

Introduksi Konstruk Over-Ekspresi Kandidat Gen *OsWRKY76* melalui *Agrobacterium tumefaciens* pada Tanaman Padi Nipponbare

Aniversari Apriana^{1*}, Atmitri Sisharmini¹, Wening Enggarini¹, Sudarsono², Nurul Khumaida², dan Kurniawan R. Trijatmiko¹

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111
Telp. (0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820; *E-mail: nanas_setyawan@yahoo.com

²Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor 16680
Telp. (0251) 8629346; Faks. (0251) 8629352

Diajukan: 19 Juli 2010; Diterima: 28 Januari 2011

ABSTRACT

Delivering of Over-Expression Construct *OsWRKY76* Candidate Gene in Rice cv. Nipponbare through *Agrobacterium tumefaciens*. Aniversari Apriana, Atmitri Sisharmini, Wening Enggarini, Sudarsono, Nurul Khumaida, and Kurniawan R. Trijatmiko. Plant genetic improvement can be done through classical breeding or genetic engineering. *WRKY* is a transcription factor involved in regulating plant defense responses. *OsWRKY76* gene is located in a narrow segment of chromosome 9 which is identified previously to be related to wide spectrum resistance in rice. A sequence of *OsWRKY76* (± 1.200 bp) has available in the gene bank and it makes possible to isolate, clone, and construct the gene into over-expression vector. The aim of this research was to assemble an over-expression construct of *OsWRKY76* candidate gene and introduce it into rice through *Agrobacterium*-mediated transformation. A construct of pCAMBIA-1301::35S::*OsWRKY76* has been successfully assembled and transformed into embryogenic calli of rice cv. Nipponbare using *A. tumefaciens* strain Agl-1 and EHA 105. A number of 126 independent lines has been produced, in which Agl-1 showed 3.8 times more efficient than EHA 105. PCR analysis of randomly selected 25 independent lines showed that all of them positively contained *hptII* gene, a selectable marker used in the over-expression construct of the *OsWRKY76* candidate gene. Based on the result, it could be concluded that the over-expression construct of *OsWRKY76* candidate gene have been successfully introduced into the tissue of Nipponbare.

Keywords: Transcription factor, *OsWRKY* gene, blast resistance, rice, Nipponbare.

ABSTRAK

Introduksi Konstruk Over-Ekspresi Kandidat Gen *OsWRKY76* melalui *Agrobacterium tumefaciens* pada Tanaman Padi Nipponbare. Aniversari Apriana, Atmitri Sisharmini, Wening Enggarini, Sudarsono, Nurul Khumaida, dan Kurniawan R. Trijatmiko. Perbaikan sifat

tanaman dapat dilakukan dengan pemuliaan tanaman konvensional atau dengan rekayasa genetik. *WRKY* merupakan protein faktor transkripsi yang terlibat dalam regulasi jalur respon pertahanan tanaman. Gen *OsWRKY76* terletak pada segmen di kromosom 9 tanaman padi yang sebelumnya diidentifikasi terkait dengan ketahanan berspektrum luas. Sekuen gen *OsWRKY76* (dengan ukuran ± 1.200 bp) telah tersedia di bank gen dan hal ini memungkinkan untuk dilakukan isolasi, kloning, dan mengkonstruksi gen tersebut ke dalam vektor over-ekspresi. Penelitian ini bertujuan untuk merakit dan mengintroduksi konstruk over-ekspresi gen *OsWRKY76* ke dalam tanaman padi Nipponbare melalui bantuan *A. tumefaciens*. Konstruk pCAMBIA-1301::35S::*OsWRKY76* telah berhasil dirakit dan telah ditransformasikan ke dalam kalus embriogenik tanaman padi cv. Nipponbare melalui bantuan *A. tumefaciens* strain Agl-1 dan EHA 105. Dari transformasi tersebut dihasilkan 126 galur independen dan strain Agl-1 menunjukkan hasil 3,8 kali lebih efisien dalam menghasilkan galur independen dibandingkan dengan strain EHA 105. Analisis PCR dari 25 galur independen yang diuji secara acak menunjukkan semua positif mengandung gen *hptII*, yaitu gen penanda ketahanan terhadap antibiotik higromisin yang digunakan pada konstruk over-ekspresi kandidat gen *OsWRKY76*. Berdasarkan hasil tersebut di atas, dapat disimpulkan bahwa konstruk over-ekspresi kandidat gen *OsWRKY76* telah berhasil diintroduksi ke dalam jaringan tanaman padi Nipponbare.

Kata kunci: Faktor transkripsi, gen *OsWRKY*, ketahanan terhadap blas, padi Nipponbare.

PENDAHULUAN

Penyakit utama tanaman padi adalah blas dan hawar daun bakteri (HDB). Penyakit blas yang disebabkan oleh cendawan *Pyricularia grisea* menyerang tanaman padi di semua bagian tanaman dan pada semua fase pertumbuhan tanaman. Penyakit blas merupakan kendala utama pada padi gogo, tetapi dewasa ini penyakit tersebut mulai meluas pada per-tanaman padi sawah (Rahamma dan Hasanuddin, 1993). Scardaci *et al.* (1997) menyatakan bahwa serangan cendawan blas pada padi dapat menurunkan

hasil 1-50%, sementara bila menyerang leher malai dapat menurunkan hasil sampai 100% (Ou, 1985). Kegiatan pemuliaan secara konvensional untuk mendapatkan tanaman padi yang tahan terhadap penyakit blas sampai saat ini masih terus dilakukan, karena penyakit blas sangat cepat berubah. Sampai saat ini belum ada varietas padi yang benar-benar tahan terhadap penyakit blas, dan sumber gen ketahanan terhadap penyakit blas juga sangat terbatas (misalnya terdapat pada plasma nutfah padi liar). Untuk itu perlu dilakukan cara lain untuk menyediakan tanaman padi sebagai tetua yang mengandung gen tahan terhadap penyakit blas, yaitu dengan perakitan tanaman transgenik.

Saat ini dimungkinkan untuk melakukan rekayasa genetik untuk perbaikan ketahanan tanaman terhadap patogen melalui modifikasi tingkat ekspresi dari faktor transkripsi yang terlibat dalam mekanisme pertahanan. Untuk memodifikasi tingkat ekspresi dapat dilakukan dengan strategi over-ekspresi dari gen regulator yang terkait dengan sistem pertahanan tanaman.

Beberapa penelitian telah menunjukkan keberhasilan dalam mendapatkan tanaman padi tahan penyakit dengan menggunakan teknik transformasi dengan strategi over-ekspresi. Penelitian over-ekspresi dari gen penyandi protein regulator *Mitogen-activated protein kinase-1 (MK1)* dari *Capsicum annuum* dan *OsMAPK5* meningkatkan ketahanan terhadap cendawan blas pada padi (Xiong dan Yang, 2003; Lee *et al.*, 2004). Sedangkan penelitian over-ekspresi gen *OsWRKY13* yang dilakukan oleh Qiu *et al.* (2007) menunjukkan hasil peningkatan ketahanan tanaman padi terhadap patogen blas dan hawar daun bakteri.

WRKY merupakan suatu protein faktor transkripsi yang terlibat dalam regulasi jalur respon pertahanan tanaman. Famili atau keluarga faktor transkripsi *WRKY* banyak berperan di dalam merespon cekaman biotik dan abiotik, proses penuaan, perkecambahan biji, dan perkembangan trikoma (Zhang *et al.*, 2005; Chen, 2004; Franzisca *et al.*, 2004). Banyak protein *WRKY* yang terlibat dalam pertahanan terhadap serangan patogen tanaman (Ryu *et al.*, 2006). Penelitian tentang gen-gen *OsWRKY* telah dilakukan oleh Ryu *et al.* (2006), yang menunjukkan bahwa gen *OsWRKY76* adalah salah satu dari gen yang termasuk keluarga *OsWRKY* yang memperlihatkan peningkatan ekspresi pada tanaman padi yang tahan setelah diinokulasi dengan cendawan *Pyricularia grisea*. Gen *OsWRKY76* ini terletak pada segmen di kromosom 9 yang oleh Wisser *et al.* (2005) diidentifikasi terkait dengan ketahanan penyakit spektrum luas.

Teknik transfer gen melalui *Agrobacterium* telah banyak dilakukan untuk pengembangan tanaman tahan terhadap hama dan penyakit. *Agrobacterium*

tumefaciens menginfeksi tanaman dan mengintroduksi sebagian dari plasmid-Ti (*tumor inducing*) yang disebut dengan T-DNA (*transfer DNA*) ke dalam genom tanaman. Menurut Opabode (2006) efisiensi transformasi menggunakan *A. tumefaciens* dalam pembentukan tanaman transgenik sangat tergantung dari beberapa hal di antaranya adalah genotipe tanaman, strain *Agrobacterium*, vektor plasmid biner, senyawa penginduksi gen *Vir*, komposisi medium transformasi, dan suhu lingkungan.

Pada penelitian ini telah dilakukan konstruksi dan introduksi konstruk over-ekspresi kandidat gen *OsWRKY76* ke dalam tanaman padi Nipponbare melalui *A. tumefaciens*. Adapun tujuan dari kegiatan ini adalah merakit tanaman padi Nipponbare transgenik yang mengandung konstruk over-ekspresi kandidat gen *OsWRKY76*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler dan Rumah Kaca Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB-Biogen) pada bulan September 2006-Oktober 2007.

Pada penelitian ini dilakukan 3 rangkaian kegiatan yang berkesinambungan, yaitu (1) perakitan konstruk vektor over-ekspresi kandidat gen *OsWRKY76*, (2) transformasi padi Nipponbare dengan *A. tumefaciens*, dan (3) deteksi gen *hptIII* pada tanaman padi transgenik dengan teknik PCR.

Konstruksi Kandidat Gen *OsWRKY76* pada pCAMBIA-1301

Isolasi dan kloning kandidat gen *OsWRKY76* pada pGEM-T Easy

Fragmen kandidat gen *OsWRKY76* diperoleh dari hasil amplifikasi DNA genom padi varietas Nipponbare menggunakan primer spesifik yang telah dirancang menggunakan software PRIMER 3. Perancangan primer berdasar sekuen DNA genom yang diperoleh dari bank gen melalui peruntukan situs di internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Pasangan primer yang digunakan adalah *Forward primer* = 5'-AATAGGATCCTGGTCGTCGTCGTCGTCG ATG-3' dan *Reverse primer* = 5'-AGTCAGTCGACGCTAGAATTCCGGGCAGCTTC-3'. Pasangan primer tersebut memasukkan situs pemotongan enzim restriksi *Bam*HI dan *Sal*I ke produk amplifikasi pada bagian 5' dan 3' yang digunakan untuk keperluan ligasi. Amplifikasi kandidat gen *OsWRKY76* menggunakan metode Mullis dan Faloona (1987). Hasil amplifikasi kandidat gen *OsWRKY76* dengan ukuran sekitar 1.200 bp pada gel

agarose diisolasi dan dipurifikasi dengan menggunakan *Gel Extraction Kit (Qiagen)* mengikuti prosedur yang direkomendasikan. Fragmen kandidat gen *OsWRKY76* tersebut kemudian diligasi ke dalam plasmid pGEM-T Easy (*Promega*) dan ditransformasikan ke dalam *Escherichia coli*. Koloni hasil transformasi yang tumbuh di media seleksi kemudian ditumbuhkan di media LB cair dan dilakukan isolasi plasmid dengan metode lisis alkali (Sambrook *et al.*, 1989). Plasmid yang diperoleh kemudian dipotong dengan menggunakan enzim restriksi *BamHI* dan *Sall*. Hasil pemotongan diseparasi dengan elektroforesis dan fragmen berukuran sekitar 1.200 bp dipurifikasi menggunakan *Qiagen*.

Konstruksi kandidat gen *OsWRKY76* pada pCAMBIA-1301

Fragmen promotor 35S-CaMV yang berawal dari -526 sampai situs awal transkripsi (TTS/*transcription start site*) diperoleh sebagai fragmen 0,55 kb *HindIII-BamHI* dari turunan pBS-SK+ dari pDH51 (Pietrzak *et al.*, 1986). Fragmen terminator 35S-CaMV diperoleh sebagai fragmen 0,21 kb *Sall-EcoRI* dari turunan pBS-SK+ dari pDH51 (Pietrzak *et al.*, 1986). Plasmid pCAMBIA-1301 digunakan sebagai vektor biner, yang untuk keperluan ligasi dipotong dengan enzim restriksi *HindIII-EcoRI*. Fragmen-fragmen promotor 35S-CaMV, terminator 35S-CaMV, pCAMBIA-1301 dipurifikasi dari gel menggunakan *Qiagen*.

Konstruk over-ekspresi kandidat gen *OsWRKY76* dirakit dengan meligasikan fragmen-fragmen individual (promotor, kandidat gen *OsWRKY76*, dan terminator) dengan ujung-ujung kohesif yang kompatibel bersama-sama ke dalam vektor biner dalam satu reaksi. Plasmid rekombinan tersebut kemudian ditransformasikan ke dalam bakteri *E. coli* kompeten dengan metode *heat shock* (Sambrook *et al.*, 1989). Koloni-koloni tunggal yang diperoleh dari hasil transformasi tersebut ditumbuhkan dalam media LB cair yang mengandung antibiotik kanamisin 100 mg/L dan diisolasi plasmidnya dengan menggunakan metode lisis-alkali (Sambrook *et al.*, 1989). Keberhasilan konstruksi diverifikasi dengan memotong plasmid rekombinan dengan menggunakan enzim restriksi yang sesuai. Plasmid rekombinan ini kemudian dimasukkan ke dalam *A. tumefaciens* strain Agl-1 dan EHA 105 dengan metode '*freeze-thaw*' (Sambrook *et al.*, 1989). Penggunaan kedua strain bakteri tersebut karena keduanya merupakan strain bakteri yang supervirulen.

Transformasi Konstruk Kandidat Gen *OsWRKY76* ke dalam Tanaman Padi Nipponbare

Transformasi konstruk over-ekspresi kandidat gen *OsWRKY76* ke dalam genom tanaman mengguna-

kan prosedur yang diuraikan dalam Greco *et al.* (2001) dengan sedikit modifikasi. Kalus padi Nipponbare dipersiapkan dengan menggunakan prosedur Greco *et al.* (2001). Setelah 25-30 hari kalus yang tumbuh di-subkultur pada media induksi kalus baru. Dua minggu kemudian kalus yang tumbuh dan bersifat embriogenik (diseleksi di bawah mikroskop) digunakan sebagai bahan untuk transformasi dengan menggunakan *Agrobacterium* yang telah mengandung plasmid rekombinan yang membawa konstruk over-ekspresi kandidat gen *OsWRKY76*.

Transformasi dilakukan dengan merendam kalus-kalus embriogenik ke dalam suspensi bakteri *A. tumefaciens* strain Agl-1 dan EHA 105 yang mengandung konstruk over-ekspresi kandidat gen *OsWRKY76* dengan mengikuti prosedur Greco *et al.* (2001).

Seleksi kalus, regenerasi, perakaran, dan aklimatisasi tanaman padi Nipponbare transgenik mengikuti prosedur Greco *et al.* (2001) dengan sedikit modifikasi.

Deteksi Keberadaan Gen *hptII* dalam Padi Transgenik Nipponbare

Analisis PCR adalah metode deteksi secara cepat untuk mengetahui keberadaan transgen di dalam jaringan tanaman putatif transgenik. DNA genom diisolasi dari daun padi dengan metode miniprep SDS-Urea (Pereira dan Aarts, 1998). DNA dari tanaman padi transgenik generasi T₀ dan T₁ digunakan untuk analisis molekuler menggunakan teknik PCR dengan primer spesifik gen higromisin (*hptII*), yaitu primer *Forward*: 5'-GATGCCTCCGCTCGAAGTAGCG-3' dan primer *Reverse*: 5'-GCATCTCCCGCCGTGCAC-3'. Amplifikasi gen *hptII* akan menghasilkan fragmen dengan ukuran 500 bp.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Konstruksi Kandidat Gen *OsWRKY76* pada pCAMBIA-1301

Isolasi dan kloning kandidat gen *OsWRKY76* pada pGEM-T Easy

Amplifikasi DNA genom padi Nipponbare menggunakan primer untuk kandidat gen *OsWRKY76* telah menghasilkan amplikon dengan ukuran sebesar ±1.200 bp (Gambar 1). Ukuran fragmen tersebut sesuai dengan ukuran kandidat gen *OsWRKY76* yang diharapkan.

Hasil amplifikasi kandidat gen *OsWRKY76* tersebut kemudian diisolasi dari gel agarose dengan menggunakan *Qiagen* untuk mendapatkan fragmen gen. Fragmen kandidat gen *OsWRKY76* kemudian diligasi-

kan ke dalam plasmid pGEM-T Easy dan ditransformasikan ke *E. coli* DH5 α .

Dari kegiatan transformasi plasmid rekombinan ke dalam bakteri *E. coli* DH5 α ini didapatkan 23 koloni bakteri berwarna putih. Dari koloni-koloni tersebut diambil 6 koloni bakteri untuk ditumbuhkan pada medium LB cair yang mengandung antibiotik ampisilin untuk konfirmasi keberhasilan ligasi. Untuk konfirmasi keberhasilan ligasi, plasmid yang telah diisolasi kemudian dipotong menggunakan enzim *Bam*HI dan *Sal*I (Gambar 2). Kegiatan ini dilakukan selain untuk memastikan bahwa plasmid pGEM-T Easy yang diisolasi dari koloni bakteri yang berwarna putih adalah benar merupakan plasmid pGEM-T Easy rekombinan yang mengandung kandidat gen *OsWRKY76*, juga untuk mendapatkan fragmen kandidat gen *OsWRKY76* dengan ujung-ujung kohesif hasil pemotongan dengan enzim *Bam*HI dan *Sal*I.

Dari hasil konfirmasi tersebut diperoleh 4 sampel plasmid rekombinan yang menghasilkan ukuran seperti yang diharapkan, yaitu sampel nomor 1, 2, 4, dan 5 (Gambar 2). Sampel-sampel tersebut menghasilkan produk pemotongan dengan ukuran 3.000 bp yang merupakan ukuran plasmid pGEM-T Easy dan 1.200 bp yang merupakan ukuran dari fragmen kandidat gen

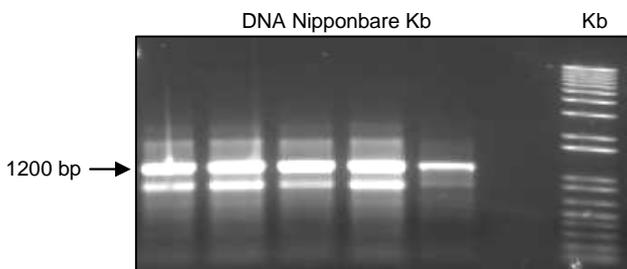
OsWRKY76. Sampel nomor 3 dan 6 menghasilkan produk pemotongan dengan ukuran yang tidak semestinya, sehingga plasmid tersebut tidak digunakan untuk penelitian selanjutnya.

Konstruksi kandidat gen *OsWRKY76* pada pCAMBIA-130

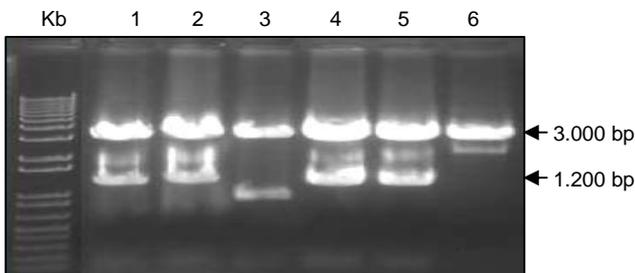
Promotor yang digunakan dalam kegiatan ini adalah promotor 35SCaMV, yaitu jenis promotor yang diekspresikan secara kuat, terus menerus, dan diekspresikan di semua bagian tanaman bila telah terintegrasi di dalam genom tanaman. Fragmen promotor 35SCaMV diperoleh dengan memotong plasmid pSP13 dengan enzim *Hind*III dan *Bam*HI. Seperti yang diharapkan dari pemotongan dua enzim ini dihasilkan fragmen promotor 35SCaMV yang berukuran 550 bp dan ukuran 3.000 bp yang merupakan ukuran plasmid pBS-SK+ (Gambar 3A). Fragmen terminator 35SCaMV diperoleh dengan memotong plasmid pST8 dengan enzim *Sal*I dan *Eco*RI. Seperti yang diharapkan, dari hasil pemotongan dengan menggunakan 2 macam enzim restriksi ini didapatkan fragmen terminator 35SCaMV berukuran 210 bp (Gambar 3B). Fragmen promotor dan terminator dengan ukuran yang tepat diisolasi dari gel agarose dan kemudian diekstraksi menggunakan *Gel Extraction Kit* (*Qiagen*). Kegiatan ini bertujuan untuk mendapatkan fragmen promotor dan terminator 35SCaMV yang mempunyai ujung kohesif yang sesuai untuk keperluan kloning.

Pada kegiatan ini digunakan plasmid biner pCAMBIA-1301 sebagai vektor biner/ekspresi. Plasmid tersebut dipilih karena selain terdapat enzim restriksi yang sesuai pada daerah MCS (*multi cloning site*) yang cocok untuk kegiatan kloning, juga pada daerah T-DNanya mengandung gen ketahanan terhadap antibiotik higromisin yang sesuai untuk seleksi pada kalus padi. Untuk tanaman padi saat ini sudah diketahui dosis semi letalnya terhadap antibiotik tersebut, yaitu 50 mg/l (Hiei *et al.*, 1994). Plasmid biner pCAMBIA-1301 yang digunakan sebagai vektor dalam konstruk ini dipotong dengan menggunakan enzim restriksi *Hind*III dan *Eco*RI. Pemotongan tersebut bertujuan untuk mendapatkan fragmen pCAMBIA-1301 yang ujungnya sesuai untuk keperluan kloning. Enzim-enzim tersebut memotong pada daerah MCS dari plasmid pCAMBIA-1301. Hasil pemotongan tersebut kemudian disepariasi pada gel agarose dan fragmen berukuran 11.837 bp (Gambar 3C) diisolasi dari gel menggunakan *Gel Extraction Kit* (*Qiagen*).

Kegiatan konstruksi selanjutnya adalah meligasi fragmen kandidat gen *OsWRKY76* dengan fragmen promotor-terminator 35SCaMV dan plasmid biner pCAMBIA-1301 sebagai vektor ekspresi yang kemudian ditransformasikan ke dalam *E. coli* DH5 α dengan me-



Gambar 1. Hasil amplifikasi 5 sampel DNA Nipponbare dengan primer untuk kandidat gen *OsWRKY76*. Ukuran kandidat gen *OsWRKY76* yang diharapkan sebesar ± 1.200 bp ditandai dengan anak panah.

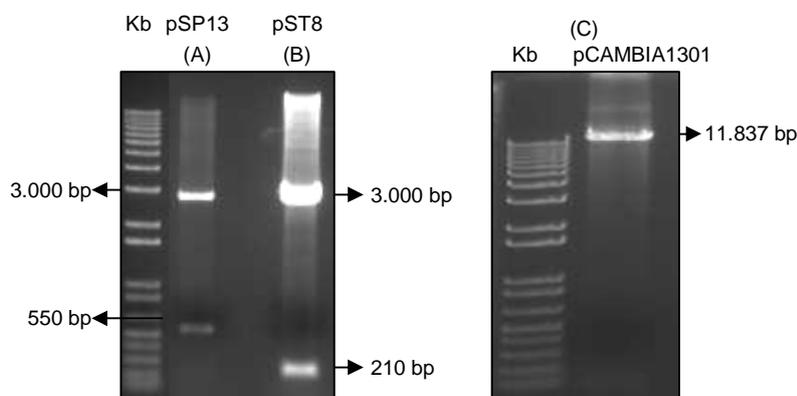


Gambar 2. Hasil konfirmasi keberadaan fragmen kandidat gen *OsWRKY76* pada plasmid pGEM-T easy yang dipotong dengan enzim *Bam*HI dan *Sal*I, menghasilkan fragmen dengan ukuran ± 3.000 bp (fragmen pGEM-T Easy) dan 1.200 bp (fragmen *OsWRKY76* sampel nomor 1, 2, 4, dan 5). Sampel nomor 3 dan 6 menghasilkan ukuran fragmen yang tidak sesuai.

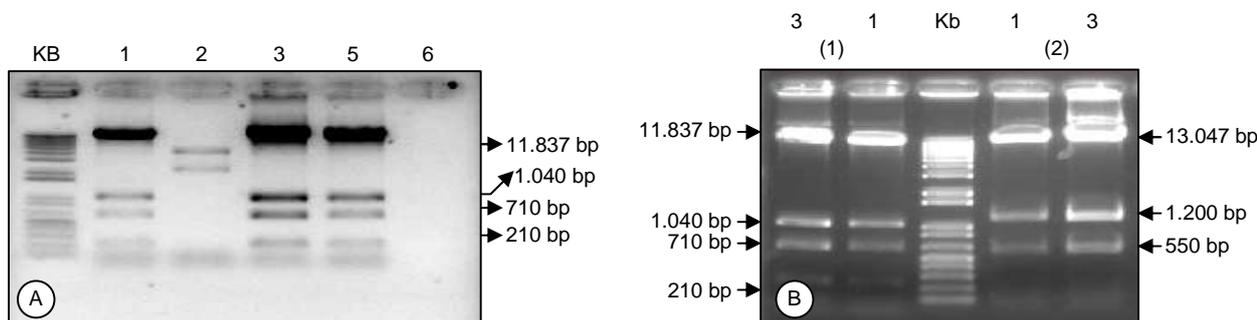
tode *heat-shock* (Sambrook *et al.*, 1989). Hasil transformasi tersebut diperoleh 6 koloni bakteri yang tumbuh di media seleksi. Dari 6 koloni yang ditumbuhkan, koloni nomor 4 tidak tumbuh, sehingga hanya 5 koloni yang diisolasi plasmidnya. Dari 5 koloni bakteri yang diuji hanya 3 koloni bakteri yang mengandung plasmid rekombinan yang benar, yaitu koloni nomor 1, 3, dan 5 (Gambar 4A). Sedangkan koloni nomor 2 menghasilkan fragmen dengan ukuran tidak seperti yang diharapkan dan koloni nomor 6 tidak mengandung plasmid, karena tidak dihasilkan fragmen dari hasil pemotongan. Kesimpulan tersebut diperoleh dengan melihat ukuran fragmen yang didapatkan setelah dilakukan pemotongan plasmid dengan enzim *EcoRI*, yaitu 210 bp yang merupakan ukuran terminator 35SCaMV, 710 bp merupakan ukuran sebagian dari potongan

kandidat gen *OsWRKY76*, 1040 bp merupakan ukuran dari gabungan antara promotor 35SCaMV (550 bp) dan sebagian potongan kandidat gen *OsWRKY76* (490 bp), dan 11.837 bp merupakan ukuran fragmen dari pCAMBIA-1301.

Hasil pemotongan konstruksi plasmid dari koloni nomor 1 dan 3 dengan menggunakan 3 enzim restriksi, yaitu *HindIII*, *BamHI*, dan *Sall*, diperoleh 3 fragmen dengan ukuran \pm 550, 1.200, dan 1.3047 bp (Gambar 4B(2)). Ukuran tersebut secara berurutan merupakan fragmen 35SCaMV promotor, *OsWRKY76*, dan gabungan antara pCAMBIA-1301 (11.837 bp) dan terminator 35SCaMV (220 bp). Hasil ini sudah sesuai dengan ukuran yang diharapkan dan dapat dikatakan bahwa konstruk kandidat gen over-ekspresi *OsWRKY76* telah berhasil dirakit (Gambar 5).



Gambar 3. Hasil pemotongan plasmid pSP13 dengan enzim *HindIII* dan *BamHI* menghasilkan fragmen promotor 35SCaMV dengan ukuran 550 bp dan fragmen plasmid pBS-SK+ (3.000 bp) (A), hasil pemotongan plasmid pST8 dengan enzim *SalI* dan *EcoRI* menghasilkan fragmen terminator 35SCaMV dengan ukuran 210 bp dan fragmen plasmid pBS-SK+ (3.000 bp) (B), hasil pemotongan plasmid biner pCAMBIA-1301 dengan enzim *HindIII* dan *EcoRI* menghasilkan fragmen berukuran 11.837 bp (C).



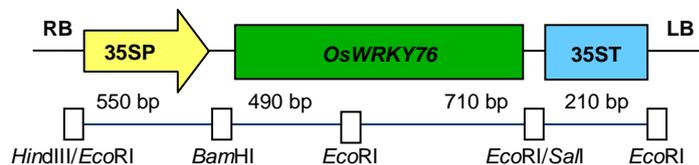
Gambar 4. Hasil pemotongan plasmid pCAMBIA 1301::35S::*OsWRKY76* dengan enzim restriksi *EcoRI*. Ukuran yang dihasilkan dari pemotongan tersebut adalah: 210 bp yang merupakan ukuran terminator 35SCaMV, 710 bp merupakan ukuran sebagian potongan kandidat gen *OsWRKY76*, 1040 bp merupakan ukuran dari gabungan promotor 35SCaMV dan sebagian potongan kandidat gen *OsWRKY76*, dan 11.837 bp merupakan ukuran fragmen pCAMBIA 1301 (A); hasil konfirmasi dari 2 sampel plasmid untuk mengetahui keberadaan gen kimer (promotor 35SCaMV, kandidat gen *OsWRKY76*, dan terminator 35SCaMV) pada plasmid biner pCAMBIA-1301, dengan menggunakan 2 cara pemotongan (1) pCAMBIA1301 rekombinan dipotong dengan menggunakan enzim restriksi *EcoRI* menghasilkan produk hasil pemotongan dengan ukuran 210, 710, 1040, dan 11837 bp, dan (2) pCAMBIA-1301 rekombinan dipotong menggunakan 3 enzim restriksi *HindIII*, *BamHI*, dan *Sall*, menghasilkan produk dengan ukuran 550, 1200, dan 13047 bp. Kb = marker 1 Kb plus (*Invitrogen*), 1, 3 = plasmid dari koloni bakteri nomor 1 dan 3 (B).

Vektor ekspresi rekombinan pCAMBIA-1301::35S::OsWRKY76 yang telah berhasil dirakit kemudian ditransformasikan ke dalam *A. tumefaciens* strain Agl-1 dan EHA 105. Dari hasil transformasi tersebut diperoleh 3 koloni Agrobacterium dari strain Agl-1 dan 7 koloni dari strain EHA 105 yang tumbuh pada media seleksi. Dari hasil isolasi plasmid dari koloni yang tumbuh, telah ditransformasikan kembali ke *E. coli* dan diperoleh 6 koloni dari strain EHA 105 dan 4 koloni dari strain Agl-1. Konfirmasi plasmid rekombinan dari koloni tersebut dilakukan dengan pemotongan plasmid pCAMBIA-1301::35S::OsWRKY76 menggunakan enzim restriksi *EcoRI*. Dari hasil pemotongan tersebut didapatkan 4 fragmen baik dari plasmid rekombinan yang berasal dari Agrobacterium strain Agl-1 maupun dari EHA 105 (Gambar 6).

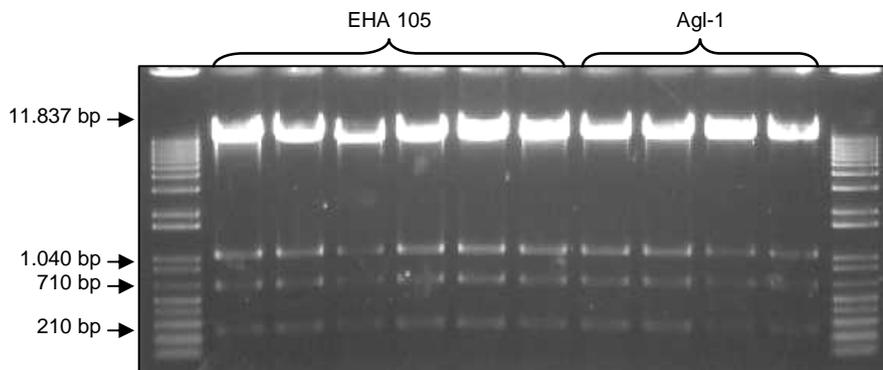
Fragmen tersebut masing-masing dengan ukuran 210, 710, 1.040, dan 11.837 bp (Gambar 6). Ukuran tersebut sesuai dengan peta plasmid yang telah berhasil dikonstruksi (Gambar 5). Dengan melihat ukuran fragmen yang dihasilkan tersebut, menunjukkan bahwa transformasi plasmid pCAMBIA-1301::35S::OsWRKY76 ke dalam *A. tumefaciens* strain Agl-1 dan EHA 105 telah berhasil. *A. tumefaciens* strain Agl-1 dan EHA 105 yang telah mengandung plasmid pCAMBIA-1301 rekombinan tersebut kemudian ditransformasikan pada tanaman padi Nipponbare.

Transformasi Konstruk Kandidat Gen OsWRKY76 ke dalam Padi Nipponbare

Salah satu faktor yang mempengaruhi transformasi padi dengan menggunakan eksplan kalus adalah sifat kalus yang digunakan. Kalus yang digunakan harus bersifat embriogenik yang dicirikan dengan kalus berwarna agak kekuningan, mengkilap, bulat, dan permukaannya berigi-rigi halus. Kalus yang bersifat embriogenik ini akan mempengaruhi pada tahap regenerasi untuk membentuk tunas. Selain itu, sistem transformasi yang sudah mapan akan sangat membantu di dalam memperoleh transforman dengan cepat. Hasil transformasi kalus setelah diperlakukan di media kokultivasi, secara umum dapat dilihat bahwa jumlah kalus dari awal yang dapat lolos sampai ke tahap regenerasi semakin menurun (Tabel 1). Kalus yang tidak tahan pada medium seleksi yang mengandung antibiotik higromisin akan mati, ditunjukkan dengan kalus berwarna hitam, sedangkan kalus yang tahan pada medium seleksi akan terus tumbuh, dicirikan dengan terjadinya pertumbuhan kalus yang berwarna putih kekuningan (Gambar 7). Kalus yang tidak tahan tersebut tidak mengandung konstruk over-ekspresi kandidat gen *OsWRKY76* yang ditransfer oleh Agrobacterium. Bagian T-DNA dari plasmid rekombinan yang digunakan untuk transformasi selain mengandung konstruk over-ekspresi kandidat gen *OsWRKY76* juga mengandung gen ketahanan terhadap antibiotik higromisin.



Gambar 5. Skema konstruk 35SCaMV::OsWRKY76::35SCaMV dengan situs pemotongan enzim restriksi dan ukuran dari masing-masing fragmen.

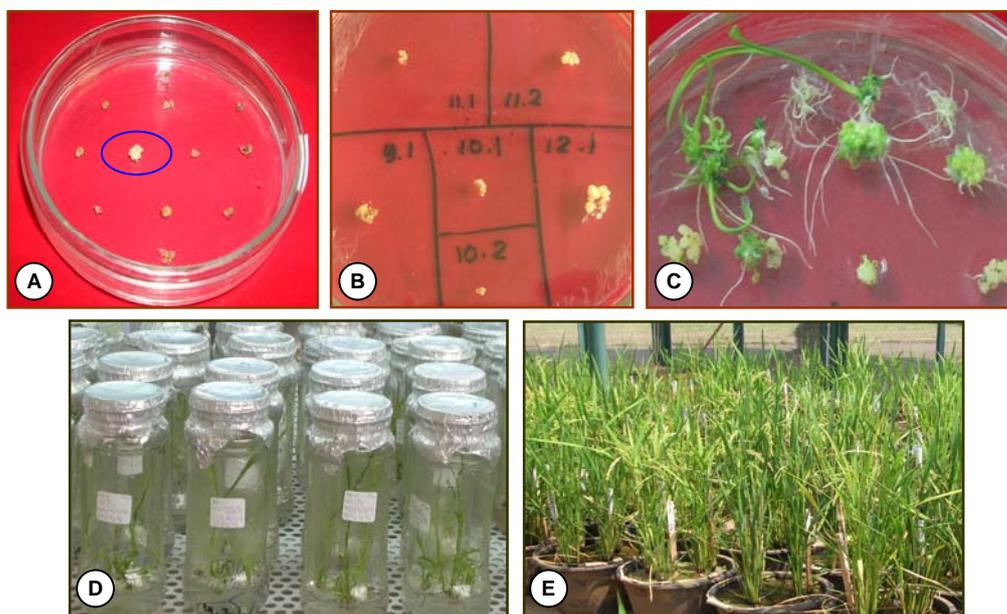


Gambar 6. Hasil konfirmasi pemotongan plasmid pCAMBIA-1301::35S::OsWRKY76 yang diisolasi dari *E. coli* dengan enzim restriksi *EcoRI*, menghasilkan fragmen dengan ukuran 210 (terminator 35SCaMV), 710 (potongan kandidat gen *OsWRKY76*), 1.040 (potongan kandidat gen *OsWRKY76* + promotor 35SCaMV), dan 11.837 bp (plasmid pCAMBIA-1301).

Tabel 1. Hasil transformasi kalus padi varietas Nipponbare dengan konstruk over-ekspresi kandidat gen *OsWRKY76* melalui *A. tumefaciens* strain Agl-1 dan EHA-105.

Strain <i>Agrobacterium</i>	Transformasi ke	Jumlah kalus	Jumlah kalus di media EIM	Jumlah kalus di media regenerasi	Jumlah galur independen	Jumlah tanaman
Agl-1	1	277	52 (19%)	31 (11,2%)	27 (10%)	117
	2	385	135 (35%)	73 (19%)	71 (18%)	313
	3	377	37 (10%)	34 (9%)	2 (0,5%)	2
Total		1.039	224 (21,6%)	138 (13,3%)	100 (9,6%)	432
EHA-105	1	370	28 (7,5%)	9 (2,4%)	8 (2%)	15
	2	222	31 (14%)	5 (2,3%)	4 (2%)	15
	3	417	157 (38%)	14 (3,4%)	14 (3%)	30
Total		1.009	216 (21,4%)	28 (2,8%)	26 (2,6%)	60

Nilai di dalam kurung adalah nilai persentase dari jumlah kalus awal.



Gambar 7. Hasil transformasi kalus padi Nipponbare melalui *A. tumefaciens* yang mengandung vector biner pCAMBIA-1301::35S::*OsWRKY76*. A = kalus pada media seleksi yang mengandung higromisin 50 mg/l, B = kalus yang tumbuh di media EIM (induksi embrio) yang mengandung antibiotik higromisin 50 mg/l, C = kalus yang berhasil beregenerasi di media regenerasi yang mengandung antibiotik higromisin 30 mg/l, D = planlet di media perakaran yang mengandung antibiotik higromisin 40 mg/l, E = populasi tanaman padi Nipponbare transgenik hasil aklimatisasi di rumah kawat.

Dalam penelitian ini digunakan 2 strain *Agrobacterium* yang dikelompokkan pada strain yang supervirulen, yaitu Agl-1 dan EHA 105. Hasil penelitian selama ini menunjukkan bahwa tingkat virulensi dari strain bakteri *Agrobacterium* yang digunakan dapat mempengaruhi untuk mendapatkan transforman. Dengan sifat virulensi strain *Agrobacterium* yang tinggi diharapkan dapat menginfeksi eksplan lebih kuat dibandingkan dengan strain kurang virulen. Opabode (2006) mengutarakan bahwa efisiensi transformasi sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor di antaranya adalah faktor *Agrobacterium* dan jaringan tanaman. Di dalamnya termasuk genotipe tanaman, jenis eksplan, vektor plasmid, strain bakteri, komposisi media kultur, dan pengurangan tekanan infeksi *Agrobacterium*

setelah kokultivasi. Apabila dilihat dari nilai efisiensi transformasi dalam mendapatkan galur independen, transformasi yang menggunakan strain *Agrobacterium* Agl-1 mempunyai nilai efisiensi transformasi mencapai 9,6% dengan 100 galur independen. Sedangkan transformasi menggunakan strain EHA 105 nilai efisiensi transformasi hanya mencapai 2,6% dengan 26 galur independen (Tabel 1). Meskipun kedua strain *Agrobacterium* yang digunakan untuk transformasi kompeten untuk transformasi kalus Nipponbare, namun strain Agl-1 lebih kompatibel di dalam menginfeksi kalus padi Nipponbare dibandingkan dengan strain EHA 105. Penelitian yang menunjukkan hubungan kompatibilitas strain *Agrobacterium* dengan eksplan yang digunakan untuk transformasi telah dilakukan

oleh beberapa peneliti. Rachmawati *et al.* (2004) menggunakan 2 strain *Agrobacterium*, yaitu EHA 101 dan LBA 4404, untuk transformasi kalus padi Rojolele. Dari penelitian tersebut menunjukkan bahwa meskipun kedua strain kompeten untuk transformasi kalus Rojolele, namun strain EHA 101 lebih efektif di dalam menginfeksi kalus padi Rojolele dibandingkan dengan strain LBA4404. Nilai efisiensi transformasi Rojolele menggunakan strain tersebut mencapai 23%. Penelitian lain telah dilakukan oleh Dang *et al.* (2007) yang melakukan transformasi embrio tip kedelai dengan menggunakan 3 strain *Agrobacterium*, yaitu KYRT1, EHA105, dan LBA4404. Hasil transformasi tersebut menunjukkan bahwa strain KYRT1 paling efektif di dalam menginfeksi embrio tip kedelai (efisiensi transformasi mencapai 69,3%) dibandingkan dengan 2 strain *Agrobacterium* yang lain.

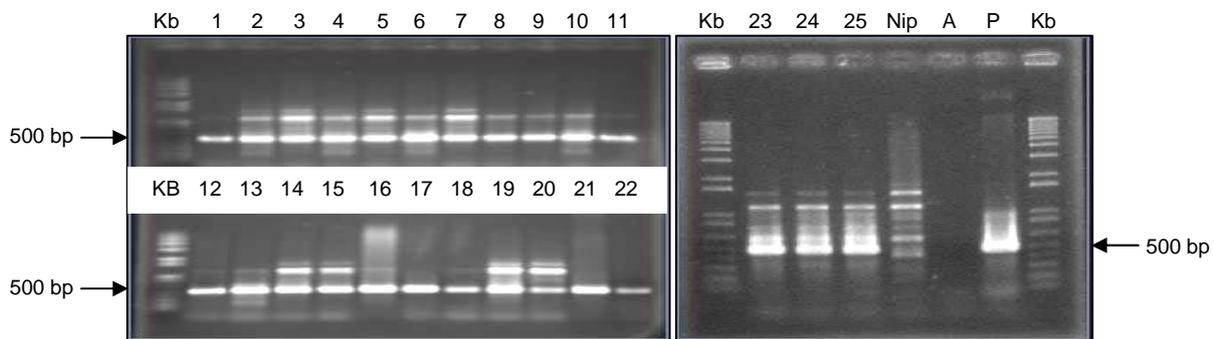
Dari hasil pengamatan kalus-kalus yang berhasil lolos di media seleksi dan dipindahkan ke media penginduksian embrio (EIM) akan membentuk spot hijau pada $\pm 7-21$ hari setelah kalus di pindah ke media regenerasi (Gambar 7). Dari 166 kalus yang dapat lolos sampai ke media regenerasi, hanya 126 kalus yang dapat beregenerasi membentuk tunas (sebagai galur independen) (Tabel 1). Tunas-tunas yang muncul dari spot-spot hijau tersebut setelah berukuran ± 2 cm dipindahkan ke media perakaran yang mengandung higromisin 40 mg/l. Pemindehan ini bertujuan selain untuk pertumbuhan akar juga untuk seleksi pada tingkat planlet. Planlet transgenik di media perakaran akan membentuk akar secara sempurna dan akarnya berwarna putih. Namun apabila ada planlet yang *escape*, maka akar yang tumbuh di media perakaran akan berwarna coklat dan lama-kelamaan planlet akan mati (gambar tidak ditampilkan).

Deteksi Keberadaan Gen *hptII* pada Tanaman Transgenik Nipponbare

Dari 126 galur independen yang diperoleh dari hasil transformasi, 25 galur independen digunakan untuk analisis PCR dengan menggunakan primer untuk gen *hptII*. Hasil analisis PCR tersebut menunjukkan bahwa semua galur independen yang dianalisis mengandung gen *hptII* (higromisin), yang diperlihatkan dengan terbentuknya amplicon berukuran sekitar 500 bp (Gambar 8). Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa di dalam jaringan tanaman dari 25 galur tanaman transgenik generasi T_0 yang dianalisis semua mengandung konstruk over-ekspresi kandidat gen *OsWRKY76*. Hal tersebut juga dapat mengindikasikan bahwa metode transformasi yang digunakan (metode Greco *et al.*, 2001) sangat efektif digunakan untuk transformasi kalus tanaman padi Nipponbare.

KESIMPULAN

Kandidat gen *OsWRKY76* telah berhasil dikonstruksi pada vektor biner pCAMBIA-1301. Introduksi konstruk vektor over-ekspresi kandidat gen *OsWRKY76* melalui *A. tumefaciens* ke dalam tanaman padi Nipponbare menghasilkan 126 galur independen. Transformasi menggunakan strain *Agrobacterium* Agl-1 lebih banyak (3,8 kali lebih banyak) menghasilkan galur independen dibandingkan dengan strain EHA 105. Dari 25 galur independen yang dianalisis, semua positif mengandung gen *hptII* yang merupakan bagian dari konstruk vektor over-ekspresi kandidat gen *OsWRKY76*.



Gambar 8. Hasil amplifikasi DNA padi Nipponbare transgenik generasi T_0 yang mengandung konstruk over-ekspresi kandidat gen *OsWRKY76* dengan menggunakan primer untuk gen *hptII* (gen untuk ketahanan terhadap antibiotik higromisin). Pita dengan ukuran ± 500 bp merupakan ukuran fragmen gen *hptII*. KB = Marker 1 Kb Plus (Invitrogen), 1-25 = sampel tanaman transgenik generasi T_0 , Nip = tanaman Nipponbare non transgenik, A = air, P = plasmid pCAMBIA-1301::35S::*OsWRKY76*.

DAFTAR PUSTAKA

- Chen, Z. 2004. Functional analysis of the *WRKY* transcription factor gene family in plant defense responses. Plant and Animal Genomes XII Conference. W203, Town & Country Convention Center San Diego, CA.
- Dang, W. and Z. Wie. 2007. An optimized *Agrobacterium*-mediated transformation for soybean for expression of binary insect resistance genes. *Plant Science* 173:381-389.
- Franziska, T., A. Zhou, and S. Imre E. 2004. Stimulus-dependent, promoter specific binding of transcription factor *WRKY1* to native promoter and the defense-related gene *PcPR1-1* in Parsley. *Plant Cell* 16(10): 2573-2585.
- Greco, R., P.B.F. Ouwkerk, A.J.C. Taal, C. Favalli, T. Beguiristain, P. Puigdomenech, L. Colombo, J.H.C. Hoge, and A. Pereira. 2001. Early and multiple *Ac* transposition in rice suitable for efficient insertional mutagenesis. *Plant Mol. Biol.* 46:215-227.
- Hiei, Y., S. Ohta, T. Komari, and 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.* 6:271-282.
- Lee, D.E., I.J. Lee, O. Han, M.G. Baik, S.S. Han, and K. Back. 2004. Pathogen resistance of transgenic rice plants expressing mitogen-activated protein kinase 1, *MK1*, from *Capsicum annum*. *Mol. Cells* 17(1):81-85.
- Mullis, K.B. and F.A. Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methodes Enzymol.* 155:335-350.
- Opabode, J.T. 2006. *Agrobacterium*-mediated transformation of plant: emerging factors that influence efficiency. *Biotech. Mol. Biol. Rev.* 1(1):12-20.
- Ou, S.H. 1985. Rice Diseases, Commonwealth Mycological Institute, Second edition, Kew. Surrey, England. p. 330-380.
- Pereira, A. and M.G.M. Aarts. 1998. Transposon Tagging with The *En-I* System. In J. Martinez-Zapater and J. Salinas (eds.) *Arabidopsis Protocols. Methods in Mol. Biol.* 82:329-338.
- Pietrzak, M., R.D. Shillito, T. Hohn, and I. Potrykus. 1986. Expression in plants of two bacterial antibiotic resistance genes after protoplast transformation with a new plant expression vector. *Nucleic Acids Res.* 14(14):5857-5868.
- Qiu, D., J. Xiao, X. Ding, M. Xiong, M. Cai, Y. Cao, X. Li, C. Xu, and S. Wang. 2007. *OsWRKY13* Mediates rice disease resistance by regulating defense-related genes in salicylate- and jasmonate-dependent signaling. *Amer. Phytopathol. Soc.* 20(5):492-499.
- Rachmawati, D., T. Hosaka, E. Inoue, and H. Anzai. 2004. *Agrobacterium*-mediated transformation of Javanica rice cv. Rojolele. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68(6):1193-1200.
- Rahamma, S. dan A. Hasanuddin. 1993. Resistensi beberapa varietas dan galur padi terhadap penyakit blas (*Pyricularia oryzae*). Kongres Nasional XII dan Seminar Ilmiah Perhimpunan Fitopatologi Indonesia, hlm. 126-130.
- Ryu, H.K., M. Han, S.K. Lee, J.I. Cho, N. Ryoo, S. Heu, Y.H. Lee, S.H. Bhoo, G.L. Wang, T.R. Hahn, and J.S. Jeon. 2006. A comprehensive expression analysis of the *WRKY* gene superfamily in rice plants during defense response. *Plant Cell Rep.* 25:836-847.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, New York. p. 38-101.
- Scardaci, S.C., R.K. Webster, C.A. Greer, J.E. Hill, J.F. Williams, R.G. Muters, D.M. Brandon, K.S. McKenzie, and J.J. Oster. 1997. Rice blast: A new disease in California. *Agr. Fact Sheet Ser.* 1:2-5.
- Wisser, R.J., Q. Sun, S.H. Hulbert, S. Kresovich, and R.J. Nelson. 2005. Identification and characterization of regions of the rice genome associated with broad-spectrum, quantitative disease resistance. *Genetics* 169(4):2277-93.
- Xiong, L. and Y. Yang. 2003. Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell* 15:745-759.
- Zhang, Y. and L. Wang. 2005. The *WRKY* transcription factor superfamily: Its origin in eukaryotes and expansion in plants. *BMC Evolutionary Biology* 5:1-12.
-