

Transformasi Padi Japonica (T-309) dan Indica dengan Gen *CryIA(b)*

Ida H. Somantri, A. Dinar Ambarwati, Iswari S. Dewi, Aniversari Apriana, dan Tri J. Santoso

Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian

ABSTRAK

Penelitian telah dilakukan di Laboratorium Rekayasa Genetik, Kelti Biologi Molekuler, Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor, pada tahun anggaran 2002. Penelitian bertujuan untuk mendapatkan tanaman padi hasil transformasi dengan gen *cryIA(b)*. Varietas padi yang digunakan ada-lah Taipei-309 (Japonica) serta Sintanur dan Cisadane (Indica). Transformasi dilakukan dengan teknik bombardmen mikroprojektil menggunakan plasmid *pUBB* yang dikotransformasi dengan plasmid *pRQ6* pada molaritas 4 : 1. Plas-mid *pUBB* membawa gen *cryIA(b)*. Sedangkan *pRQ6* mengandung gen *gus* dan *hph*. Hasil yang telah diperoleh adalah 280 tanaman putatif transgenik dari Taipei-309 yang menggunakan media regenerasi NK4N2 dan 1 tanaman dari Cisadane yang menggunakan media regenerasi MSP. Dalam penelitian ini, Sintanur belum berhasil diinduksi untuk menghasilkan kalus. Sampai saat ini sebagian kalus Taipei-309 dan Cisadane masih berada dalam media regene-rasi. Tanaman transforman pertama (T0) yang telah diaklimatisasi sudah dita-nam di rumah kaca untuk dievaluasi lebih lanjut.

Kata kunci: Transformasi padi, *pUBB*, bombardmen mikroprojektil, *pRQ6*

ABSTRACT

The research was carried out at the Genetic Engineering Laboratory, Molecular Biology Division, IABGRRRI, Bogor, in 2002. The aim of the research was to obtain transgenic rice containing *cryIA(b)* gene. Materials used in this research were Sintanur and Cisadane (Indica) and Taipei-309 (Japonica). The transfor-mation technique was carried out by means of particle bombardment using *pUBB* plasmid that had been co-transformed with *pRQ6* plasmid at 4 : 1 molarity. Plasmid *pUBB* contains *cryIA(b)* gene, while plasmid *pRQ6* contains two genes that are *gus* gene as reporter gene and *hph* gene as selectable marker. 280 plants of putative transgenic rice originated from Taipei-309 could be obtained via NK4N2 regeneration medium, while only one plant of putative transgenic rice originated from Cisadane could be obtained via MSP regeneration medium. This result indicated that NK4N2 and MSP medium could be used as regeneration media. At present, Sintanur could not be induced to produce calli. The remaining calli of Taipei-309 and Cisadane were still on regeneration media. First transformed plants (T0) surviving in the accli-matization phase were moved to a green house for further evaluation.

Key words: Rice transformation, *pUBB*, particle bombardment, *pRQ6*

PENDAHULUAN

Salah satu kendala dalam peningkatan produksi tanaman pangan adalah serangan hama. Hama penggerek batang padi merupakan salah satu hama utama yang menyebabkan kerusakan dan kerugian hasil padi di Indonesia dan beberapa negara di Asia. Kehilangan hasil akibat serangan hama ini berkisar antara 60-90% (Pathak dan Khan, 1994). Di antara 6 spesies hama penggerek batang padi di Indonesia, penggerek batang padi putih (*Scirphophaga innotata* Wlk.) dan penggerek batang padi kuning (*Scirphophaga incertulas* Wlk.) merupakan spesies dominan. Pemakaian insektisida untuk pengendalian hama ini tidak efektif, karena larva langsung masuk ke dalam batang padi segera setelah telur menetas dan terus berkembang melalui beberapa tahapan sampai menjadi pupa.

Penanaman varietas unggul tahan hama merupakan teknologi yang murah, mudah, dan ramah lingkungan. Oleh karena itu, varietas unggul yang tahan terhadap hama penggerek batang padi sangat diperlukan untuk pengendalian hama tersebut. Para peneliti di India dan IRRI menduga bahwa beberapa jenis padi liar mempunyai ketahanan terhadap penggerek padi kuning (Heinrich, 1980). Hasil penelitian di Indonesia sendiri menunjukkan bahwa sifat ketahanan tersebut ternyata lebih bersifat fisis, karena ukuran batangnya yang kecil menjadikannya tidak disukai oleh hama penggerek batang (Soejitno *et al.*, 1995).

Telah diketahui *Bacillus thuringiensis* memproduksi kristal protein yang bersifat insektisidal. Gen yang mengkode *insect specific-endotoxins* tersebut adalah gen *cry*, sedangkan ketahanan terhadap Lepidoptera digunakan gen *cryI* (Wunn *et al.*, 1996). Teknik rekayasa genetik memungkinkan untuk memasukkan gen tersebut ke dalam tanaman padi, sehingga tanaman nantinya diharapkan akan mempunyai ketahanan terhadap hama penggerek batang padi. Teknik transformasi di dalam upaya memperoleh tanaman padi transgenik telah dilakukan dengan menggunakan beberapa metode yang telah ada, seperti melalui vektor *Agrobacterium tumefaciens* (Hiei *et al.*, 1997; Khanna dan Raina, 1999) atau dengan penembakan partikel (Sudhakar *et al.*, 1998; Maqbool *et al.*, 1998). Tanaman padi transgenik pertama kali diperoleh menggunakan metode transfer DNA secara langsung atau memasukkan gen ke dalam protoplas melalui PEG (Toriyama *et al.*, 1988; Zhang *et al.*, 1988), meskipun prosedur tersebut sangat tergantung pada genotip dan metode regenerasinya. Dalam sistem penembakan partikel memerlukan sel atau jaringan yang mampu membelah dan yang dapat ditumbuhkan dalam media seleksi anti-biotik atau herbisida yang sesuai dengan gen yang dibawa dalam DNA yang ter-transformasi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan tanaman putatif transgenik padi generasi T0 yang mengandung gen *cryIA*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Rekayasa Genetik, Balai Penelitian Bio-teknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor pada tahun anggaran 2002.

Bahan

Varietas padi unggul, yaitu varietas Cisadane, Sintanur (Indica), dan Taipei-309 (Japonica) sebagai tanaman model.

Dalam penelitian ini sebagai gen target digunakan gen *cryIA(b)* dalam plasmid *pUBB*. Sebagai gen pelapor digunakan gen *gus*, sedangkan untuk seleksi digunakan gen *hpt* yang merupakan gen resisten terhadap antibiotik higromisin. Kedua gen ini diinsersikan ke dalam plasmid *pRQ6*. Plasmid *pUBB* dan *pRQ6* ini di-peroleh dari kerja sama internasional dengan Universitas Ottawa, Canada melalui Prof. Dr. Illimar Altosaar dari Departemen Biokimia, Fakultas Kedokteran.

Metode

Induksi Kalus Embriogenik

Kalus diinduksi dari embrio tua padi Cisadane, Sintanur, dan T-309 pada media NB yang ditambah dengan L-prolin 500 mg/l, L-glutamin 500 mg/l, kasein hidrolisat 300 mg/l, sukrosa 30 g/l dan ditambah hormon 2,4-D 2 mg/l, pH 5,8-5,82. Kalus yang embriogeni dipindahkan (disubkultur) ke media induksi kalus (NB) yang baru setiap 2 minggu.

Kalus embriogenik yang berasal dari hasil subkultur, diletakkan pada media osmotikum, yaitu media NB yang ditambah 30 g/l sukrosa, 1,2 M manitol, dan 1,2 M sorbitol selama 4 jam sebelum dilakukan penembakan plasmid. Perlakuan ini di-maksudkan untuk mencegah kerusakan jaringan kalus akibat penembakan. Menurut Vain *et al.* (1993) perlakuan osmotikum menyebabkan sel-sel lebih elastis, sehingga mengurangi faktor kerusakan sel dan akan memperbaiki ekspresi gen sementara. Selain itu, dengan mengoptimalkan konsentrasi dan lamanya eksplan pada media osmotikum dapat meningkatkan *recovery* setelah dilakukan penembakan plasmid. Setelah kalus berada 4 jam dalam media osmotikum kemudian dilakukan 2 kali penembakan plasmid pada tekanan vacum 27 cm Hg dan jarak penembakan 7 cm.

Kalus yang telah ditembak kemudian dipindah ke media seleksi. Untuk varietas T-309 digunakan media seleksi (NB) yang mengandung higromisin 40 mg/l sedangkan untuk varietas Cisadane digunakan media seleksi (NB) mengandung 35 mg/l higromisin. Hal ini berdasarkan penelitian tahun lalu, di mana kalus dari varietas Indica (Bio I dan Cisadane) yang tahan terhadap media seleksi dapat tumbuh berproliferasi, namun selanjutnya kalus tersebut menghitam dan diperkirakan hal ini terjadi karena konsentrasi higromisannya terlalu tinggi. Oleh karena itu, untuk penelitian tahun ini, khusus untuk Indica konsentrasi higromisin pada media seleksi diturunkan menjadi 35 mg/l.

Transformasi dan Seleksi

Penembakan plasmid menggunakan metode ILTAB (Fauquet *et al.*, 1996) yang telah dimodifikasi oleh Sawant (Sawant *et al.*, 2000). Cara ini telah diuji pada tahun sebelumnya. Perlakuan dengan metode Sawant tersebut dapat menaikkan efisiensi transformasi, yang ditunjukkan dengan meningkatnya *blue spot* 7 kali lebih banyak pada kalus-kalus yang ditembak dengan prosedur tersebut (Hanarida *et al.*, 2001). Sistem penembakan plasmid menggunakan kotransformasi antara plasmid yang mengandung gen *cryIA(b)* (gen target) dengan plasmid yang berisi gen penanda (gen marker) dengan perbandingan 4 : 1 untuk gen target. Kalus yang telah ditembak dengan DNA plasmid kemudian dipindahkan ke media seleksi, yaitu media NB yang diberi antibiotik higromisin 35-40 mg/l, yaitu media seleksi pertama NH40 dan media seleksi kedua/preregenerasi PRNH40 (Li *et al.*, 1993). Media regenerasi menggunakan 2 macam media yaitu media NK4N2, yaitu media NB yang mengandung hormon kinetin 4 mg/l dan NAA 2 mg/l serta media MSP, yaitu media MS yang diberi hormon kinetin 2 mg/l, NAA 0,5 mg/l dan 10^{-3} M spermidin.

Uji Gus

Untuk melihat keberhasilan transformasi sementara, dilakukan uji gus. Ekspresi gen *gus* diuji berdasarkan metode Rueb *et al.* (1994) dengan substrat X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-inolyl glucoronide).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Teknik transformasi pada penelitian ini menggunakan biolistik yang mempunyai prinsip dasar untuk memindahkan gen dengan menggunakan mikroprojektil berkecepatan tinggi agar dapat menembus lapisan luar sel untuk mengintroduksikan material genetik ke dalam sel-sel hidup. Teknik ini banyak digunakan karena selain menghasilkan ekspresi gen yang stabil pada tanaman transforman juga penggunaannya tidak dibatasi oleh kelas tanaman atau jenis eksplan tertentu (Birch dan Bower, 1994). Penembakan plasmid dilakukan dengan cara ko-transformasi antara plasmid *pRQ6* (yang berisi gen penanda *gus* dan gen penyeleksi *hpt*) dan *pUBB* (berisi gen *cryIA(b)*) dengan perbandingan molaritas tertentu, yaitu 1 : 4. Dengan perbandingan ini diharapkan persentase masuknya gen target (*cryIA(b)*) ke dalam sel akan lebih tinggi dibandingkan dengan gen penanda dan gen penyeleksi.

Pada penelitian ini hanya T-309 dan Cisadane yang dapat menghasilkan kalus, sedangkan Sintanur masih belum berhasil diinduksi.

Pada tahap seleksi, kalus-kalus yang tahan terhadap media seleksi pertama (NH40), kemudian disubkultur ke media preregenerasi yang masih mengandung higromisin (PRNH40). Kalus-kalus yang tahan dengan sistem seleksi berjenjang ini biasanya jumlahnya akan terus menurun sampai pada tahap regenerasi karena hanya kalus yang benar-benar mengandung gen

ketahanan terhadap higromisin yang dapat lolos sampai tingkat regenerasi (Hanarida *et al.*, 2001). Kalus-kalus yang dapat lolos sampai tahap preregenerasi adalah 35,5% untuk T-309 dan 33% untuk Cisadane, sedangkan yang dapat beregenerasi menjadi tanaman hanya 13% pada T-309 dan 1% pada Cisadane (Tabel 1).

Respon kalus yang berbeda tampak setelah dilakukan penembakan plasmid. Regenerasi yang paling tinggi adalah pada kalus varietas T-309 (Japonica). Hal ini berarti sumber eksplan (genotip) dan tingkat embriogenik kalus sangat berpengaruh dalam meregenerasikan tanaman hijau. Sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Ambarwati (1993), bahwa regenerasi tanaman sangat dipengaruhi oleh faktor genetik dan tingkat embriogenik dari kalus yang digunakan sebagai eksplan. Perbedaan respon tampak pada tanaman padi Javanica, Indica, dan Japonica. Untuk T-309 (Japonica) hampir seluruh kalus (data tidak disajikan) dalam media regenerasi dapat membentuk tanaman hijau. Sedangkan untuk Cisadane, kalus yang lolos seleksi dipindah ke media regenerasi yang pada tahap awal menggunakan media regenerasi NK4N2, namun kalus tersebut tidak dapat beregenerasi. Kemudian kalus tersebut dipindah ke media regenerasi MSP dan hanya satu kalus yang dapat meregenerasikan tanaman hijau. Secara umum dapat dikatakan bahwa kalus yang berasal dari tanaman padi yang termasuk dalam subspecies Japonica lebih responsif terhadap media regenerasi NK4N2 dibandingkan dengan kalus yang berasal dari subspecies Indica. Sampai saat ini, kalus yang belum dapat beregenerasi masih tampak berproliferasi dan sebagian lagi masih berbentuk kalus dengan spot hijau.

Tanaman hasil transformasi baru diperoleh dari varietas T-309 (280 tanaman) sedangkan baru 1 tanaman dari Cisadane. Penelitian masih berlangsung, terutama untuk regenerasi padi Cisadane. Tanaman T0 yang

Tabel 1. Transformasi tanaman padi menggunakan mikroprojektil dengan plasmid *pUBB* dan *pRQ6* pada molaritas 4 : 1

Varietas	Event	Jumlah eksplan	Kalus yang masih hidup pada media seleksi		Kalus yang beregenerasi	Jumlah tanaman hijau	
			NH40	PRNH40		NK4N2	MSP ¹⁾
T-309	I	50	17	17	4	18	-
	II	50	15	15	4	47	-
	III	50	17	17	14	176	-
	IV	50	22	22	4	39	-
Subtotal		200	71 (35,5)	71 (35,5)	26 (12,0)	280	-
Cisadane	I	50	10	3	1	-	1
	II	50	15	11	-	-	-
Subtotal		100	25 (25,0)	14 (14,0)	1 (1,0)	-	1
Total		300	96 (2,2)	85 (28,3)	27 (9,0)	280	1

¹⁾ Penelitian masih berlangsung pada T-309 dan Cisadane. Angka di dalam kurung adalah persentase

didapatkan saat ini sebagian sudah ditanam di rumahkaca dan lainnya masih dalam tahap aklimatisasi.

KESIMPULAN

1. Telah diperoleh 280 tanaman transgenik putatif dari Taipei-309 dan 1 tanaman dari Cisadane.
2. Media regenerasi NK4N2 efektif meregenerasikan kalus T-309 (Japonica) hasil transformasi dan media regenerasi MSP dapat meregenerasikan satu kalus Cisadane (Indica) hasil transformasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Ambarwati, A.D. 1993.** Regenerasi tanaman padi Javanica, Indica, dan Japonica. *Dalam* S. Brotonegoro, T. Sudjana, A. Santika, dan A. Hardjamulia (*Eds.*). Prosi-ding Lokakarya Penelitian Komoditas dan Studi Khusus II:5-7.
- Birch, R.G. and R. Bower. 1994.** Principles of gene transfer using particle bombardment. *In* N. Sun-Yang and P. Christou (*Eds.*). Particle Bombardment Technology for Gene Transfer. Oxford Press. New York. p. 3-37.
- Fauquet, C.M., S. Zhang, L. Chen, P. Marmey, A de Kochko, and R.N. Beachy. 1996.** Biolistic transformation of rice: now efficient and routine for Japonica and Indica rices. *In* G.S. Kush (*Ed.*). Proceeding of The Third International Rice Genetics Symposium, 16-20 October 1995. Manila (Philippines). IRRI. p. 153-165.
- Hanarida, I., A.D. Ambarwati, I.S. Dewi, A. Apriana, dan T.J. Santoso. 2001.** Transformasi padi dengan bombardmen mikroprojektil. Laporan Hasil Penelitian. Balitbio, Bogor. 14 hlm.
- Heinrich, E.A. 1980.** Varietal resistant to the brown planthoper and yellow stemborer. *In* Rice Improvent in China and Other Asia Countries. IRRI and Chinese Acad. Agric. Sci. p. 195-218.
- Hiei, Y., S. Ohta, T. Komari, and T. Kumashiro. 1997.** Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the-DNA. *The Plant Journal* 6(2):271-282.
- Khanna, H.K., and S.K Raina. 1999.** *Agrobacterium*-mediated transformation of indica rice cultivars using binary and superbinary vectors. *Australia Journal Plant Physiology*. 26:311-324.
- Li, L., R. Qu, A. de Kochko, C. Fauquet, and R.N. Beachy. 1993.** An improved rice transformation system using the biolistic method. *Plant Cell Rep.* 12:250-255.

- Maqbool, S.B., T. Husnain, S. Riazuddin, L. Masson, and P. Christou. 1998.** Effective control of yellow stem borer and rice leaf folder in transgenic rice indica varieties Basmati 370 and M7 using the novel δ -endotoxin *cry2A* *Bacillus thuringiensis* gene. *Mol. Breed.* 00:1-7.
- Pathak, M.D. and Z.R. Khan. 1994.** Insect pests of rice. International Rice Research Institute (IRRI). Manila.
- Rueb, S. and L.A.M. Hensgens. 1994.** Improved histochemical staining for β -D-glucuronidase activity in monocotyledonous plant. *In* Y. Hiei, S. Ohta, T. Komari, and T. Kumashiro. Efficient Transformation of Rice (*Oryza sativa* L.) Mediated by Agrobacterium and Sequence Analysis of the T-DNA. *The Plant Journal* 6(2):271-282.
- Sawant S.V., P.K. Singh, and R. Tuli. 2000.** Pretreatment of microprojectiles to improve the delivery of DNA in plant transformation. *BioTechniques* 29:246-248.
- Sudhakar, D.G., L.T. Duc, B.B. Bong, P. Tinjuangjun, S.B. Maqbool, M. Valdez, R. Jefferson, and P. Christou. 1998.** An efficient rice transformation system utilizing mature seed-derived explants and a portable, inexpensive particle bombardment device. *Trans.Res.* 7:1-6.
- Soejitno, J., I. Hanarida, dan B. Amirhusin. 1995.** Evaluation of several wild rice to rice stemborer (*Scirpophaga innotata*). Makalah Balittan Bogor No. 38.
- Toriyama, K., Y. Arimoto, H. Uchimiya, and K. Hinata. 1988.** Transgenic rice plants after direct gene transfer into protoplasts. *Bio/Technology* 6:1072-1074.
- Vain, P., M.D. Mc Mullen, and J.J. Finer. 1993.** Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. *Plant Cell Rep.* 12:84-88.
- Wunn, J., A. Kloti, P.K. Burkhardt, Biswis, K. Lauris, V.A. Inglesias, and I. Ptrylens. 1996.** Transgenic Indica rice breeding line IR58 expressing a synthetic *cryIA(b)* gene from *Bacillus thuringiensis* provides effective insect pest control. *Bio/technology* 14:171-176.
- Zhang, H.M., H. Yang, E.L. Rech, T.J. Gold, A.S. Davis, B.J. Bulligan, E.C. Cocking, and M.R. Davey. 1988.** Transgenic rice plants produced by electroporation-mediated plasmid uptake into protoplasts. *Plant Cell Rep.* 7:379-384.