

Evaluasi Sifat Daya Tembus Akar dan Identifikasi Mutan Stabil pada Populasi Penanda Aktivasi (Evaluation of Root Penetration Ability and Identification of Stable Mutants in an Activation Tag Rice Population)

Ma'sumah*, Tri J. Santoso, dan Kurniawan R. Trijatmiko

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

Diajukan: 18 desember 2015; Direvisi: 12 Februari 2016; Diterima: 20 April 2016

ABSTRACT

Drought stress is one of the important limiting factors in increasing rice production in Indonesia. Development of rice varieties with increased tolerance to drought is needed to meet the rice production challenge. Some transgenic Nipponbare rice lines that carry activation tag have been generated from the previous study. The purpose of this study was to evaluate the root penetration ability and the stability of *Ds* element in the T_1 generation of activation tag rice lines. Materials used in the study were T_1 seeds of 47 transgenic lines, drought tolerant check varieties (Cabacu and IRAT112), and sensitive check varieties (IR64 and wild type Nipponbare). T_1 seeds were prescreened by germination in Basta herbicide solution to eliminate T_1 individuals that did not carry activation tag element. Root penetration ability was evaluated using wax-petrolatum layers as a proxy for compacted soil layers. The presence of *bar* gene and the absence of *hpt* gene as detected by PCR were used to identify T_1 stable mutants. Out of 47 transgenic lines tested, 38 lines showed better root penetration ability than non transformed Nipponbare. PCR analysis identified four stable mutants, namely M-Nip-12.12, M-Nip-19.8, M-Nip-19.9, and M-Nip-20.13. One stable mutant, M-Nip-20.13, showed better root penetration ability than tolerant check varieties. This mutant is a good candidate for isolation of drought tolerance gene.

Keywords: Rice, transposon mutagenesis, activation tagging, drought tolerance.

ABSTRAK

Cekaman kekeringan merupakan salah satu faktor pembatas penting dalam peningkatan produksi padi di Indonesia. Perakitan varietas unggul padi toleran kekeringan diperlukan untuk menjawab tantangan tersebut. Beberapa galur padi Nipponbare transgenik yang membawa penanda aktivasi telah dihasilkan pada penelitian sebelumnya. Tujuan penelitian ini adalah mengevaluasi daya tembus akar dan stabilitas elemen *Ds* pada galur-galur penanda aktivasi generasi T_1 . Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah benih T_1 47 galur transgenik, varietas cek toleran kekeringan (Cabacu dan IRAT112), dan varietas cek peka (IR64 dan Nipponbare tipe liar). Benih T_1 ditapis terlebih dahulu dengan perkecambahan pada larutan herbisida Basta untuk mengeliminasi individu yang tidak membawa elemen penanda aktivasi. Daya tembus akar dievaluasi menggunakan lapisan lilin sebagai tiruan lapisan tanah yang padat dan keras (*hardpans*). Keberadaan gen *bar* dan ketiadaan gen *hpt* yang dideteksi dengan PCR digunakan untuk mengidentifikasi mutan-mutan stabil. Dari 47 galur yang diuji, 38 galur menunjukkan daya tembus akar yang lebih baik daripada Nipponbare non transforman. Analisis PCR mengidentifikasi empat mutan stabil, yaitu M-Nip-12.12, M-Nip-19.8, M-Nip-19.9, dan M-Nip-20.13. Satu mutan stabil, M-Nip-20.13, menunjukkan daya tembus akar yang lebih baik daripada varietas cek toleran. Mutan ini menjadi kandidat yang baik untuk isolasi gen toleran kekeringan.

Kata kunci: Padi, mutagenesis transposon, penanda aktivasi, toleransi kekeringan.

PENDAHULUAN

Kekeringan merupakan salah satu dampak perubahan iklim dan kendala utama produksi padi. Kekeringan berpengaruh terhadap stabilitas hasil tanaman padi (Babu *et al.*, 1996). Oleh karena itu, perbaikan genetik untuk mendapatkan varietas unggul yang adaptif terhadap kondisi cekaman kekeringan menjadi prioritas penting dalam program pemuliaan padi. Salah satu upaya untuk memperoleh tanaman padi toleran kekeringan dapat dilakukan dengan pendekatan mutasi, baik mutasi secara kimiawi, fisik, maupun biologis. Dengan pendekatan teknik mutasi ini diharapkan diperoleh tanaman yang mengalami perubahan genetik dan adaptif terhadap kekeringan.

Prediksi gen menggunakan berbagai aplikasi bioinformatika pada sekuen genom padi menunjukkan bahwa padi memiliki sekitar 39.000 gen (IRGSP, 2005). Namun, peranan biologis sebagian besar gen tersebut belum diketahui sehingga penelitian spesifik untuk menyingkap fungsinya perlu dilakukan agar dapat dimanfaatkan dalam program pemuliaan tanaman. Penghilangan fungsi gen melalui penyisipan mutagen biologis, seperti T-DNA atau transposon, ke dalam sekuen gen biasanya digunakan untuk menunjukkan fungsi gen tersebut. Akan tetapi, sebagian besar mutan *knock out* hasil penyisipan gen tidak menunjukkan perubahan fenotipe (Bouche´ dan Bouchez, 2001), kemungkinan karena fungsi yang hilang dari gen yang disisipi tersebut digantikan oleh gen-gen lain yang memiliki fungsi yang sama. Teknik penandaan aktivasi, yaitu penempatan elemen *enhancer* kuat di dekat sebuah gen yang menyebabkan gen tersebut teraktivasi (ekspresinya meningkat), memiliki kelebihan dibanding dengan penghilangan fungsi gen karena aktivasi sebuah gen biasanya menunjukkan perubahan fenotipe, meskipun terdapat gen-gen lain yang memiliki fungsi yang sama.

Sebagian besar koleksi mutan penanda aktivasi pada padi dihasilkan menggunakan T-DNA *Agrobacterium tumefaciens* (Hsing *et al.*, 2007; Jeong *et al.*, 2002). Salah satu kelemahan utama penandaan aktivasi menggunakan T-DNA adalah terbentuknya pola integrasi kompleks dan perubahan struktur kromosom di dekat situs penyisipan (Nacry *et al.*, 1998). Penggunaan sisipan transposon stabil tunggal sebagai penanda aktivasi dapat mengatasi masalah ini.

Sistem penanda aktivasi berbasis transposon yang digunakan dalam penelitian ini mengandung dua komponen, yaitu *activator* (*Ac*) dan *dissociation* (*Ds*). Elemen *Ac* mengode enzim transposase di

bawah kendali promotor *Ac* yang disambungkan dengan gen *green fluorescent protein* (*gfp*) di bawah kendali promotor *Gos*. Komponen kedua, yaitu elemen *Ds*, membawa elemen $4\times$ *enhancer* dari promotor CaMV 35S dan gen *bialaphos resistance* (*bar*) di bawah kendali promotor *ubiquitin*. Setelah terintegrasi ke dalam genom padi, elemen *enhancer* ini akan meningkatkan ekspresi gen-gen di dekatnya yang menghasilkan fenotipe *gain of function* (Tani *et al.*, 2004).

Sistem dua komponen ini menguntungkan karena dari satu tanaman *starter* yang mengandung elemen *Ac* yang aktif dapat dihasilkan sejumlah besar individu keturunan yang masing-masing memiliki lokasi sisipan elemen *Ds* yang berbeda sehingga hanya sedikit tanaman transforman yang perlu dihasilkan, tidak seperti mutagenesis T-DNA yang memerlukan produksi ribuan transforman (Marsch-Martinez *et al.*, 2002). Selain itu, melalui segregasi dapat dihasilkan tanaman mutan stabil yang memiliki sisipan *Ds*, tetapi tidak lagi memiliki elemen *Ac*.

Pada penelitian sebelumnya, telah dihasilkan tanaman padi transgenik T_1 kultivar Asemendi, T309, dan Nipponbare yang mengandung vektor penanda aktivasi berbasis *transposon* (Sisharmini *et al.*, 2009). Populasi tanaman transgenik T_1 ini menunjukkan keragaman fenotipe yang luas yang mungkin disebabkan oleh insersi elemen penanda aktivasi. Populasi transgenik telah dibuktikan positif mengandung konstruk penanda aktivasi, namun belum diketahui karakter unggul yang dihasilkan sebagai akibat dari sisipan elemen penanda aktivasi tersebut. Dengan demikian, galur padi transgenik tersebut perlu ditapis untuk memperoleh tanaman yang mempunyai karakter yang diinginkan, salah satunya adaptif terhadap kekeringan.

Pendekatan skrining yang dilakukan adalah dengan melakukan uji fenotipe akar padi transgenik terkait sifat toleransi kekeringan. Mekanisme sifat perakaran dalam hubungannya dengan karakter tersebut dikemukakan oleh O'Toole (Mackill *et al.*, 1996). Perakaran yang panjang, padat, dan daya tembus yang tinggi merupakan parameter dalam menentukan toleransi padi terhadap kekeringan (Ekayanake *et al.*, 1986; Mackill *et al.*, 1996; Suardi *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 1995). Selain itu, dilakukan juga analisis molekuler untuk mengetahui keberadaan gen *hpt* dan gen *bar*. Keberadaan gen *bar* dijadikan indikasi keberadaan elemen *enhancer* yang letaknya pada T-DNA berdampingan dengan gen *bar* dan keduanya diapit oleh elemen *Ds*, sedangkan keberadaan gen *hpt* dijadikan indikasi keberadaan elemen *Ac* karena letak *hpt* dan elemen *Ac* pada T-DNA berada di luar elemen *Ds*.

Tanaman padi transgenik penanda aktivasi yang mengandung gen *bar*, namun tidak mengandung gen *hpt* dianggap mengandung sisipan elemen *enhancer* yang tidak berpindah lagi (stabil). Tujuan penelitian ini adalah mengevaluasi daya tembus akar dan stabilitas elemen *Ds* pada galur-galur penanda aktivasi generasi T₁.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai dengan Mei 2009 di Rumah Kaca dan Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (BB Biogen).

Materi Genetik

Materi genetik yang digunakan untuk evaluasi sifat daya tembus akar, yaitu sebanyak 47 galur (114 tanaman) padi transgenik penanda aktivasi kultivar Nipponbare generasi T₁ hasil insersi transposon *Ac/Ds*, dua varietas cek toleran kekeringan (Cabacu dan IRAT 112), dan dua varietas cek peka kekeringan (IR64 dan Nipponbare tipe liar/non transforman). Seluruh tanaman yang tumbuh dalam setiap galur diamati. Daftar galur yang digunakan disajikan pada Tabel 1.

Identifikasi Galur Padi Transgenik melalui Uji Daya Kecambah Menggunakan Herbisida Basta

Uji toleransi kecambah terhadap herbisida Basta dilakukan menggunakan metode Wang dan Waterhouse (1997). Perendaman benih dalam larutan herbisida Basta merupakan evaluasi dini untuk mengetahui apakah benih yang digunakan transgenik atau bukan. Benih tanaman transgenik akan mampu berkecambah di dalam larutan herbisida Basta karena mengandung gen *bar* (Gambar 1), sebaliknya untuk benih non transgenik (Kolesnik *et al.*, 2004).

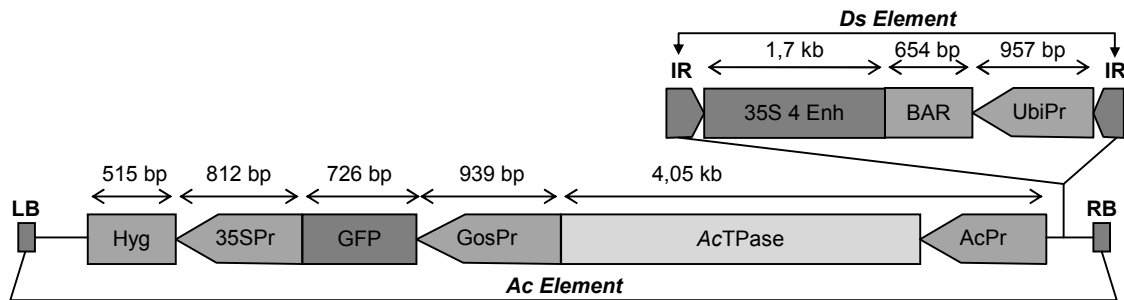
Sebanyak lima butir benih dari setiap galur padi transgenik penanda aktivasi cv. Nipponbare, varietas cek toleran, dan cek peka kekeringan dioven selama tiga hari pada suhu 50°C, kemudian dikecambahkan pada cawan petri yang diberi alas kertas saring dan direndam dalam larutan herbisida Basta sebanyak 15 ml dengan konsentrasi 200 mg/l (Wang dan Waterhouse, 1997). Setelah satu minggu, benih yang berkecambah dalam larutan Basta dipindahkan ke cawan petri baru yang diisi dengan akuades. Kecambah berumur satu minggu pada cawan petri dipindahkan ke pot plastik berisi media tanah yang telah diberi lapisan lilin pada bagian bawahnya untuk uji kemampuan daya tembus akar.

Uji Karakterisasi Akar Padi Transgenik T₁

Uji daya tembus akar tanaman transgenik T₁ pada lapisan lilin dilakukan dengan menggunakan metode Yu *et al.* (1995) yang bertujuan mengetahui

Tabel 1. Toleransi kecambah padi penanda aktivasi cv. Nipponbare terhadap larutan herbisida Basta.

Galur	Jumlah benih uji	Jumlah benih berkecambah	Galur	Jumlah benih uji	Jumlah benih berkecambah
M-Nip-6.1	5	2	M-Nip-24.9	5	2
M-Nip-6.4	5	2	M-Nip-26.2	5	1
M-Nip-7.1	5	1	M-Nip-26.14	5	3
M-Nip-8.5	5	3	M-Nip-28.13	5	4
M-Nip-8.6	5	1	M-Nip-23.14	5	3
M-Nip-10.5	5	3	M-Nip-30.11	5	2
M-Nip-10.19	5	3	M-Nip-31.2	5	2
M-Nip-11.8	5	2	M-Nip-31.5	5	4
M-Nip-12.12	5	2	M-Nip-33.1	5	1
M-Nip-13.17	5	3	M-Nip-33.2	5	2
M-Nip-15.13a	5	4	M-Nip-33.3	5	3
M-Nip-18.3	5	1	M-Nip-33.5	5	3
M-Nip-19.5	5	4	M-Nip-37.5	5	3
M-Nip-19.8	5	2	M-Nip-40.1	5	2
M-Nip-19.9	5	3	M-Nip-41.20	5	2
M-Nip-20.4	5	2	M-Nip-45.1	5	1
M-Nip-20.5	5	3	M-Nip-46.7	5	4
M-Nip-20.13	5	2	M-Nip-50.1	5	2
M-Nip-20.61	5	3	M-Nip-51.13	5	3
M-Nip-21.37	5	1	M-Nip-54.5	5	3
M-Nip-21.40	5	3	M-Nip-54.6	5	3
M-Nip-21.41	5	2	M-Nip-55.14	5	2
M-Nip-24.4	5	2	Nipponbare	5	0
M-Nip-24.5	5	3	Cabacu	5	0
M-Nip-24.8	5	2	IRAT 112	5	0



Gambar 1. Posisi elemen Ac dan elemen Ds dalam plasmid (Trijatmiko *et al.*, 2005).

potensi kemampuan akar tanaman transgenik menembus lapisan keras. Lapisan keras ini disimulasi dari campuran parafin (60%) dan vaselin (40%) yang setara dengan kekerasan 12 bar (Mackill *et al.*, 1996).

Penelitian uji daya tembus akar ini dilakukan dengan menggunakan gelas plastik dengan tinggi 12 cm, diameter atas 8 cm, dan diameter bawah 5 cm. Setiap gelas plastik diisi dengan media tanah dan ditanami satu tanaman. Jumlah tanaman yang diuji sebanyak 114 tanaman dari 47 galur padi penanda aktivasi. Pada bagian bawah gelas plastik dengan lapisan lilin, diletakkan gelas plastik lain yang berukuran 250 ml berisi akuades. Setelah satu minggu, gelas plastik yang berisi akuades diganti dengan larutan hara Yoshida sebanyak 200 ml. Komposisi larutan hara Yoshida dibuat seperti dalam Yoshida *et al.* (1976). Pemeliharaan tanaman dilakukan dengan penyiraman akuades sebanyak 200 ml setiap dua hari sekali sampai akar tanaman dapat menembus lapisan lilin dan terendam dalam larutan hara Yoshida. Pengamatan daya tembus akar dimulai satu minggu setelah gelas plastik terendam dalam larutan hara Yoshida. Pengamatan dilakukan terhadap jumlah akar yang mampu menembus lapisan lilin, diameter akar, dan panjang akar yang mampu menembus lapisan lilin. Pembongkaran tanaman dilakukan pada saat tanaman berumur 45 hari setelah tanam.

Kestabilan Posisi Elemen Ds pada Padi Transgenik Penanda Aktivasi

Menurut Sallaud *et al.* (2004), tanaman padi mutan penanda aktivasi dikatakan stabil apabila hanya mengandung elemen Ds dan tidak mengandung elemen Ac. Apabila masih mengandung elemen Ac, enzim transposase masih dihasilkan sehingga elemen Ds dapat berpindah dari posisi asalnya dalam genom (Sallaud *et al.*, 2004).

Untuk menganalisis kestabilan galur-galur padi mutan penanda aktivasi, dilakukan deteksi gen *hpt* dan *bar* dengan PCR. Keberadaan gen *hpt* (pada elemen Ac dari konstruk penanda aktivasi) dalam genom tanaman padi mutan dideteksi dengan meng-

gunakan primer spesifik untuk gen marka seleksi *hpt*, sedangkan keberadaan gen *bar* (pada elemen Ds dari konstruk penanda aktivasi) dideteksi menggunakan primer spesifik gen *bar* (Gambar 1). Sekuen nukleotida primer yang digunakan adalah *hpt-forward* 5' GCATCTCCC GCCGTGCAC 3' dan *hpt-reverse* 5' GATGCCTCCGCTCGAAG-TAGCG 3'; *bar-forward* 5' ACCATGAGCCCAGAACGACGC 3' dan *bar-reverse* 5' CAGGCTGAAGTCCAG CTGCCAG 3'.

DNA genomik 47 galur transgenik penanda aktivasi diisolasi menggunakan metode Dellaporta *et al.* (1983) yang telah dimodifikasi. DNA kemudian digunakan sebagai cetakan untuk analisis keberadaan gen *hpt* dan *bar*. Deteksi gen *hpt* dilakukan dengan metode Apriana *et al.* (2011), sedangkan deteksi gen *bar* dilakukan dengan metode Sisharmini *et al.* (2009). Komposisi komponen PCR untuk reaksi volume 20 μ l adalah: 2,0 μ l bufer PCR 10 \times (Tris HCl 100 mM, KCl 500 mM [pH 8,3]), 1,2 μ l MgCl₂ 50 mM, 0,4 μ l dNTP *mix* 10 mM, 1 μ l setiap primer (10 μ M), 1 unit Taq DNA polimerase (5 unit/ μ l), dan 2 μ l DNA cetakan. Program PCR yang digunakan, yaitu denaturasi awal selama 5 menit pada suhu 94°C, dilanjutkan dengan 34 kali siklus yang terdiri atas proses denaturasi selama 25 detik pada suhu 94°C, proses penempelan (*annealing*) selama 30 detik pada suhu 60°C, dan proses pemanjangan (*extension*) selama 30 detik pada suhu 72°C. Proses pemanjangan DNA terakhir dilakukan selama 7 menit pada suhu 72°C. Hasil amplifikasi PCR kemudian diseparasi dengan elektroforesis pada gel agarosa 2% dan divisualisasi menggunakan paparan sinar UV serta didokumentasikan dengan ChemiDoc™ EQ System (Bio-Rad).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi Galur Padi Transgenik melalui Uji Daya Kecambah Menggunakan Herbisida Basta

Dari pengujian perkecambahan pada larutan herbisida Basta, semua benih tanaman kontrol (Cabacu, IRAT112, dan Nipponbare non transforman)

tidak ada yang mampu berkecambah. Benih yang digunakan dalam pengujian ini hanya lima butir per galur karena terbatasnya jumlah benih. Pada 47 galur padi transgenik, jumlah benih yang berkecambah berkisar antara 1–4 (Tabel 1). Hasil ini sesuai dengan yang diharapkan karena semua tanaman kontrol tidak mengandung gen *bar*, namun ditemukan progeni peka dan toleran pada setiap galur transgenik akibat segregasi gen *bar* dari tanaman tetua *hemyzigous* (satu kopi). Variasi jumlah progeni toleran disebabkan oleh jumlah sampel yang kecil (lima butir) dan dipengaruhi oleh jumlah salinan gen *bar* pada tanaman tetua.

Karakterisasi Akar Padi Transgenik T₁

Hasil pengamatan daya tembus akar menunjukkan bahwa tanaman kontrol peka, yaitu IR64 dan Nipponbare, tidak mampu menembus lapisan lilin, sedangkan tanaman kontrol toleran, yaitu varietas Cabacu dan IRAT112, mampu menembusnya, dengan jumlah akar yang menembus lapisan lilin masing-masing adalah 11 dan 15,5 (Tabel 2). Dari 47 tanaman Nipponbare mutan penanda aktivasi yang diuji, sembilan tanaman menunjukkan respons yang sama dengan tanaman Nipponbare non transforman, yaitu tidak mampu menembus lapisan lilin, sedangkan 38 tanaman mampu menembusnya dengan jumlah akar yang menembus lapisan lilin berkisar

antara 1–21 (Tabel 2). Perbaikan sifat daya tembus akar pada tanaman mutan ini mungkin disebabkan oleh penyisipan fragmen penanda aktivasi yang mengandung elemen *enhancer* melalui aktivasi gen-gen terkait karakter ini yang terletak di dekat fragmen penanda aktivasi.

Tanaman kontrol toleran yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu varietas Cabacu dan IRAT112, merupakan padi gogo yang memiliki akar yang panjang, sedangkan tanaman Nipponbare non transforman merupakan padi sawah yang memiliki akar yang pendek. Meskipun daya tembus akar 38 tanaman mutan lebih baik daripada Nipponbare non transforman, panjang akarnya yang menembus lapisan lilin lebih pendek daripada Cabacu dan IRAT112 (Tabel 2). Demikian juga, variabel diameter akar tampaknya tidak berhubungan dengan daya tembus akar pada populasi tanaman mutan. Hal ini menunjukkan bahwa faktor-faktor selain panjang dan ketebalan akar bertanggung jawab terhadap perbaikan daya tembus akar yang terjadi pada tanaman mutan penanda aktivasi. Dari 38 tanaman mutan yang memiliki daya tembus akar lebih baik daripada Nipponbare, enam mutan, yaitu M-Nip-11.8, M-Nip-13.5, M-Nip-20.5, M-Nip-20.13, M-Nip-21.41, dan M-Nip-33.5, memiliki daya tembus akar yang lebih baik daripada Cabacu dan IRAT112.

Tabel 2. Karakter akar galur transgenik padi penanda aktivasi cv. Nipponbare.

Galur	Jumlah akar yang mampu menembus lapisan lilin	Panjang akar yang menembus lapisan lilin (cm)	Diameter akar (cm)	Galur	Jumlah akar yang mampu menembus lapisan lilin	Panjang akar yang menembus lapisan lilin (cm)	Diameter akar (cm)
M-Nip-6.1	13	2,2	0,9	M-Nip-26.2	6	2,5	0,7
M-Nip-6.4	3	9,0	0,8	M-Nip-26.14	0	0,0	0,8
M-Nip-7.1	8	11,5	0,9	M-Nip-28.13	8	7,5	0,8
M-Nip-8.5	6	5,5	0,8	M-Nip-23.14	8	10,0	0,8
M-Nip-8.6	14	10,0	0,8	M-Nip-30.11	5	2,0	0,7
M-Nip-10.5	11	14,0	0,8	M-Nip-31.2	0	0,0	0,8
M-Nip-10.19	12	10,0	0,8	M-Nip-31.5	3	10,0	0,8
M-Nip-11.8	18	6,5	0,9	M-Nip-33.1	0	0,0	0,7
M-Nip-12.12	7	6,5	0,9	M-Nip-33.2	1	10,5	0,8
M-Nip-13.17	9	4,5	0,8	M-Nip-33.3	14	8,5	0,7
M-Nip-15.13a	0	0,0	0,9	M-Nip-33.5	19	7,0	0,7
M-Nip-18.3	8	11,5	0,9	M-Nip-37.5	4	5,5	0,7
M-Nip-19.5	17	12,0	0,8	M-Nip-40.1	0	0,0	0,7
M-Nip-19.8	0	0,0	0,9	M-Nip-41.20	14	10,0	0,8
M-Nip-19.9	4	3,5	0,7	M-Nip-45.1	5	2,5	0,7
M-Nip-20.4	11	9,5	0,8	M-Nip-46.7	6	2,0	0,7
M-Nip-20.5	17	14,0	0,8	M-Nip-50.1	12	13,0	1,0
M-Nip-20.13	21	6,0	1,0	M-Nip-51.13	14	13,5	1,0
M-Nip-20.61	11	4,5	0,9	M-Nip-54.5	11	1,0	0,8
M-Nip-21.37	3	5,0	0,6	M-Nip-54.6	0	0,0	0,9
M-Nip-21.40	0	0,0	0,9	M-Nip-55.14	7	8,8	0,9
M-Nip-21.41	17	15,0	1,0	Nipponbare	0	0,0	0,8
M-Nip-24.4	0	0,0	0,7	Cabacu	11	25,0	1,0
M-Nip-24.5	10	9,0	0,8	IRAT112	15,5	28,0	1,0
M-Nip-24.8	1	4,5	0,7	IR64	0	0,0	0,8
M-Nip-24.9	11	7,5	0,8				

Kestabilan Posisi Elemen *Ds* dalam Padi Transgenik Penanda Aktivasi

Dari hasil amplifikasi PCR 47 galur padi transgenik penanda aktivasi yang diuji menggunakan primer spesifik gen *hpt* dan *bar*, diperoleh data yang menunjukkan galur padi transgenik penanda aktivasi yang telah stabil (Tabel 3). Keberadaan gen *hpt* pada sampel tanaman mutan ditunjukkan dengan adanya pita DNA sesuai dengan kontrol plasmid yang mengandung gen tersebut (Gambar 2). Dari amplifikasi PCR menggunakan primer *hpt*, didapatkan delapan galur padi transgenik penanda aktivasi cv. Nipponbare yang tidak mengandung gen *hpt* (Tabel 3). Pada T-DNA dari plasmid yang digunakan untuk transformasi, gen *hpt* dan elemen *Ac* terletak di luar

elemen *Ds* (Gambar 1). Ketiadaan gen *hpt* pada satu sampel menjadi indikasi ketiadaan elemen *Ac*. Mutasi sisipan elemen *Ds* bersifat stabil pada tanaman yang tidak mengandung elemen *Ac* karena enzim produknya diperlukan untuk transposisi elemen *Ds* ke lokasi baru dalam genom.

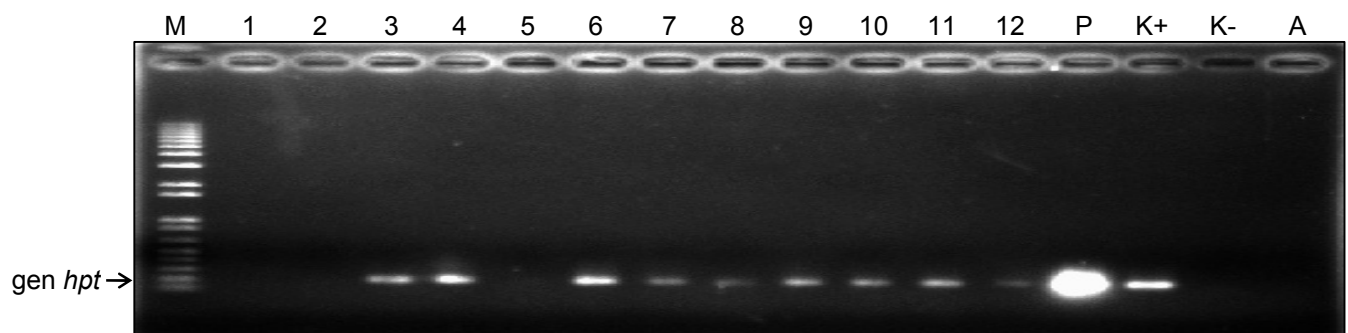
Dari hasil amplifikasi PCR menggunakan primer *bar*, diperoleh 38 galur padi mutan yang mengandung gen *bar* (Tabel 3, Gambar 3). Terdapatnya tanaman yang mengandung gen *bar* mengindikasikan bahwa galur padi mutan tersebut masih mengandung elemen *Ds* karena gen *bar* berada dalam satu elemen dengan transposon *Ds*.

Dari amplifikasi PCR menggunakan primer *hpt* dan *bar*, didapatkan empat galur padi mutan yang

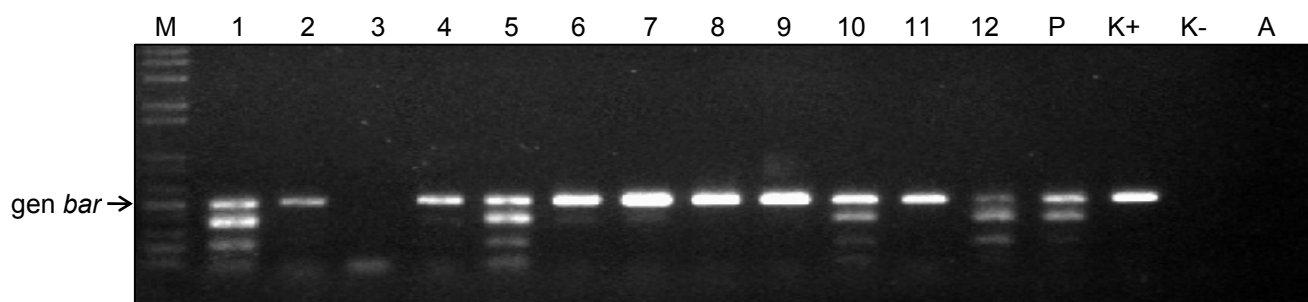
Tabel 3. Hasil amplifikasi PCR galu-galur transgenik padi mutan penanda aktivasi cv. Nipponbare menggunakan primer gen *hpt* dan *bar*.

Galur transgenik	Primer <i>hpt</i>	Primer <i>bar</i>	Keterangan	Galur transgenik	Primer <i>hpt</i>	Primer <i>bar</i>	Keterangan
M-Nip-6.1	+	+	TS	M-Nip-24.8	-	-	BM
M-Nip-6.4	+	+	TS	M-Nip-24.9	+	+	TS
M-Nip-7.1	+	+	TS	M-Nip-26.2	-	-	BM
M-Nip-8.5	+	+	TS	M-Nip-26.14	+	+	TS
M-Nip-8.6	+	+	TS	M-Nip-28.13	+	+	TS
M-Nip-10.5	+	+	TS	M-Nip-23.14	+	+	TS
M-Nip-10.19	+	+	TS	M-Nip-30.11	+	+	TS
M-Nip-11.8	-	-	BM	M-Nip-31.2	+	+	TS
M-Nip-12.12	-	+	S	M-Nip-31.5	+	+	TS
M-Nip-13.17	+	+	TS	M-Nip-33.1	-	-	BM
M-Nip-15.13a	+	+	TS	M-Nip-33.2	+	+	TS
M-Nip-18.3	+	+	TS	M-Nip-33.3	+	+	TS
M-Nip-19.5	+	+	TS	M-Nip-33.5	+	+	TS
M-Nip-19.8	-	+	S	M-Nip-37.5	-	-	BM
M-Nip-19.9	-	+	S	M-Nip-40.1	+	+	TS
M-Nip-20.4	+	+	TS	M-Nip-41.20	-	-	BM
M-Nip-20.5	+	+	TS	M-Nip-45.1	+	+	TS
M-Nip-20.13	-	+	S	M-Nip-46.7	+	+	TS
M-Nip-20.61	+	+	TS	M-Nip-50.1	+	+	TS
M-Nip-21.37	+	+	TS	M-Nip-51.13	+	+	TS
M-Nip-21.40	+	+	TS	M-Nip-54.5	+	+	TS
M-Nip-21.41	+	+	TS	M-Nip-54.6	+	+	TS
M-Nip-24.4	-	-	BM	M-Nip-55.14	-	-	BM
M-Nip-24.5	-	-	BM				

+ = ada pita, - = tidak ada pita, TS = tidak stabil, S = stabil, BM = bukan mutan.



Gambar 2. Hasil amplifikasi PCR beberapa galur padi mutan penanda aktivasi menggunakan primer *hpt*. M = marker (100 bp DNA ladder), 1 = M-Nip-19.8, 2 = M-Nip-19.9, 3 = M-Nip-20.4, 4 = M-Nip-20.5, 5 = M-Nip-20.13, 6 = M-Nip-20.61, 7 = M-Nip-21.37, 8 = M-Nip-21.37, 9 = M-Nip-21.40, 10 = M-Nip-21.41, 11 = M-Nip-24.4, 12 = M-Nip-24.8, P = pCambia1301-Ac/Ds, K+ = kontrol positif transgenik (Nipponbare-Ac/Ds), K- = kontrol negatif (Nipponbare tipe liar), A = air.



Gambar 3. Hasil amplifikasi PCR beberapa galur padi mutan penanda aktivasi cv. Nipponbare menggunakan primer *bar*. M = marker (100 bp DNA ladder), 1 = M-Nip-10.5, 2 = M-Nip-10.19, 3 = M-Nip-11.8, 4 = M-Nip-12.12, 5 = M-Nip-13.17, 6 = M-Nip-15.13a, 7 = M-Nip-18.3, 8 = M-Nip-19.5, 9 = M-Nip-19.8, 10 = M-Nip-19.9, 11 = M-Nip-20.4, 12 = M-Nip-20.5, P = pCambia1301-Ac/Ds, K+ = kontrol positif transgenik(Nipponbare-Ac/Ds), K- = kontrol negatif transgenik (Nipponbare tipe liar), A = Air.

stabil, yaitu galur M-Nip-12.12, M-Nip-19.8, M-Nip-19.9, dan M-Nip-20.13 (Tabel 3). Galur M-Nip-20.13 merupakan kandidat yang baik untuk isolasi gen toleran kekeringan karena mutan ini telah stabil dan menunjukkan daya tembus akar (jumlah akar 21) yang lebih baik daripada tanaman kontrol toleran (Tabel 2). Teknik-teknik *Flanking Sequence Recovery* seperti TAIL-PCR atau *Inverse PCR* dapat dilakukan untuk mengamplifikasi sekuen genom padi yang mengapit elemen *Ds*. Selanjutnya, analisis bioinformatika dilakukan untuk mengetahui lokasi pada genom padi tempat elemen *Ds* menyisip, demikian juga gen-gen yang letaknya paling dekat dengan lokasi penyisipan elemen *Ds* yang kemungkinan besar bertanggung jawab terhadap perubahan karakter tanaman mutan.

KESIMPULAN

Dari 47 galur padi Nipponbare transgenik penanda aktivasi yang diuji, 38 galur menunjukkan sifat daya tembus akar yang lebih baik daripada tanaman Nipponbare non transforman.

Dari hasil PCR menggunakan primer *hpt* dan *bar*, didapatkan empat galur padi mutan yang stabil, yaitu galur M-Nip-12.12, M-Nip-19.8, M-Nip-19.9, dan M-Nip-20.13.

Galur M-Nip-20.13 merupakan mutan stabil dan menunjukkan daya tembus akar yang lebih baik daripada varietas tanaman kontrol toleran sehingga menjadi kandidat yang baik untuk isolasi gen toleran kekeringan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Dr. Joko Prasetyono atas bimbingan yang telah diberikan selama penulisan makalah. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Bapak Syarif atas bantuannya selama pelaksanaan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Apriana, A., A. Sisharmini, W. Enggarini, Sudarsono, N. Khumaida, dan K.R. Trijatmiko. 2011. Introduksi konstruk over ekspresi kandidat gen *OsWRKY76* melalui *Agrobacterium tumefaciens* pada tanaman padi Nipponbare. *J. AgroBiogen* 7(1):19–27.
- Babu, R.C., H.G. Zheng, M.S. Pathan, M.L. Ni, A. Blund, and H.T. Nguyen. 1996. Molecular mapping of drought resistance traits. In: G.S. Khush, editor, *Rice II. Proceeding of the Third International Rice Genetics Symposium*. IRRI, Los Baños, Philippines. p. 637–642.
- Bouche', N. and D. Bouchez. 2001. *Arabidopsis* gene knockout: Phenotypes wanted. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4:111–117.
- Dellaporta, S.L., J. Wood, and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1(4):19–21.
- Ekayanake, I.J., D.P. Garrity, and J.C. O'Toole. 1986. Influence of deep root density on root pulling resistance in rice. *Crop Sci.* 26:1181–1186.
- Hsing, Y.I., C.G. Chern, M.J. Fan, P.C. Lu, K.T. Chen, S.F. Lo, P.K. Sun, S.L. Ho, K.W. Lee, Y.C. Wang, W.L. Huang, S.S. Ko, S. Chen, J.L. Chen, C.I. Chung, Y.C. Lin, A.L. Hour, Y.W. Wang, Y.C. Chang, M.W. Tsai, Y.S. Lin, Y.C. Chen, H.M. Yen, C.P. Li, C.K. Wey, C.S. Tseng, M.H. Lai, S.C. Huang, L.J. Chen, and S.M. Yu. 2007. A rice gene activation/knockout mutant resource for high throughput functional genomics. *Plant Mol. Biol.* 63(3):351–364.
- IRGSP. 2005. The map-based sequence of the rice genome. *International Rice Genome Sequencing Project. Nature* 436(7052):793–800.
- Jeong, D.H., S. An, H.G. Kang, S. Moon, J.J. Han, S. Park, H.S. Lee, K. An, and G. An. 2002. T-DNA insertional mutagenesis for activation tagging in rice. *Plant Physiol.* 130(4):1636–1644.
- Kolesnik, T., I. Szeverenyi, D. Bachmann, C.S. Kumar, S.Jiang, R. Ramamoorthy, M. Cai, Z.G. Ma, V. Sudaresan, and S. Ramachandran. 2004. Establishing an efficient *Ac/Ds* tagging system in rice: Large scale analysis of *Ds* flanking sequences. *Plant J.* 37:301–314.

- Mackill, D.J., W.R. Coffman, and D.P. Garrity. 1996. Rainfed lowland rice improvement. International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines.
- 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(4):1544–1556.
- Nacry, P., C. Camillieri, B. Courtial, M. Caboche, and D. Bouchez. 1998. Major chromosomal rearrangements induced by T-DNA transformation in *Arabidopsis*. *Genetics* 149:641–650.
- Sallaud, C., C. Gay, P.P. Larmande, M. Bes, P. Piffanelli, B. Piegu, G. Drock, F. Regad, E. Bourgeois, D. Meynard, C. Perin, X. Sabau, A. Ghesquiere, J.C. Glazman, M. Delseny, and E. Guiderdoni. 2004. High throughput T-DNA insertion mutagenesis in rice: A first step toward in silico reverse genetics. *Plant J.* 39:450–464.
- Sisharmini, A., A. Apriana, W. Enggarini, dan K.R. Trijatmiko. 2009. Pengembangan populasi mutan penanda aktivasi: Transformasi padi *japonica* tropis lokal Sulawesi cv. Asemendi dengan bantuan *Agrobacterium tumefaciens*. *J. AgroBiogen* 5(2):49–56.
- Suardi, D. dan B. Abdullah. 2005. Padi liar tetua toleran kekeringan. *Bul. Plasma Nutfah* 9(1):33–38.
- 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. *Funct. Integr. Genomic* 4:258–266.
- Trijatmiko, K.R., G.V. Arkel, A. Karaba, E.V. Enckevort, and A. Pereira. 2005. Comparative analysis of drought resistance genes in *Arabidopsis* and rice. Ph.D. Thesis, Wageningen University, Wageningen.
- 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.
- Yoshida, S. 1976. Fundamentals of rice crop science. International Rice Research Institute. Los Baños, Philippines.
- Yu, I., J.D. Ray, J.C. O'Toole, and H.T. Nguyen. 1995. Use of wax-petrolatum layer for screening rice root penetration. *Crop Sci.* 35:684–687.
-