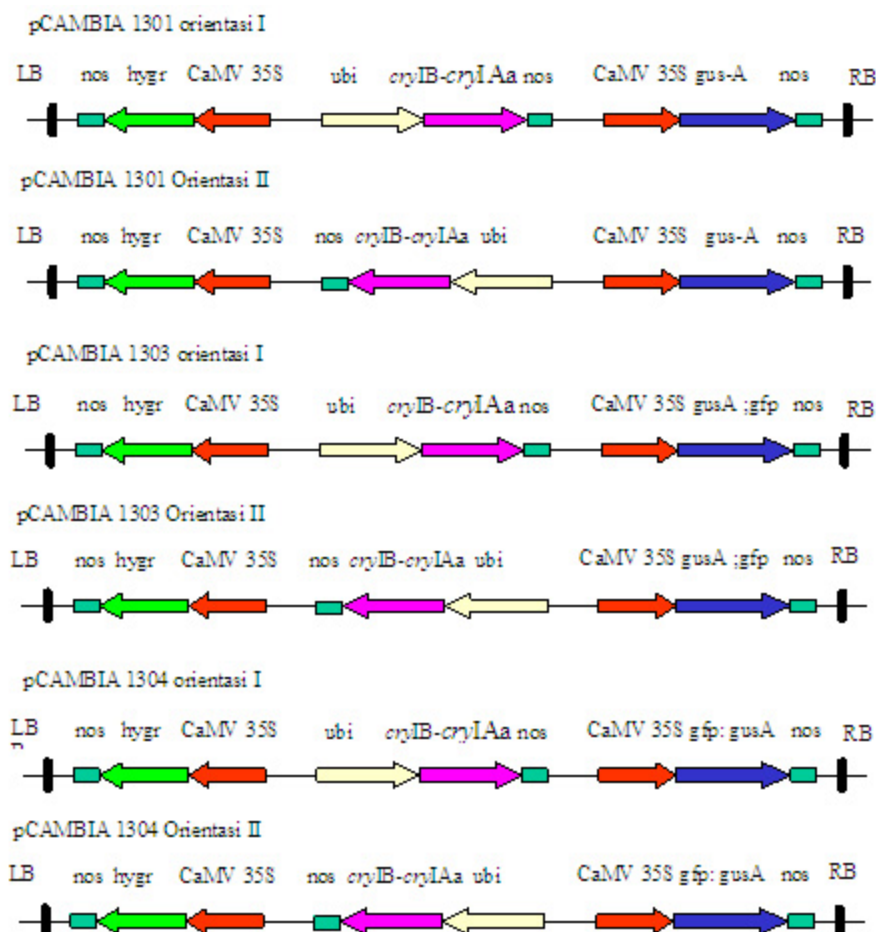
BAHAN DAN METODE

Bahan Tanaman dan Induksi Kalus Embriogenik. Benih padi kultivar Rojolele diperoleh dari Balai Penelitian Padi Muara, Bogor. Benih direndam dalam benlate 3% (b/v) selama 10 menit, alkohol 70% (v/v) selama satu menit, dan bayclin 70% (v/v) selama 20-30 menit sambil digoyang. Selanjutnya benih dicuci dengan akuades steril sebanyak 4-5 kali dan ditanam pada media induksi kalus 3 (IK3) yang terdiri dari media dasar Murashige and Skoog (MS) yang diperkaya dengan 2,4-D 2.5 mg/l pada kondisi gelap.

Setelah satu minggu diisolasi kalus yang muncul dari bagian embrio benih dipindahkan ke media IK3 baru, dan ditumbuhkan selama dua minggu pada kondisi gelap. Empat hari sebelum infeksi, kalus dipotong menjadi ukuran yang lebih kecil (± 2 mm) dan dipindahkan pada media IK3 baru.

Plasmid dan Strain *Agrobacterium*. Hibrid Gen *cryIB-cryIAa* diperoleh dari Dr. E. Guiderdoni, CIRAD-France. Gen *cryIB-cryIAa* yang dikendalikan oleh promoter *constitutive* ubiquitin dipotong dari plasmid pBKS ubi *cryIB-cryIAa* dengan enzim restriksi *HindIII* dan disisipkan ke dalam plasmid biner pCAMBIA yang telah dipotong dengan *HindIII* untuk menghasilkan plasmid biner pCAMBIA 1301, 1303, dan 1304 ubi *cryIB-cryIAa*. Bagian T-DNA vektor biner pCAMBIA 1301, 1303, dan 1304 ubi *cryIB-cryIAa* masing-masing terdiri dari dua orientasi penyisipan (Gambar 1). Ketiga plasmid ini mengandung gen penyeleksi hygromycin phosphotransferase II (*hpt*) dan gen pelapor β -glucuronidase (*gus*) yang disisipi oleh intron dalam T-DNANYA. Namun, plasmid pCAMBIA 1303 dan 1304 mengandung gen penanda lain, yaitu gen *gfp* (*green fluorescent protein* dari ubur-ubur) yang disambung dengan gen *gus* dengan orientasi yang berbeda.

Satu koloni *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA 105 yang mengandung pCAMBIA 1301, 1303, atau 1304 ubi *cryIB-*



Gambar 1. Konstruksi plasmid pCAMBIA 1301, 1303, dan 1304 ubi *cryIB-cryIAa* masing-masing dengan dua orientasi. Orientasi I; arah ekspresi gen dari kiri ke kanan. Orientasi II; arah ekspresi gen dari kanan ke kiri.

cryIAa ditumbuhkan pada media LB padat mengandung rifampisin 20 mg/l dan kanamisin 50 mg/l selama tiga hari (28 °C). Selanjutnya, bakteri disuspensikan dalam media Asam Amino (AAM) cair yang telah dimodifikasi (Hiei *et al.* 1994) mengandung asetosiringon 100 µM. Suspensi bakteri ditumbuhkan pada suhu 28 °C (200 rpm) hingga mencapai OD₆₀₀ 0.4-0.5.

Kokultivasi. Kalus embriogenik yang berukuran ± 2 mm direndam dalam suspensi *Agrobacterium* selama 25 menit, dan divakum selama lima menit. Selanjutnya, kalus di keringkan di atas lapisan kertas tisu steril dan ditumbuhkan pada media IK3 mengandung asetosiringon 100 µM, selama tiga hari pada kondisi gelap. Setelah tiga hari kokultivasi, kalus dicuci dengan akuades steril mengandung cefotaksim 600 mg/l sebanyak 5-6 kali untuk membunuh bakteri.

Seleksi Kalus Tahan Hygromisin dan Regenerasi Tanaman. Kalus hasil kokultivasi yang telah dicuci selanjutnya ditumbuhkan pada media seleksi I, yaitu media IK3 mengandung klaforan 250 mg/l dan higromisin 50 mg/l. Dua minggu kemudian kalus dipindahkan ke media seleksi II, yaitu media IK3 mengandung klaforan 250 mg/l dan higromisin 100 mg/l dan ditumbuhkan pada kondisi gelap selama dua minggu.

Kalus tahan higromisin kemudian dipindahkan ke media regenerasi MS mengandung IAA 0.5 mg/l dan BAP 0.3 mg/l untuk merangsang tunas muncul. Tanaman yang beregenerasi dipindahkan ke media MS bebas hormon untuk merangsang perakaran. Planlet yang dihasilkan kemudian dipindahkan ke dalam pot berisi tanah steril di rumah kaca khusus (*biosafety containment*).

Uji GUS. Uji GUS pada kalus (tiga hari setelah kokultivasi) dan pada daun planlet dilakukan mengikuti prosedur Jefferson (1987). Sampel diinkubasi semalam (37 °C) dan dicuci dengan etanol 70% sebelum diamati menggunakan mikroskop.

Isolasi dan Amplifikasi DNA. Total DNA diisolasi dari daun tanaman yang tidak ditransformasi (kontrol) dan daun tanaman transgenik *putative*. Sekitar 10 cm daun muda dimasukkan ke dalam tabung 1.5 ml, dibekukan dengan nitrogen cair, digerus hingga menjadi bubuk, dan ditambah dengan 750 µl bufer isolasi yang mengandung bufer lisis [Tris-HCl 0.2 M pH 7.5, EDTA 0.05 M, NaCl 2 M, setiltrimetilamonium bromida (CTAB) 2% (b/v)], bufer ekstraksi [sorbitol 0.35 M, Tris-HCl 0.1 M pH 7.5, EDTA 5 mM], dan sarkosil 5% (b/v) dengan perbandingan 2.5:2.5:1. Contoh diinkubasi selama 1 jam pada suhu 65 °C sambil dikocok perlahan, setelah itu ditambah 750 µl kloroform:isoamil alkohol (24:1) dan dikocok. Kemudian contoh disentrifugasi 13 000 g (Sorval MC12C rotor F-12/M.18) selama 5 menit pada suhu ruang. Lapisan atas diambil dan dipindahkan ke tabung 1.5 ml yang baru. Kemudian ditambahkan 400 µl isopropanol dan dikocok sebelum disentrifugasi (13 000 g) selama 6 menit pada suhu ruang. Supernatan dibuang, pelet dicuci dengan 500 µl etanol 70% dan disentrifugasi (13 000 g selama 3 menit). Supernatan dibuang dan pelet dikeringkan. DNA dilarutkan dalam 50 µl

bufer TE [Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM] dan disimpan pada -20 °C hingga digunakan.

Amplifikasi PCR dilakukan dengan total reaksi 25 µl [bufer PCR 1x, dNTPs 0.05 mM, primer *reverse* dan *forward* masing-masing 2.5 ng/µl, *taq* polymerase 0.05 U/µl, 40 ng sampel DNA, dan H₂O]. Fragmen (785 pb) dari gen *cryIB-cryIAa* diamplifikasi menggunakan satu pasang primer (*forward*) 5'-GCCCAAGAAGCTGTCAACGC-3' dan (*reverse*) 5'-CGATGTCGAGAACTGTGAGG-3'. Sebagai kontrol internal untuk mengecek keseluruhan proses (integritas dari isolasi DNA dan PCR) digunakan satu pasang primer lain untuk mendeteksi gen internal (*gos5*) dari tanaman padi. Kondisi PCR yang digunakan adalah 95 °C (3') 1 siklus; 95 °C (1'), 60 °C (1'), 72 °C (1') 40 siklus; dan 72 °C (10') 1 siklus. DNA hasil PCR dipisahkan pada gel agarose 1% (b/v).

Uji Ketahanan terhadap Penggerek Batang Kuning.

Tanaman transgenik generasi pertama dan kontrol diinfestasi dengan larva penggerek batang kuning yang baru menetas (*neonate*), masing-masing satu larva untuk tiap anakan. Jumlah anakan padi yang diinfestasi adalah sepuluh anakan untuk tiap rumpun. Anakan yang diinfestasi adalah anakan hasil pemangkasan (*ratoon*), pada fase vegetatif dengan jumlah daun 4-5. Tanaman atau anakan yang tidak diinfestasi terlebih dahulu dibuang, sehingga setiap rumpun hanya ada sepuluh anakan. Pengamatan terhadap jumlah anakan yang terserang sundep dilakukan dua dan empat minggu setelah infestasi. Persentase sundep untuk masing-masing galur dihitung menggunakan formula sebagai berikut;

$$\text{Serangan sundep} = \frac{\text{Jumlah sundep pada galur yang diamati}}{\text{Jumlah anakan dari galur yang sama}} \times 100\%$$

Persentase sundep tersebut dikonversikan ke dalam nilai D sebagai berikut;

$$D = \frac{\% \text{ sundep dari galur yang diuji}}{\% \text{ sundep dari varietas pembanding rentan}} \times 100\%$$

Nilai D ditransformasikan ke dalam skala 0-9 (0 = 0%, 1 = 1-20%, 3 = 21-40%, 5 = 41-60%, 7 = 61-80%, 9 = 81-100%). Nilai untuk ketahanan terhadap sundep (*deadhearts*) berdasarkan Standard Evaluation System (IRRI 1996) adalah sebagai berikut; 0 = tidak ada gejala, 1 = 1-10%, 3 = 11-20%, 5 = 21-30%, 7 = 31-60%, dan 9 = > 60% menunjukkan gejala sundep.

Analisis Pola Segregasi Gen *cryIB-cryIAa*. Tanaman transgenik dipelihara di rumah kaca khusus. Tanaman dibiarkan menyerbuk sendiri dan benih dipanen secara terpisah. Analisis pola segregasi gen dilakukan pada benih dari enam galur (Rj1 01 F1.1 11.1, 01 F2.2 9.1, 01 F2.2 10.2, 03 F1.1 4.1, 04 F1.1 2.1, dan 04 F2.2 2.4) terpilih, yaitu yang berasal dari tetua (T₀) positif PCR *cryIB-cryIAa* dan tahan penggerek. Benih tersebut ditanam dan dipilih 30 tanaman secara acak untuk selanjutnya dilakukan isolasi DNA. Amplifikasi DNA menggunakan primer spesifik untuk gen *cryIB-cryIAa*. Data hasil amplifikasi DNA dianalisis menggunakan uji khi-kuadrat untuk menentukan pola segregasi gen *cryIB-cryIAa*.

HASIL

Transformasi dan Regenerasi. Pada penelitian ini transformasi dilakukan secara terpisah untuk masing-masing plasmid yang melibatkan 1737 kalus. Kalus embriogenik umur dua minggu yang telah diinfeksi diseleksi secara bertahap dengan menumbuhkan kalus di media yang mengandung higromisin selama empat minggu. Jumlah kalus tahan higromisin yang dihasilkan bervariasi antara 45.6-88.6%, sedangkan efisiensi regenerasi dan transformasi secara berturut-turut bervariasi antara 3.5-22.6% dan 0.5-3.9% (Tabel 1).

Uji GUS dilakukan pada kalus tiga hari setelah infeksi, sebagai konfirmasi awal keberhasilan transformasi. Ekspresi GUS yang tinggi (100%) diperoleh pada kalus yang ditransformasi dengan plasmid biner pCAMBIA 1303 dan 1304 ubi *cryIB-cryIAa* (Tabel 2). Contoh kalus berwarna biru mengekspresikan β -glucuronidase (Gambar 2). Kalus yang tidak ditransformasi (kontrol) tidak mengekspresikan warna biru.

Konfirmasi Keberadaan Gen *cryIB-cryIAa*. Keberadaan gen *cryIB-cryIAa* pada tanaman hasil transformasi dideteksi dengan amplifikasi DNA menggunakan primer yang spesifik untuk gen *cryIB-cryIAa*. Hasil PCR menunjukkan adanya pita DNA dengan ukuran yang diharapkan, yaitu 785 pb (Gambar 3). Hal ini mengindikasikan keberadaan transgen pada tanaman transgenik dan tidak ditemukan pada tanaman yang tidak ditransformasi. Berdasarkan hasil uji PCR, sebanyak 34 dari 80 tanaman (44.16%) hasil transformasi positif mengandung gen *cryIB-cryIAa*. Sisanya (55.84%) tumbuh dalam media seleksi, namun tidak mengandung gen target (*escapes*).

Uji Ketahanan Tanaman Transgenik terhadap Penggerek Batang Kuning. Tanaman T_0 yang berdasarkan hasil PCR positif mengandung gen *cryIB-cryIAa* dipilih untuk diuji ketahanannya terhadap penggerek batang kuning. Aktivitas insektisida dari fusi protein CryIB-CryIAa diuji dengan meletakkan larva yang baru menetas (*neonate*) pada daun telinga (*auricle*) dari daun termuda. Tanaman padi Rojolele yang tidak ditransformasi (kontrol) sudah mulai memperlihatkan gejala sundep, yaitu ditandai dengan layu atau matinya daun termuda (Gambar 4a), pada pengamatan tujuh hari setelah infestasi (HSI). Kerusakan sundep yang parah akibat serangan penggerek batang terlihat pada pengamatan 14 HSI dan 28 HSI (Gambar 4b). Beberapa galur tanaman transgenik potensial tahan terhadap penggerek batang kuning, yaitu dengan tidak menunjukkan gejala sundep pada semua anakan yang diamati. Dari 25 tanaman yang diuji,

tujuh tanaman (Rjl 01 F1.1 11.1, 01 F2.2 9.1, 01 F2.2 10.2, 01 F2.2 17.1, 03 F1.1 4.1, 04 F1.1 2.1, dan 04 F2.2 2.4) dikelompokkan tahan terhadap penggerek batang kuning (skala 0), yaitu dengan tidak menunjukkan adanya gejala sundep pada anakan yang diamati (Tabel 3).

Analisis Turunan Pertama (T_1). Pola segregasi ditentukan dengan melakukan uji PCR terhadap 30 tanaman dari populasi tanaman T_1 yang bersegregasi. Sebagian hasil amplifikasi gen *cryIB-cryIAa* pada populasi tanaman T_1 mengalami segregasi (Gambar 5). Hasil analisis khi-kuadrat pada 6 populasi tanaman T_1 yang berasal dari tetua positif PCR *cryIB-cryIAa* memperlihatkan bahwa dua tanaman, yaitu Rjl 04 F2.2 2.4 dan Rjl 01 F1.1 11.1, menurunkan gen target ke generasi berikutnya (T_1) mengikuti pola pewarisan Mendel (3:1) (Tabel 4). Akan tetapi, empat populasi lainnya tidak mewarisi gen target.

PEMBAHASAN

Transformasi dan Regenerasi. Pada penelitian ini efisiensi transformasi kalus embriogenik yang berasal dari skutellum padi cv. Rojolele berkisar antara 0.5-3.9%. Tidak ada perbedaan efisiensi transformasi menggunakan plasmid pCAMBIA 1301, 1303, atau 1304. Efisiensi transformasi ini masih lebih rendah dari efisiensi transformasi yang dilaporkan oleh Hiei *et al.* (1994) pada padi Japonica (93%) atau Rashid *et al.* (1996) pada padi Indica (22%).

Namun, bila dilihat dari ekspresi gen *gus* (Tabel 2) yang dideteksi tiga hari setelah kokultivasi efisiensi transformasi menggunakan plasmid pCAMBIA 1303 atau 1304 sangat tinggi, yaitu 100%. Hasil ini setara dengan hasil transformasi pada padi Japonica yang dilakukan oleh Hiei *et al.* (1994). Selanjutnya kalus yang ditransformasi dengan pCAMBIA 1303 dan 1304 ubi *cryIB-cryIAa* menghasilkan warna biru merata pada seluruh permukaan kalus.

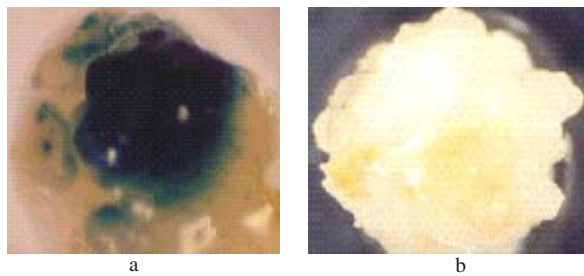
Frekuensi ekspresi transien yang tinggi tidak menjamin tingginya jumlah tanaman transgenik yang dihasilkan atau efisiensi transformasi yang stabil. Hal ini menandakan bahwa sistem transformasi ini dapat digunakan untuk memperbaiki sifat genetika padi Rojolele. Hingga saat ini keberhasilan transformasi *Agrobacterium* masih terbatas pada genotipe

Tabel 2. Hasil uji GUS pada kalus umur tiga hari setelah infeksi

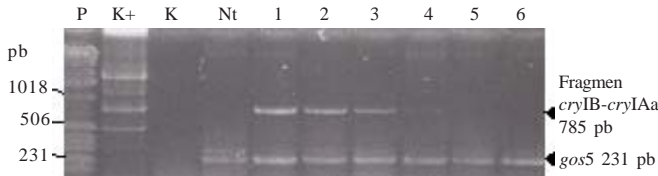
Kultivar	DNA	% kalus positif GUS
Rojolele	pCAMBIA 1301 UBI <i>cryIB-cryIAa</i>	0.25
	pCAMBIA 1303 UBI <i>cryIB-cryIAa</i>	100
	pCAMBIA 1304 UBI <i>cryIB-cryIAa</i>	100
	Kontrol	0

Tabel 1. Rangkuman data hasil transformasi dan regenerasi tanaman padi kultivar Rojolele dengan fusi dua gen *cryIB-cryIAa*

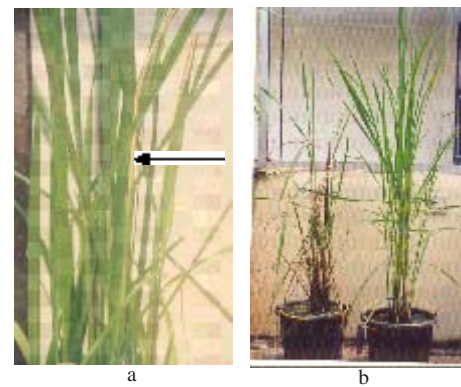
Plasmid/gen	Σ kalus yang diinfeksi	Σ kalus tahan hygromisin	% kalus tahan hygromisin	Σ planlet		Efisiensi (%)	
				Beregenerasi	+ PCR <i>cryIB-cryIAa</i>	Regenerasi	Transformasi
pC 1301 ubi- <i>cryIB-cryIAa</i> -nos Orientasi I	241	110	45.6	15	7	13.6	2.9
pC 1301 ubi- <i>cryIB-cryIAa</i> -nos Orientasi II	332	294	88.6	24	7	8.2	2.1
pC 1303 ubi- <i>cryIB-cryIAa</i> -nos Orientasi I	253	133	52.6	15	6	11.3	2.4
pC 1303 ubi- <i>cryIB-cryIAa</i> -nos Orientasi II	410	341	83.2	12	2	3.5	0.5
pC 1304 ubi- <i>cryIB-cryIAa</i> -nos Orientasi I	176	84	47.7	19	7	22.6	3.9
pC 1304 ubi- <i>cryIB-cryIAa</i> -nos Orientasi II	325	226	69.5	11	5	4.9	1.5



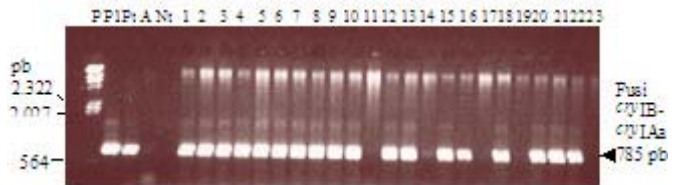
Gambar 2. Kalus (a) hasil transformasi yang mengekspresikan β -glucuronidase (biru) dan (b) yang tidak ditransformasi dengan pCAMBIA ubi *cryIB-cryIAa*.



Gambar 3. Contoh hasil amplifikasi DNA tanaman padi Rojolele generasi pertama T_0 hasil transformasi dengan gen *cryIB-cryIAa* menggunakan dua pasang primer spesifik untuk gen *cryIB-cryIAa* dan gen internal padi *gos5'*. P = Penanda DNA 1 Kb ladder, K+ = kontrol positif plasmid pCAMBIA ubi *cryIB-cryIAa*, K = kontrol reaksi air, Nt = kontrol negatif tanaman yang tidak ditransformasi, 1-6 = DNA contoh tanaman hasil transformasi dengan gen *cryIB-cryIAa*.



Gambar 4. Uji ketahanan terhadap penggerek batang. a. Tanaman menunjukkan gejala sundep (tanda panah) tujuh hari setelah infestasi, b. Tanaman yang tidak ditransformasi dan terserang sundep (kiri) dan tanaman yang mengandung gen *cryIB-cryIAa* (kanan) pada 28 HSI.



Gambar 5. Contoh hasil PCR DNA dari populasi tanaman T_1 menggunakan primer spesifik untuk fusi gen *cryIB-cryIAa*. P = Penanda λ *HindIII*INA, Pl = plasmid pCAMBIA ubi *cryIB-cryIAa*, Pt = tanaman + *cryIB-cryIAa*, A = air, Nt = tanaman tidak ditransformasi, 1-23 = sampel DNA tanaman yang diuji.

Tabel 3. Persentase sundep pada galur padi transgenik generasi pertama dan kultivar pembandingnya pada dua dan empat minggu setelah infestasi (MSI)

Galur	2 MSI			4 MSI		
	% sundep	Nilai D	Nilai ketahanan	% sundep	Nilai D	Nilai ketahanan
Rojolele	40	100	9	40	100	9
Rjl 01 F1.1 3.1	10	25	3	50	>100	9
Rjl 01 F1.1 4.1	0	0	0	20	50	5
Rjl 01 F1.1 7.1	11.1	27.8	3	11.1	27.8	3
Rjl 01 F1.1 9.1	30	75	7	50	>100	9
Rjl 01 F1.1 11.1*	0	0	0	0	0	0
Rjl 01 F2.2 7.1	20	50	5	30	75	7
Rjl 01 F2.2 8.1	10	25	3	20	50	5
Rjl 01 F2.2 9.1*	0	0	0	0	0	0
Rjl 01 F2.2 10.2*	0	0	0	0	0	0
Rjl 01 F2.2 17.1*	0	0	0	0	0	0
Rjl 03 F1.1 4.1*	0	0	0	0	0	0
Rjl 03 F1.1 5.1	0	0	0	20	50	5
Rjl 03 F1.1 7.1	30	75	7	30	75	7
Rjl 03 F1.1 8.1	30	75	7	50	>100	9
Rjl 03 F1.1 10.1	20	50	5	30	75	7
Rjl 03 F2.2 4.1	0	0	0	10	25	3
Rjl 04 F1.1 1.1	10	25	3	10	25	3
Rjl 04 F1.1 2.1*	0	0	0	0	0	0
Rjl 04 F1.1 5.2	0	0	0	10	25	3
Rjl 04 F1.1 8.1	10	25	3	30	75	7
Rjl 04 F1.1 8.2	10	25	3	30	75	7
Rjl 04 F2.2 1.1	10	25	3	20	50	5
Rjl 04 F2.2 2.4*	0	0	0	0	0	0
Rjl 04 F2.2 5.1	0	0	0	10	25	3
Rjl 04 F2.2 8.1	30	75	7	40	100	9

Nilai D = % sundep pada galur transgenik / % sundep pada Rojolele nontransgenik; Nilai ketahanan: Skala 0 = 0%, 1 = 1-20%, 3 = 21-40%, 5 = 41-60%, 7 = 61-80%, 9 = 81-100% menunjukkan gejala sundep. *Tanaman yang tahan terhadap penggerek batang kuning (skala 0)

Tabel 4. Segregasi gen *cryIB-cryIAa* pada populasi T₁

Galur	n	Nisbah harapan		Nisbah pengamatan		X ²	db = 1 a = 0.05 X ² = 3.84
		(+)	(-)	(+)	(-)		
		Rjl 01 F1.1 11.1	30	22.5	7.5		
Rjl 01 F2.2 9.1	30	22.5	7.5	0	30	90	
Rjl 01 F2.2 10.2	30	22.5	7.5	0	30	90	
Rjl 03 F1.1 4.1	30	22.5	7.5	0	30	90	
Rjl 04 f1.1 2.1	30	22.5	7.5	0	30	90	
Rjl 04 F2.2 2.4	30	22.5	7.5	20	10	1.11	3:1

tertentu dan efisiensi transformasi pada beberapa genotipe tertentu dilaporkan sangat rendah (Azhakanandam *et al.* 2000; Dai *et al.* 2001). Pada penelitian ini dan penelitian yang dilakukan oleh Humara *et al.* (1999) ditemukan tingkat kematian yang tinggi dan menurunnya kemampuan regenerasi sel pascainfeksi. Humara *et al.* (1999) menduga hal ini erat kaitannya dengan mekanisme sistem pertahanan tanaman, meskipun belum jelas dimengerti bagaimana mekanismenya. Dey *et al.* (2003) melaporkan bahwa penambahan antioksidan (L-sistein 40 mg/l, perak nitrat 5 mg/l, dan asam askorbat 15 mg/l) pada media kokultivasi dapat meningkatkan daya hidup dan kemampuan regenerasi tanaman pascainfeksi 32-42% dibandingkan dengan kontrol.

Analisis PCR Tanaman Hasil Transformasi (T₀). Hasil PCR menggunakan primer spesifik untuk gen *cryIB-cryIAa* menunjukkan bahwa tanaman transgenik positif mengandung gen target. Sebanyak 34 dari 80 (44.16%) tanaman yang di transformasi dengan gen *cryIB-cryIAa* menghasilkan pita DNA dengan ukuran 785 pb seperti yang diharapkan. Hasil ini menunjukkan bahwa tanaman positif mengandung gen *cryIB-cryIAa*. Sisanya (55.84%) tidak mengandung gen target (*escape*). Tingginya jumlah tanaman *escape* dapat disebabkan oleh sistem seleksi yang digunakan kurang efektif, penyisipan gen yang tidak sempurna, atau gen yang ditransfer tidak stabil terintegrasi di dalam genom tanaman dan hilang selama proses pembelahan sel (Saini *et al.* 2003).

Uji Ketahanan terhadap Penggerek Batang Kuning. Ekspresi gen pada tanaman transgenik dicerminkan, salah satunya, pada tingkat ketahanan padi transgenik terhadap penggerek batang. Tingkat ketahanan tanaman transgenik terhadap penggerek batang dipengaruhi oleh jumlah toksin yang dihasilkan (Nayak *et al.* 1997; Datta *et al.* 1998). Pada penelitian ini, reaksi tanaman transgenik generasi pertama (T₀) terhadap larva kupu-kupu penggerek batang kuning dirumah kaca sangat bervariasi (Tabel 3). Tujuh tanaman (Rjl 01 F1.1 11.1, 01 F2.2 9.1, 01 F2.2 10.2, 01 F2.2 17.1, 03 F1.1 4.1, 04 F1.1 2.1, dan 04 F2.2 2.4) dikelompokkan tahan (skala 0) dan sisanya moderat serta tidak tahan. Sebelumnya, Nayak *et al.* 1997, Datta *et al.* 1998, dan Wang *et al.* 2002 melaporkan bahwa kandungan protein/toksin tanaman transgenik berbeda antara satu tanaman dengan tanaman yang lain. Sehingga, meskipun analisis *Western blot* belum dilakukan, hal ini mengindikasikan bahwa ekspresi toksin CryIB-CryIAa pada tanaman transgenik yang diperoleh bervariasi.

Tanaman transgenik tahan hama diharapkan dapat bermanfaat dalam jangka lama, artinya dalam jangka lama mampu mengendalikan hama sasaran. Jangka waktu pemanfaatan tanaman transgenik sangat tergantung pada manajemen resistensi hama. Cohen (2000) mengusulkan berbagai strategi untuk menghambat munculnya serangga resisten baru. Dua diantaranya adalah; (i) penggunaan tanaman transgenik yang mengandung toksin dengan dosis tinggi dikombinasikan dengan penanaman tanaman nontransgenik (*refugia*), dan (ii) penggunaan lebih dari satu gen yang berbeda situs pengikatannya (*receptor*) dalam usus bagian tengah larva. Fusi protein CryIB-CryIAa, berdasarkan hasil penelitian ini, potensial mengendalikan larva kupu-kupu penggerek batang kuning. Sebelumnya, tanaman padi cv. Rojolele transgenik yang mengandung toksin CryIAb dan efektif mengendalikan penggerek batang kuning telah berhasil diperoleh (Slamet-Loedin & Mulyaningsih 1999). Penggunaan tanaman transgenik yang mengandung toksin yang berbeda ini diharapkan dapat mendukung program manajemen resistensi hama penggerek batang padi di Indonesia.

Analisis PCR Turunan Pertama (T₁). Stabilitas gen yang diwariskan kepada turunannya merupakan aspek yang sangat penting dalam rekayasa genetika tanaman. Umumnya gen yang ditransformasi dengan *Agrobacterium* diwariskan kegenerasi berikutnya mengikuti pola pewarisan Mendel (Hiei *et al.* 1994; Rashid *et al.* 1996).

Analisis PCR pada populasi tanaman generasi kedua dilakukan untuk mendeteksi pewarisan gen target pada keturunannya dan untuk mengetahui pola pewarisannya. Hasil analisis PCR pada populasi tanaman T₁ dari 6 galur terpilih menunjukkan bahwa tanaman Rjl 04 F2.2 2.4 dan Rjl 01 F1.1 11.1 mengikuti pola pewarisan Mendel yang memenuhi rasio 3:1 untuk gen dominan tunggal. Hal ini mengindikasikan bahwa gen target terintegrasi pada satu lokus dalam kromosom inti. Dengan demikian dimungkinkan untuk mendapatkan galur homozigot gen *cryIB-cryIAa*.

Hasil amplifikasi DNA pada empat populasi tanaman lainnya (Rjl 01 F2.2 9.1, 01 F2.2 10.2, 03 F1.1 4.1, dan 04 F1.1 2.1) menunjukkan bahwa keempatnya tidak mewarisi gen target. Meskipun hal ini jarang terjadi pada tanaman yang ditransformasi menggunakan *Agrobacterium*, kasus ini dilaporkan terjadi pada tanaman yang ditransformasi dengan penembakan DNA akibat tingginya jumlah salinan gen dan adanya proses penyusunan kembali (Spencer *et al.* 1992; Vain *et al.* 2002). Transgen dapat hilang pada generasi berikutnya akibat transgen tidak diwariskan ke sebagian atau semua progeninya. Pada kasus ini diduga gen target tidak terintegrasi dalam kromosom inti, sehingga tidak stabil diturunkan kegenerasi berikutnya. Christou *et al.* (1989) menduga tingginya jumlah serbuk sari yang steril mengakibatkan terjadinya pewarisan gen yang abnormal. Namun belum diketahui dasar biologis yang tepat yang dapat menjelaskan mengapa hal ini terjadi (Peng *et al.* 1995). Oleh karena itu penelitian lebih lanjut masih diperlukan untuk memperoleh penjelasan yang lebih akurat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh RUT IX dan APBN 2002-2003. Ucapan terima kasih disampaikan kepada E. Guiderdoni atas pemberian plasmid pBKS ubi *cryIB-cryIAa* dan Neneng Heryati atas bantuan teknis selama penelitian ini berlangsung. Satoto dan A. Rifki atas pemberian larva penggerek batang kuning.

DAFTAR PUSTAKA

- Azhakanandam K *et al.* 2000. T-DNA transfer, integration, expression and inheritance in rice: effects of plant genotype and *Agrobacterium* super-virulence. *J Plant Physiol* 157:429-439.
- [BPS] Biro Pusat Statistik. 1996. *Luas dan Intensitas Serangan Organisme Pengganggu Tanaman dan Bencana Alam Padi, Palawija, dan Sayuran di Jawa*. Jakarta: Biro Pusat Statistik.
- Breitler JC *et al.* 2000. Expression of a *Bacillus thuringiensis cryIB* synthetic gene protects Mediterranean rice against the stripped stem borer. *Plant Cell Rep* 19:1995-1202.
- Christou P, Swain WF, Yang NS, McCabe DE. 1989. Inheritance and expression of foreign genes in transgenic soybean plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:7500-7505.
- Cohen MB. 2000. Bt rice: practical steps to sustainable use. *Intl Rice Res Notes* 25:4-10.
- Dai S *et al.* 2001. Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. *Mol Breeding* 7:25-33.
- Datta K *et al.* 1998. Constitutive and tissue-specific differential expression of the *cryIA(b)* gene in transgenic rice plants conferring resistance to rice insect pest. *Theor Appl Genet* 97:20-30.
- Dey M, Jiang H, Wu R. 2003. Antinecrotic substances improved regeneration frequencies of transgenic rice. *Rice Genet Newslett* 19:82-84.
- Hiei Y, Ohta 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* 6:1-11.
- Humara JM, Lopez M, Ordas RJ. 1999. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Pinus pinea* L. cotyledons; an assessment of factors influencing the efficiency of *uidA* gene transfer. *Plant Cell Rep* 19:51-58.
- [IRRI] International Rice Research Institute. 1996. *Standard Evaluation System for Rice*. INGER-Genetic Resources Center, Intl Rice Res. Inst. Philippines.
- Jefferson RA. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene system. *Plant Mol Biol Rep* 5:387-405.
- Nayak P *et al.* 1997. Transgenic elite Indica rice plants expressing *cryIac* δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* are resistant against yellow stem borer (*Scirpophaga incertulas*). *Proc Natl Acad Sci USA* 94:211-216.
- Peng J, Wen F, Lister RL, Hodges TK. 1995. Inheritance of *gusA* and *neo* genes in transgenic rice. *Plant Mol Biol* 27:91-104.
- Rashid H, Yokoi S, Toriyama K, Hinata K. 1996. Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in Indica rice. *Plant Cell Rep* 15:727-730.
- Saini R, Jaiwal S, Jaiwal PK. 2003. Stable genetic transformation of *Vigna mungo* L. Hepper via *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep* 21:851-859.
- Slamet-Loedin IH *et al.* 1998. Production of fertile transgenic aromatic Indonesian Javanica rice co-expressing the snowdrop lectin and *CryIAb* anti-insect proteins. Di dalam: *Proceeding of the 4th Asia Pacific Conference on Agricultural Biotechnology*. Darwin, 13 Jul 1998. hlm 206-208.
- Slamet-Loedin IH, Mulyaningsih ES. 1999. Rice Biotechnology program at Research and Development Centre for Biotechnology (RDC Biotechnology): Introduction of resistance genes to Indonesian rice cultivars by genetic transformation. Di dalam: *Proceeding of a Workshop on Biotechnology Network Development*. Indonesia. Cibinong, 22-23 Apr 1999. hlm 84-92.
- Spencer TM *et al.* 1992. Segregation of transgenes in maize. *Plant Mol Biol* 18:201-210.
- Vain P, James VA, Worland B, Snape JW. 2002. Transgene behaviour across two generations in a large random population of transgenic rice plants produced by particle bombardment. *Theor Appl Genet* 105:878-889.
- Wang Z *et al.* 2002. Genetic analysis of resistance of Bt rice to stripe stem borer (*Chilo suppressalis*). *Euphytica* 123:379-386.
- Wunn J *et al.* 1996. Transgenic Indica rice breeding line IR58 expressing a synthetic *cryIA(b)* gene from *Bacillus thuringiensis* provides effective insect pest control. *Bio/Technology* 14:171-176.