

Pengembangan Populasi Mutan Penanda Aktivasi: I. Transformasi Padi Japonica Tropis Lokal Sulawesi cv. Asemandi dengan bantuan *Agrobacterium tumefaciens*

Atmitri Sisharmini, Aniversari Apriana, Wening Enggarini, dan Kurniawan R. Trijatmiko

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111

ABSTRACT

Development of Activation Tagging Mutants Population: I. *Agrobacterium*-mediated Transformation of Tropical Japonica Rice of Local Sulawesi cv. Asemandi. Atmitri Sisharmini, Aniversari Apriana, Wening Enggarini, dan Kurniawan R. Trijatmiko. The rice transformation technology is not only provides valuable methods for the introduction of useful genes into rice plant to improve important agronomic traits, but also helps in studying gene function and regulation based on rice genome sequence information. Knockout of genes by insertional mutagenesis is a straightforward method to identify gene functions. One of the methods to develop rice mutants is through genetic transformation mediated by *Agrobacterium* using activation tagging by *Ac-Ds* system. A study was done with an objective to obtain mutant rice of local tropical japonica cv. Asemandi through genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. The transformation was conducted using *Agrobacterium* vector with the strain of Agl-1 containing activation tag construct. The result of experiment showed that it has been obtained 17 independent line (304 plants) transgenic Asemandi containing activation tag construct. These starter lines will be used as materials to develop several generations of stabil rice mutant through selfing.

Key words: Genetic transformation, rice cv. Asemandi, *Agrobacterium tumefaciens*, activation tagging.

PENDAHULUAN

Padi (*Oryza sativa* L.) adalah salah satu tanaman budi daya penting bagi masyarakat Indonesia dan merupakan sumber nutrisi utama bagi 40% populasi dunia (Hiei dan Komari 2006). Untuk tujuan penelitian biologi molekuler, padi juga merupakan salah satu tanaman model yang ideal untuk penelitian genomik. Hal ini disebabkan karena padi mempunyai ukuran genom yang relatif kecil dan informasi molekulernya telah dikarakterisasi dengan baik. Di samping itu, dalam penelitian rekayasa genetik, padi merupakan tanaman yang relatif efisien untuk transformasi genetik (Hirochika *et al.* 2004). Transformasi genetik dengan bantuan vektor *Agrobacterium* secara rutin telah digunakan pada beberapa tanaman monokotil, termasuk padi. Transformasi genetik pada padi, di samping me-

nyediakan teknologi dan metode yang efisien untuk mengintroduksi gen-gen dengan sifat-sifat agronomi penting, tetapi juga dapat digunakan untuk mempelajari fungsi dan regulasi gen berdasarkan informasi sekuen genom padi (Roy *et al.* 2000). Pendekatan *knockout* gen atau transposon mutagenesis (pembuatan mutan berdasarkan transposon) dapat digunakan untuk mengungkap fungsi dari gen-gen penting pada padi (Hirochika *et al.* 2004).

Sistem transposon mutagenesis telah dikembangkan pada tanaman padi dengan tujuan untuk mengetahui fungsi gen dengan menggunakan strategi *forward* dan *reverse genetics*. Pendekatan *forward genetics* mempelajari fungsi gen yang bergerak dari suatu mutan menuju ke sekuen gen (Bouchez dan Hofte 1998). Jadi pada pendekatan ini diawali dengan menguji perbedaan fenotipe dari mutan-mutan dibandingkan dengan tipe liar, setelah itu diidentifikasi sekuen gen yang bertanggung jawab terhadap perbedaan tersebut. Termasuk dalam pendekatan ini adalah analisis mutan yang berasal dari mutan alamiah atau mutan buatan manusia.

Pembuatan populasi mutan dapat dilakukan dengan transformasi genetik melalui *Agrobacterium tumefaciens* menggunakan penanda aktivasi (*activation tagging*) sistem transposon *Ac-Ds*. Keuntungan menggunakan sistem transformasi yang dimediasi dengan *Agrobacterium* adalah mempunyai jumlah kopi yang relatif rendah dengan sedikit pengaturan kembali jika dibandingkan dengan metode transfer DNA secara langsung seperti penembakan partikel (Hiei dan Komari 2006). Transposisi sistem heterolog *Ac-Ds* ini telah menunjukkan aktivitasnya dan potensial digunakan sebagai mutagen penyisipan yang efektif (Greco *et al.* 2001). Dengan pendekatan ini elemen *enhancer* dari promoter CaMV 35S dikonstruksi dalam kendaraan elemen transposon yang bisa berpindah-pindah dalam genom padi. Elemen ini akan meningkatkan ekspresi gen-gen tetangga di dekatnya, yang mengakibatkan fenotipe *gain of function* (Tani *et al.* 2004). Tanaman yang didapatkan dari teknik ini akan mengandung satu gen yang ekspresinya ditingkatkan akibat tersisipi elemen *enhancer* di dekat gen tersebut. Selanjutnya

tanaman ini bisa diseleksi ketahanannya terhadap penyakit atau sifat lain yang diinginkan. Dari tanaman yang tahan atau dengan sifat yang diinginkan kemudian akan diisolasi gen yang bertanggung jawab terhadap perubahan tersebut dengan memanfaatkan sekuen transposon yang sudah diketahui.

Pengembangan populasi dengan penanda aktivasi menggunakan transposon sudah berhasil dilakukan pada *Arabidopsis* (Marsch-Martinez *et al.* 2002). Dari populasi ini berhasil diidentifikasi mutan yang tahan kekeringan dan sudah berhasil diisolasi gennya (Aharoni *et al.* 2004). Lee *et al.* (1999) juga telah melakukan penelitian dengan penanda aktivasi pada tanaman padi dan telah mendapatkan 14.000 tanaman transgenik fertil yang mengandung paling tidak satu kopi sekuen T-DNA. Saat ini telah dirakit tanaman padi mutan yang dikembangkan oleh *International Rice Research Community* dari beberapa varietas padi japónica (Nipponbare, Tainung 67, Dongjing, Hwayoung, dan Zhounghua 11) dan indica (IR64) dengan vektor/mutagen Tos17, T-DNA, *Ac/Ds*, En/Spm, x ray dan EMS (Hirochika *et al.* 2004). Namun saat ini belum banyak dikembangkan tanaman mutan padi yang berasal dari padi subspecies japonica tropis. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian transformasi padi dengan vektor rakitan penanda aktivasi untuk menambah koleksi tanaman mutan padi khususnya dari padi subspecies japonica tropis lokal Sulawesi cv. Asemendi.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memperoleh tanaman mutan padi transgenik dari subspecies japonica tropis lokal Sulawesi cv. Asemendi yang mengandung rakitan penanda aktivasi melalui transformasi genetik dengan *A. tumefaciens* yang dapat digunakan sebagai dasar pengembangan populasi mutan penanda aktivasi untuk mendapatkan galur-galur tahan penyakit atau toleran terhadap cekaman abiotik.

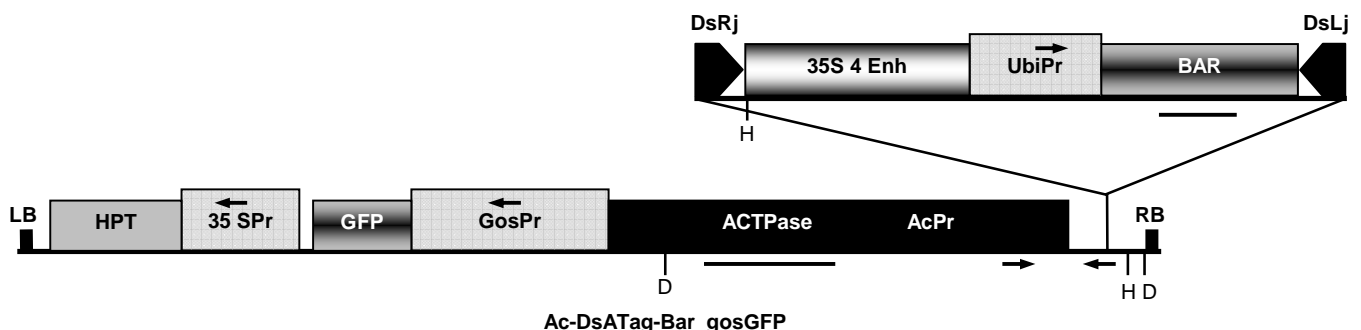
BAHAN DAN METODE

Kegiatan penelitian dilaksanakan di laboratorium dan rumah kaca Kelompok Peneliti Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian pada tahun 2006.

Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian adalah padi varietas Asemendi dan sebagai kontrol padi T309. Vektor penanda aktivasi berdasarkan transposon yang digunakan dalam penelitian ini adalah pAc-DsATag-Bar-gosGFP (Trijatmiko *et al.* 2005). Sedangkan metode transformasi yang digunakan berdasarkan pada metode Enckevort (2003). Vektor penanda aktivasi tersebut sudah dimasukkan ke dalam *A. tumefaciens* strain Agl-1 dan siap digunakan untuk transformasi padi. Vektor penanda aktivasi ini mengandung dua elemen. Elemen pertama, yaitu elemen *Ac* (*activator*) yang mengkode enzim *transposase* di bawah kontrol *Ac* promoter yang disambungkan dengan gen *gfp* (*green fluorescens protein*) di bawah kendali promoter Gos. Elemen kedua, yaitu elemen *Ds* (*dissociation*) berisi elemen *4x enhancer* dari promoter CaMV 35S dan ketahanan terhadap basta di bawah kendali promoter Ubi. Vektor ini mengandung gen *hygromycin phosphotransferase* (HPT) untuk seleksi tanaman transforman (Gambar 1).

Induksi Kalus Embriogenik

Benih padi disterilkan dengan direndam dalam alkohol 70% selama satu menit, chlorox 20% selama 30 menit dan dibilas tiga kali dengan air steril. Benih yang telah disterilkan digunakan sebagai eksplan untuk menginduksi pembentukan kalus embriogenik. Induksi kalus dilakukan dalam media yang terdiri atas media dasar NB (media yang mengandung unsur makro dari media dasar N6 (Chu *et al.* 1975) dan unsur



Gambar 1. Vektor penanda aktivasi berdasarkan transposon yang terdiri dari dua elemen, *Ac* dan *Ds* pada daerah T-DNANYa.

mikro dan vitamin dari media dasar B5 (Gamborg dan Shyluk 1981), dengan penambahan sukrosa 30 g/l, fitagel 3 g/l, dan 2,4-D 2,5 mg/l, dengan pH 5,8. Kalus mulai terbentuk 3-4 minggu setelah penanaman eksplan dalam media. Kalus yang dihasilkan dipindahkan pada media induksi kalus yang sama. Kalus hasil subkultur pertama yang berumur tidak lebih dari 2 minggu dan yang bersifat embriogenik digunakan sebagai eksplan untuk transformasi.

Persiapan Bakteri *A. tumefaciens* dan Ko-kultivasi

Koloni *Agrobacterium* yang mengandung vektor penanda aktivasi ditumbuhkan pada media YEP cair yang mengandung antibiotik karbenisilin 75 mg/l dan kanamisin 100 mg/l selama semalam pada inkubator yang bergoyang dengan suhu 28°C. Selanjutnya 500 ul kultur tersebut ditumbuhkan pada media AB padat yang mengandung antibiotik karbenisilin 75 mg/l dan kanamisin 100 mg/l, selama 3 hari pada suhu 28°C. Kultur *Agrobacterium* kemudian dilarutkan pada media ko-kultivasi cair, yaitu media dasar R2 (Ohira *et al.* 1973) dengan penambahan 2,4-D 2,5 mg/l, glukosa 10 g/l, dan asetosiringon 100 uM, dengan pH 5,2. Kalus-kalus padi embriogenik direndam dalam suspensi *Agrobacterium* selama 15 menit. Selanjutnya kalus dipanen dan dikeringkan pada kertas saring steril. Kalus ditransfer ke media ko-kultivasi padat, yang terdiri dari media dasar R2 dengan penambahan 2,4-D 2,5 mg/l, glukosa 10 g/l, asetosiringon 100 uM, dan fitagel 3 g/l, dengan pH 5,2, selama 4 hari pada suhu 25°C dalam kondisi gelap.

Seleksi Kalus pada Media Seleksi

Kalus-kalus hasil transformasi diseleksi pada media seleksi yang terdiri dari media dasar R2 dengan penambahan 2,4-D 2,5 mg/l, sukrosa 30 g/l, dan fitagel 3 g/l, higromisin 50 mg/l, sefotaksim 400 mg/l, vankomisin 100 mg/l, dengan pH 6. Kalus disubkultur pada media yang sama selama 2 x 2 minggu. Kalus-kalus yang tahan dan menunjukkan tanda-tanda embriogenik dipindahkan ke media induksi embrio yang terdiri dari media dasar LS (Linsmaier dan Skoog 1965) dengan penambahan 2,4-D 2,5 mg/l, sukrosa 30 g/l, air kelapa 100 ml/l dan fitagel 3 g/l, higromisin 50 mg/l, sefotaksim 100 mg/l, dan vankomisin 100 mg/l, dengan pH 5,8, selama kurang lebih satu minggu.

Regenerasi Kalus dan Induksi Perakaran

Setelah didapatkan kalus yang embriogenik (diseleksi dengan mikroskop binokuler), kalus kemudian dipindahkan ke media regenerasi. Media regenerasi yang digunakan adalah media dasar LS dengan penambahan IAA 0,5 mg/l, BAP 0,3 mg/l, sefotaksim 100

mg/l, vankomisin 100 mg/l, higromisin 30 mg/l, sukrosa 40 g/l, dan fitagel 7 g/l, dengan pH 5,8. Selanjutnya, kultur diinkubasikan dengan penyinaran 1.000 lux selama 16 jam sehari dalam ruang kultur bersuhu 28°C. Kalus secara kontinyu dipindahkan ke media regenerasi yang masih segar setiap 2 minggu hingga terbentuk tunas. Untuk menginduksi pembentukan planlet, tunas diakarkan dalam media perakaran, yaitu media dasar LS, dengan penambahan higromisin 40 mg/l, sukrosa 30 g/l, dan fitagel 3 g/l, dengan pH 5,8 selama dua minggu atau sampai dengan terbentuk akar.

Aklimatisasi

Aklimatisasi dilakukan secara bertahap dengan menanam planlet selama satu minggu dalam tabung reaksi berdiameter 1,5 cm dan tinggi 15 cm yang berisi 5 ml air dan selama dua minggu dalam bak plastik ukuran 44 cm x 34 cm x 15 cm yang berisi tanah sawah. Planlet yang bertahan hidup dalam periode aklimatisasi selanjutnya dipindahkan ke dalam pot plastik dengan volume 10 l yang berisi tanah sawah.

Pengujian Ketahanan Tanaman terhadap Basta

Pengujian ketahanan tanaman terhadap basta dilakukan dengan cara mengolesi ujung daun tanaman padi dengan larutan herbisida basta dengan konsentrasi 200 mg/l. Pengamatan dilakukan 3 hari setelah perlakuan. Tanaman dikatakan tahan jika daun tidak terbakar (warna daun tetap hijau) dan tidak tahan jika daun menjadi terbakar (warna daun coklat) pada area daun yang diolesi larutan basta.

Analisis Molekuler Gen dengan Teknik PCR

Isolasi DNA Total dari Tanaman

Isolasi DNA total dari tanaman dilakukan menggunakan metode Shure *et al.* (1983). DNA yang didapatkan kemudian diukur konsentrasinya menggunakan spektrofotometer. Selanjutnya DNA diencerkan dengan ddH₂O untuk mencapai konsentrasi 10 ng/ul. DNA ini siap digunakan untuk analisis PCR.

Amplifikasi DNA dengan Teknik PCR

Amplifikasi dengan teknik PCR dilakukan dengan menggunakan sepasang primer untuk gen ketahanan basta (bar). Sekuen primer yang digunakan adalah Bar-Forward 5'ACC ATG AGC CCA GAA CGA CGC 3', sedangkan Bar-Reverse 5' CAG GCT GAA GTC CAG CTG CCA G 3'. Total volume reaksi PCR adalah 20 µl yang mengandung DNA genomik cetakan 100 ng, 0,2 uM untuk masing-masing dNTP, primer Forward, dan Reverse masing-masing dengan konsentrasi 100 ng/ul, MgCl₂ dengan konsentrasi 1,5 mM, enzim Taq DNA

polymerase 0,16 unit dalam larutan bufer 1x. Reaksi amplifikasi dilakukan dengan mesin PCR (PCT-100, MJ Research Inc. USA) dengan program sebagai berikut: tahap denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, penempelan primer pada suhu 60°C selama 30 detik, dan pemanjangan/sintesis DNA pada suhu 72°C selama 45 detik. Tahapan program PCR tersebut diulang sebanyak 35 siklus. Pada tahap terakhir proses PCR dilakukan pemanjangan akhir pada suhu 72°C selama 5 menit. Setelah proses PCR selesai, sampel disimpan pada suhu 15°C atau bisa langsung divisualisasi dengan elektroforesis gel agarosa.

Elektroforesis Produk PCR pada Gel Agarosa

Sebanyak 10 µl produk PCR dari masing-masing sampel ditambahkan dengan 2 µl *loading dye* dan dicampur sempurna, kemudian dimasukkan ke dalam sumur pada agarosa gel 1% dengan bufer TAE 1x. Untuk menentukan ukuran dari produk PCR disertakan juga DNA standar (1 kb plus *ladder*) sebagai pembandingan. Sampel DNA tersebut dielektroforesis dengan tegangan 90 volt selama kurang lebih 1,5 jam. Setelah itu, agarosa gel diwarnai dengan larutan etidium bromida 10 mg/l selama 10 menit dan dicuci dengan air selama 20-30 menit. Fragmen-fragmen DNA pada agarosa gel kemudian divisualisasi dengan *Chemidoc gel system* (Biorad).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Transformasi genetik padi dengan vektor *A. tumefaciens* yang mengandung rakitan penanda aktivasi telah dilakukan pada tanaman padi Asemandi, sedangkan T309 digunakan sebagai kontrol transformasi. Dari dua kultivar padi yang ditransformasi, semuanya dapat menghasilkan lini-lini yang tahan pada media seleksi antibiotik higromisin dan menghasilkan jumlah lini independen yang berbeda (Tabel 1). Keberhasilan transformasi pada penelitian ini diindikasikan dengan diperolehnya kalus yang tahan terhadap higromisin. Pada transformasi tanaman, marka seleksi diperlukan oleh sel transforman untuk berkembang, marka ini akan dapat menghambat perkembangan sel non transforman. Persentase sel pada kalus yang dapat ditransformasi (menerima DNA asing) relatif ren-

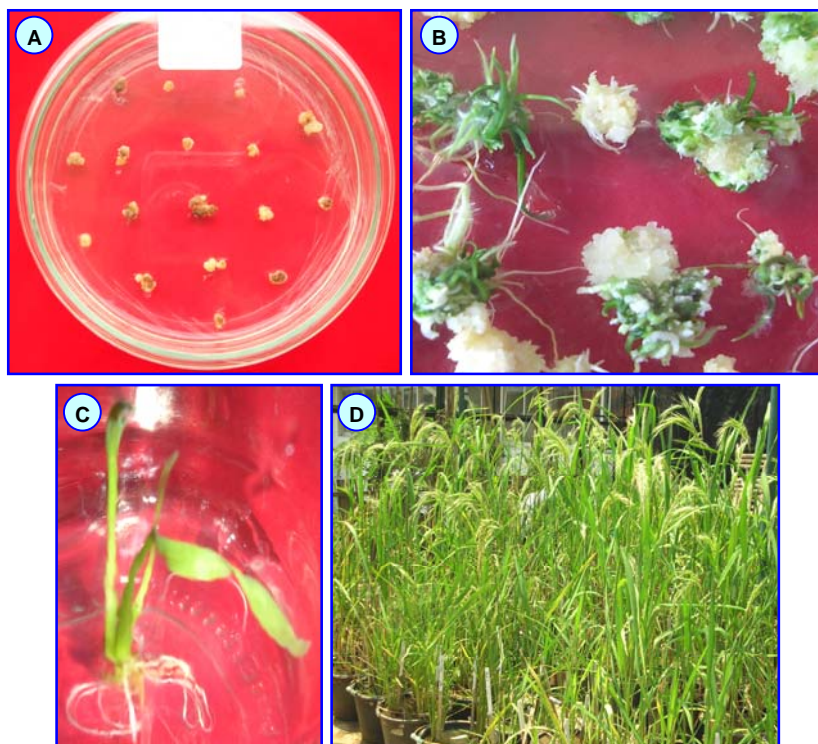
dah, oleh karena itu sangat penting untuk menghambat perkembangan dari sel non transforman (Zhu dan Wu 2008). Kalus yang tahan (transforman) akan mampu berproliferasi pada medium seleksi dan biasanya akan terlihat jelas pada seleksi putaran ke-2 dengan warna putih kekuningan dan *friable*. Kalus yang tidak tahan pada medium seleksi berwarna coklat kehitaman, tidak mampu berproliferasi, dan kemudian mati. Padi T309 menghasilkan persentase kalus yang tahan higromisin lebih tinggi (7%) daripada Asemandi (4%). Kalus-kalus yang tahan tersebut kemudian dipindah ke medium pembentukan embrio. Pada tahap ini kalus yang bersifat embriogenik saja yang dipilih untuk dipindah pada medium regenerasi. Kalus embriogenik tersebut bersifat *friable* dengan warna putih kekuningan, terdapat struktur globular, dan kalus bersifat relatif kering tidak basah. Keberhasilan awal terjadinya regenerasi ditandai dengan terbentuknya bintik-bintik hijau pada kalus yang tahan seleksi higromisin. Tidak semua kalus yang tahan seleksi higromisin mampu membentuk bintik hijau. Persentase pembentukan bintik-bintik hijau berkisar antara 40-53%. Pada medium regenerasi, kalus-kalus tersebut selanjutnya dapat berkembang dan beregenerasi menjadi tanaman hijau (Gambar 2). Pada tahap ini ternyata tidak semua kalus dengan bintik hijau mampu diregenerasikan menjadi tanaman kecuali pada T309 sedangkan tingkat regenerasi Asemandi hanya mencapai 76,9%. Menurut Lin dan Zhang (2006), rendahnya respon regenerasi kalus, coklatnya kalus yang diseleksi, dan kurangnya kemampuan jaringan untuk ditransformasi merupakan faktor pembatas dalam transformasi.

Sistem transformasi yang efisien merupakan kunci utama untuk keberhasilan transformasi. Beberapa faktor yang mempengaruhi efisiensi transformasi yang dimediasi oleh *A. tumefaciens* adalah tipe Ti-plasmid, strain bakteri dengan kisaran inang yang luas, kondisi kultur sebelum dan selama inokulasi, proses transfer aktivasi T-DNA secara eksogen dengan penambahan asetosiringon. Efisiensi transformasi yang didapatkan dari Asemandi, yaitu 1,05% dengan rata-rata 16 tanaman/lini (Tabel 1). Pada tanaman kontrol, yaitu T309 efisiensi transformasi yang dihasilkan 3,7% dengan rata-rata tanaman per lini adalah 22 tanaman. Pada penelitian ini, efisiensi transformasi genetik tanaman

Tabel 1. Efisiensi transformasi dari dua kultivar padi dengan vektor penanda aktivasi.

Kultivar padi	Kalus yang dikokultivasi (A)	Kalus Hyg ^R	Kalus dengan bintik hijau	Kalus yang beregenerasi (jumlah lini independen)	Jumlah tanaman (rata-rata tanaman/lini)	Jumlah lini independen Bar ^R , PCR ⁺ (B)	Persentase efisiensi transformasi (B/A) (%)
Asemandi	1618	65	26	20	323 (16)	17 (304)*	1,05
T309	243	17	9	9	199 (22)	9 (199)*	3,7

Hyg^R = tahan higromisin, Bar^R = tahan basta, PCR⁺ = positif PCR. Angka dalam tanda kurung* menunjukkan jumlah tanaman Bar^R, PCR⁺.



Gambar 2. Tahapan regenerasi kalus padi cv. Asemandi yang ditransformasi dengan vektor penanda aktivasi. A = kalus yang tahan pada media seleksi dengan penambahan higromisin 50 mg/l, B = tunas yang muncul di media regenerasi dengan penambahan higromisin 30 mg/l, C = planlet di media perakaran dengan penambahan higromisin 40 mg/l, D = populasi tanaman padi transgenik ditanam dalam pot di rumah kaca.

padi T309 yang termasuk kelompok padi japonica temperate lebih tinggi daripada hasil penelitian Hiei dan Komari (2008), yaitu sebesar 0,2-0,9%. Perbedaan efisiensi transformasi tersebut disebabkan adanya perbedaan metode transformasi, media kultur, strain bakteri, dan vektor. Menurut Hiei dan Komari (2008), kombinasi antara vektor dan strain dapat berpengaruh pada efisiensi transformasi, demikian juga dengan pemilihan metode transformasi yang didasarkan pada genotipe. Pada Asemandi yang termasuk kelompok padi japonica tropis, efisiensi transformasi yang didapatkan lebih rendah (1,24%), apabila dibandingkan dengan hasil penelitian Rachmawati dan Anzai (2004), yang mendapatkan efisiensi transformasi sebesar 23% dengan menggunakan kultivar Rojolele. Perbedaan efisiensi transformasi tersebut disebabkan adanya perbedaan strain dan vektor, media kultur, dan genotipe yang digunakan. Penelitian yang dilakukan oleh Rachmawati dan Anzai (2004) menekankan pada pentingnya kondisi kultur jaringan untuk efisiensi transformasi. Menurut Birch (1997) dan Hiei *et al.* (1994), beberapa faktor yang mempengaruhi perbedaan efisiensi transformasi tergantung pada spesies, genotipe, kompetensi jaringan target, sensitivitas genotipe terhadap

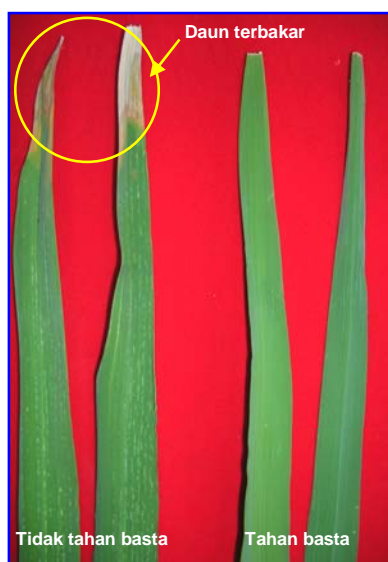
Agrobacterium dan frekuensi regenerasi. Faktor yang sangat mempengaruhi frekuensi transformasi adalah latar belakang genetik tanamannya. Pengaruh genotipik ini dapat diatasi dengan memodifikasi media kultur atau kondisi transformasi, karena seringkali medium kultur yang baik untuk satu genotipe tidak dapat diaplikasikan untuk genotipe lain. Hal ini telah dilakukan oleh Hiei dan Komari (2008) yang menggolongkan protokol transformasi berdasarkan tipe polimorfisme isoenzim. Pada padi golongan japonica, protokol transformasi digolongkan menjadi 3 tipe, masing-masing tipe mempunyai komposisi media dan metode transformasi yang berbeda. Berdasarkan hal tersebut diperlukan upaya untuk meningkatkan efisiensi transformasi dengan memodifikasi sistem transformasi termasuk komposisi media dan metode transformasinya, khususnya untuk padi Asemandi.

Salah satu metode konfirmasi sederhana dan cepat untuk mengetahui integrasi rakitan penanda aktivasi ke genom padi adalah dengan pengecatan/pengolesan daun padi transgenik putatif generasi T₀ dengan herbisida basta pada konsentrasi 200 mg/l (Wang dan Waterhouse 1997). Di samping membawa elemen 4x *enhancer*, konstruk rakitan penanda aktivasi juga

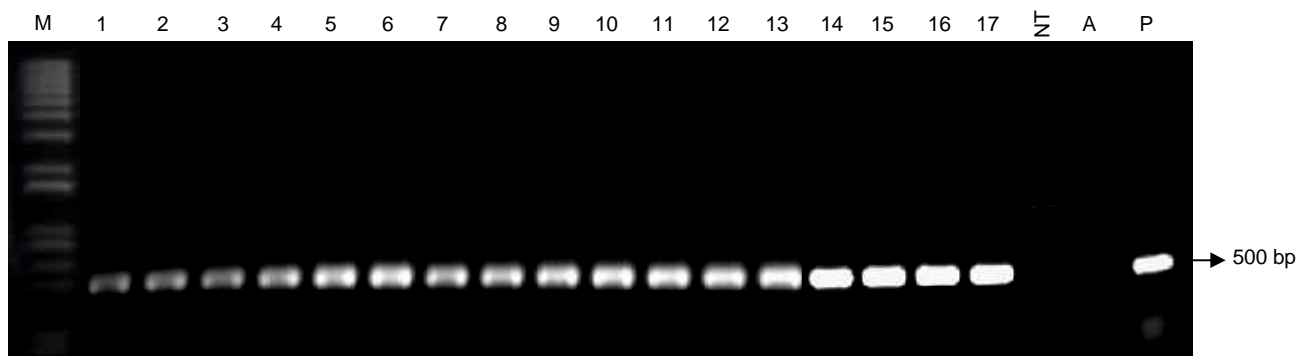
membawa gen seleksi ketahanan terhadap basta. Apabila gen ketahanan tersebut sudah terintegrasi ke dalam genom tanaman padi, maka ketika daun padi transgenik yang mengandung gen tersebut diolesi dengan basta akan memberikan respon ketahanan. Indikasi dari respon ketahanan tanaman yang membawa gen tersebut adalah daun yang diolesi akan tetap berwarna hijau (tahan basta) sedangkan yang tidak membawa gen tersebut daun akan terbakar (Gambar 3). Hasil pengujian menunjukkan bahwa dari dua kultivar yang diuji ternyata persentase jumlah lini independen yang tahan pada pengujian basta terhadap jumlah total lini independen yang diperoleh, yaitu 85% (Asemandi) dan 100% (T309). Tanaman yang positif (tahan terhadap basta) mengindikasikan bahwa gen ketahanan terhadap basta yang terdapat pada elemen Ds telah terintroduksi dan terekspresi pada tanaman transgenik yang diuji. Ternyata tidak semua tanaman

yang telah lolos pada seleksi higromisin mengandung gen ketahanan terhadap basta. Semua lini tanaman yang tahan terhadap basta selanjutnya ditanam di rumah kaca. Morfologi tanaman menunjukkan bahwa tanaman fertil dan dapat menghasilkan biji, walaupun beberapa tanaman menunjukkan hasil biji yang sangat sedikit (4-5 biji/tanaman) (data tidak disajikan). Di samping itu, didapati juga mutan-mutan yang mempunyai morfologi unik, seperti daun menjadi variegata.

Konfirmasi lanjut adanya integrasi dari rakitan penanda aktivasi pada genom padi dilakukan dengan analisis PCR menggunakan primer gen ketahanan terhadap basta (*bar*). Analisis PCR dilakukan pada tanaman Asemandi yang telah positif mengekspresikan ketahanan terhadap basta. Dari tanaman yang diuji, ternyata semuanya menunjukkan hasil yang positif, yaitu semua tanaman mengandung gen ketahanan terhadap basta (Gambar 4). Hal ini diindikasikan dengan



Gambar 3. Hasil pengujian daun tanaman padi putatif transgenik cv. Asemandi dengan pengolesan basta.



Gambar 4. Hasil pengujian analisis PCR daun tanaman padi putatif transgenik cv. Asemandi menggunakan primer gen *bar*. 1-17 = sampel tanaman yang diuji, T = non transgenik, A = air, P = pAc-DsATag-Bar-gosGFP.

adanya pita DNA yang berukuran 500 bp yang merupakan produk amplifikasi dari gen *bar*. Gen ini terdapat pada elemen Ac pada T-DNA yang diintroduksi. Berdasar hal tersebut dapat disimpulkan bahwa penggunaan metode pengecatan/pengolesan daun padi dengan herbisida basta memberikan hasil yang sama dengan analisis PCR.

KESIMPULAN DAN SARAN

Telah diperoleh 17 lini independen (304 tanaman) padi transgenik japonica tropis lokal Sulawesi cv. Asemendi yang positif mengandung rakitan penanda aktivasi.

Lini-lini starter tersebut akan dikembangkan lebih lanjut dengan *selfing* beberapa generasi untuk mendapatkan lini-lini mutan penanda aktivasi yang stabil.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Sdr. Heri Hersusatio dan Nuryati atas bantuan teknis selama penelitian. Penelitian ini merupakan sebagian dari penelitian Proyek Bioteknologi Pertanian yang dibiayai APBN 2006, nomor kode DIPA 320.0/018-09.0/XII/2006, BB-Biogen, Badan Litbang Pertanian, Departemen Pertanian RI.

DAFTAR PUSTAKA

- Aharoni, A., S. Dixit, R. Jetter, E. Thoenes, G. Van Arkel, and A. Pereira. 2004. The SHINE clade of AP2 domain transcription factors activates wax biosynthesis, alters cuticle properties, and confers drought tolerance when overexpressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16(9):2463-2480.
- Birch, R.G. 1997. Plant transformation: Problem and strategies for practical application. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 48:297-326.
- Bouchez, D. and H. Hofte. 1998. Functional genomic in plants. *Plant Physiol.* 118:725-732.
- Chu, C.C., C.S. Wang, C.S. Sun, C. Hsu, K.C. Yin, C.Y. Chu, and F.Y. Bi. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sin.* 18:659-668.
- Enckevort, E.V. 2003. *Agrobacterium* mediated rice transformation at PRI based on the protocol developed by Rice Research Group. Institute of Molecular Plant Sciences, Leiden University.
- Gamborg, O.L. and J.P. Shyluk. 1981. Nutrition, media and characteristic of plant cell and tissue culture. *In* Thorpe T.A. (Ed). *Plant Tissue Culture Methods and Application in Agriculture*. Academic Press. p. 21.
- 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* transpositions in rice regenerated by an adjacent strong enhancer. *Plant Mol. Biol.* 46:215-227.
- Hiei, Y., S. Ohta, T. Komari, and T. Komashiro. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of T-DNA. *Plant J.* 6:271-282.
- Hiei, Y. and T. Komari. 2006. Improved protocols for transformation of indica rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 85:271-83.
- Hiei, Y. and T. Komari. 2008. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed. *Nature Protocol* 3(5):824-834.
- Hirochika, H., E. Guiderdoni, G. An, Y. Hsing, M.Y. Eun, C. Han, N. Upadhyaya, S. Ramachandran, Q. Zhang, A. Pereira, V. Sundaresan and H. Leung. 2004. Rice mutant resources for gene discovery. *Plant Mol. Biol.* 54:325-334.
- Lee, S., J.S. Jeon, K.H. Jung, and G. An. 1999. Binary vectors for efficient transformation of rice. *J. Plant Biol.* 42:310-316.
- Lin, Y.J. and Q. Zhang. 2005. Optimising the tissue culture conditions for high efficiency transformation of indica rice. *In* Saha, P., Majumder, I. Dutta, T. Ray, S.C. Roy, and S. Das (Eds.). *Transgenic Rice Expressing Allium sativum* Leaf Lectin with Enhanced Resistance Against Sap-sucking Insect Pest. *Planta* DOI 10. 1007/s00425-005-0182-z.
- Linsmaier, E.M. and F. Skoog. 1965. Organic growth factor requirement of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 18:100-127.
- Marsch-Martinez, N., R. Greco, G. van Arkel, L. Herrera-Estrella, and A. Pereira. 2002. Activation tagging using the En-I maize transposon system in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 129:1544-1556.
- Ohira, K., K. Ojima, and A. Fujiwara. 1973. Studies on the nutrition of rice cell culture I. A simple, defined medium for rapid growth in suspension culture. *Plant Cell Physiol.* 14:1113-1121.
- Rachmawati, D. and H. Anzai. 2004. Studies on callus induction, plant regeneration and transformation of javanica rice cultivar. *Plant Biotechnol.* 23:521-524.
- Roy, M., R.K. Jain, J.S. Rohila, and R. Wu. 2000. Production of agronomically superior transgenic rice plants using *Agrobacterium* transformation methods: Present status and future perspectives. *Curr. Sci.* 79(7):954-960.
- Shure, M., S. Wessler, and N. Fedoroff. 1983. Molecular identification and isolation of the waxy locus in maize. *Cell* 35:225-233.

Tani, H., X. Chen, P. Nurmberg, J.J. Grant, M.S. Maria, A. Chini, E. Gilroy, P.R.J. Birch, and G.J. Loake. 2004. Activation tagging in plants: A tool for gene discovery. *Funt. Integr. Genomic* 4:258-266.

Trijatmiko, K.R., G.V. Arkel, A. Karaba, E.V. Enckevort, and A. Pereira. 2005. Activation tagging using *En-1* and *Ac-Ds* maize transposon systems in rice. *In* Trijatmiko, K.R. (Ed.). *Comparative Analysis of Drought Resistance Genes in Arabidopsis and Rice*. Ph.D. Thesis Wageningen University, Wageningen. p. 111-128.

Wang, M.B. and P.M. Waterhouse. 1997. A rapid and simple method of assaying plants transformed with hygromycin or PPT resistance genes. *Plant Mol. Biol. Rep.* 15:209-215.

Zhu, Z. and R. Wu. 2008. Regeneration of transgenic rice plants using high salt for selection without the need for antibiotics or herbicides. *Plant Sci.* 174:519-523.
