Penyisipan Gen *OsDREB*1A pada Tanaman Padi untuk Regenerasi Sifat Toleran Kekeringan

Budi Santosa[1], Sobir[2], Sriani Sujiprihati[2], dan Kurniawan Rudi Trijatmiko[1]

[1]*Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian*
Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor, Jawa Barat
[2]*Fakultas Pertanian. Institut Pertanian Bogor*
Kampus IPB Darmaga, Bogor

ABSTRACT. Transformation of *OsDREB*1A Gene Using *Agrobacterium tumefaciens* for Regeneration of Drought Tolerant Rice Plants. Genetic engineering is an alternative technology that can be used to assist breeders for improving the genetic potential of crop variety. Drought tolerant of rice was attempted by applying genetic engineering techniques by introducing gene OsDREB1A using *Agrobacterium tumefaciens*. The experiment was conducted in 2008-2010 at the laboratory and greenhouse of the Indonesian Center for Agriculture Biotechnology and Genetic Resources and Development, Bogor, using the transformation method. Callus derived from seeds of rice varieties Nipponbare was transformed by inserting the gene OsDREB1A, then regenerated and acclimatized to generate putative transgenic rice plants. The transformation of calli derived from 469 rice seeds of variety Nipponbare produced 103 putative transgenic rice plants. Plant heights of the putative transgenic plants obtained were generally lower than the control plants (88 cm). The numbers of rice panicles of the putative transgenic plants were generally less than the control plants (9 panicle). Production of filled grain of the putative transgenic plants were less than the control plants; three plants did not even produce seeds, namely B14(2)4.1a, D5.1, and D18. The results of the PCR analysis showed that all the putative transgenic rice plants were confirmed to carry the gene OsDREB1A.

Key words: Transformation, regeneration, rice, gene OsDREB1A, drought tolerance

ABSTRAK. Rekayasa genetik merupakan salah satu teknologi alternatif yang dapat digunakan untuk membantu pemulia dalam meningkatkan potensi genetik tanaman. Perakitan varietas padi toleran dicoba dilakukan menggunakan teknik rekayasa genetik dengan mengintroduksikan gen *OsDREB*1A dengan bakteri *Agrobacterium tumefaciens*. Penelitian dilaksanakan pada tahun 2008-2010 di laboratorium dan rumah kaca Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Bogor, menggunakan metode transformasi. Kalus yang berasal dari biji padi varietas Nipponbare ditransformasi dengan memasukkan gen *OsDREB*1A menggunakan *A. tumefaciens,* kemudian diregenerasi dan diaklimatisasi untuk menghasilkan tanaman padi putatif transgenik. Hasil transformasi kalus yang berasal dari 469 biji padi varietas Nipponbare menghasilkan 103 tanaman padi putatif transgenik. Tinggi tanaman putatif transgenik yang diperoleh umumnya lebih rendah dari tanaman kontrol (88 cm). Jumlah malai padi dari tanaman putatif transgenik umumnya lebih sedikit dari tanaman kontrol (9 malai). Produksi gabah isi dari tanaman putatif transgenik lebih sedikit dari tanaman kontrol; tiga genotipe bahkan tidak menghasilkan biji, yaitu B14(2)4.1A, D5.1, dan D18. Hasil analisis molekuler dengan teknik PCR memperlihatkan bahwa seluruh tanaman putatif transgenik padi yang diperoleh mengandung gen *OsDREB*1A.

Kata kunci: Transformasi, regenerasi, padi, gen *OsDREB*1A

Kekeringan hampir terjadi setiap tahun di daerah pertanaman padi, terutama di lahan tadah hujan. Tanaman padi yang mengalami cekaman kekeringan tidak mampu menyerap air yang ada di tanah, sehingga menurunkan produksi dan bahkan tanaman mati. Hasil penelitian di rumah kasa menunjukkan bahwa cekaman kekeringan dapat menurunkan hasil padi rata-rata 52,3% (Samaullah dan Darajat 2001). Padi varietas IR20 mati pada tanah yang memiliki kadar air 14,5-14,7% (Lubis *et al.* 2008).

Salah satu cara untuk menanggulangi kekeringan adalah menanam varietas toleran. Upaya perbaikan sifat toleran kekeringan pada padi, baik lokal maupun unggul, masih sangat terbatas (Suardi *et al*. 2004).

Perakitan varietas padi toleran kekeringan dapat dilakukan melalui persilangan konvensional maupun menggunakan teknologi transformasi genetik. Sifat toleran kekeringan pada padi dikendalikan oleh banyak gen (Kasuga *et al.* 1999, Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 2004), sehingga sulit menghasilkan varietas toleran melalui persilangan konvensional. Perakitan varietas padi dengan menggunakan teknik transformasi genetik diharapkan dapat menghasilkan varietas unggul padi dengan sifat-sifat yang dikehendaki.

Agrobacteruim tumefaciens merupakan salah satu teknik transformasi yang banyak dilakukan oleh para peneliti dan telah berhasil dengan baik. *Agrobacteruim* merupakan bakteri yang berperan dalam membantu menyisipkan gen ke genom tanaman, misalnya pada transformasi tanaman kentang dengan gen *RB* untuk meningkatkan ketahanan terhadap penyakit hawar daun (Listanto *et al.* 2009), tanaman tomat dengan gen *Defh9-iaaM* dan *Defh9-RI-iaaM* untuk menghasilkan buah partenokarpi (Purnamaningsih 2010), tanaman padi dengan gen CBF3/*DREB*1A dan ABF3 dari Arabidobsis untuk meningkatkan toleransi cekaman biotik (Oh *et al.* 2005).

Gen yang berhubungan dengan karakter kekeringan yaitu gen berbasis *DREB* (*Dehydration Response Element Binding*), seperti gen *DREB*1A dan *DREB*1B. Gen *DREB*1A termasuk gen faktor transkripsi

yang berperan dalam meregulasi sejumlah gen lain yang berhubungan dengan karakter kekeringan (Dubouzet *et al.* 2003, Oh *et al.* 2005). Hasil penelitian Dubouzet *et al.* (2003) menunjukkan bahwa over ekspresi dari gen *OsDREB*1A yang berasal dari genom padi pada tanaman Arabidopsis transgenik dapat menginduksi over ekspresi gen target *DREB*1A, dan menghasilkan tanaman Arabidopsis yang lebih toleran terhadap kekeringan, kadar garam tinggi, dan suhu rendah. Gen-gen yang berbasis *DREB* yang telah diisolasi oleh Dubouzet *et al.* (2003) dari genom padi adalah *OsDREB*1A, *OsDREB*1B, *OsDREB*1C, *OsDREB*1D, dan *OsDREB*2A.

Beberapa tanaman hasil rekayasa transgenik yang menggunakan gen *DREB* antara lain tomat transgenik (gen CBF1/*DREB*1B) yang lebih toleran terhadap defisit air (Hsieh *et al.* 2002). Gen *DREB*1B ini homolog dengan gen DREB1A yang responsif terhadap suhu rendah dan defisit air (Gilmour *et al.* 1998). Pada tanaman gandum transgenik, gen *DREB*1A meningkatkan toleransi terhadap kekurangan air (Pellegrineschi *et al.* 2004). Gen *OsDREB*1A yang sudah ditransformasikan pada tanaman padi memperlihatkan over ekspresi, yaitu lebih toleran terhadap defisit air pada kondisi suhu rendah (JIRCAS 2005). Namun, gen tersebut belum diketahui mekanisme over ekspresinya pada kondisi cekaman kekeringan. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan tanaman padi yang tersisipi gen *OsDREB*1A melalui transformasi dengan *A. tumefaciens*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler dan Rumah Kaca Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Bogor, Februari 2008 – Maret 2010.

Bahan Penelitian

Benih padi varietas Nipponbare, gen *OsDREB*1A yang dikonstruksi oleh Kurniawan Rudi Trijatmiko *et al.* (komunikasi pribadi). Media kultur jaringan dan transformasi sama dengan yang digunakan oleh Greco *et al.* (2001).

Konstruksi plasmid

Fragmen yang mengkode protein gen *OsDREB*1A diamplifikasi dari DNA genom padi cv. Nipponbare. Oligonukleotida *OsDREB*1A F (5'-AATAAGGATCCT TCAGGAATCAGGAGCAAG C-3') dan *OsDREB*1A R (5'-ACAGTCGACACTTGTTCCATCACATTACCGA-3') digunakan untuk amplifikasi fragmen 0,89 kb yang mengandung sekuen pengkode protein gen *OsDREB*1A. Pasangan oligonukleatida tersebut memasukkan situs *BamH*I dan *Sal*I pada ujung 5' dan 3' dari fragmen amplifikasi yang digunakan untuk keperluan ligasi. Fragmen diindroduksi ke vektor pGEM-T easy berdasarkan prosedur dari perusahaan (Promega) dan selanjutnya dipotong dengan *BamH*I dan *Sal*I. Fragmen promotor CaMV35S dari posisi -526 sampai situs awal transkripsi, didapatkan sebagai fragmen *Hin*dIII dan *Bam*HI 0,55 kb turunan dari pBS-SK$^+$ dari pDH51 (Pietrzak *et al*. 1986).

Fragmen terminator CaMV35S didapatkan sebagai kontruk fragmen *Sal*I-*Eco*RI 0,21 kb dari turunan pBS-SK$^+$ dari pDH51 (Pietrzak *et al*. 1986). Konstruk overekspresi dirakit melalui ligasi multipoin berdasarkan prosedur dari perusahaan BIORAD (no. Katalog 165-2100) menggunakan Micro Pulser dengan sistem kejutan listrik (elektroporasi), dimana masing-masing fragmen (promotor, gen *OsDREB*1A, terminator) dengan ujung kohesif yang kompatibel diligasikan bersama-sama ke vektor biner dalam satu reaksi. Konstruk dibuat dalam vektor biner pCAMBIA1301 yang mengandung chimerik CaMV35S-higromisin phosphotransferase-tNos untuk seleksi transforman.

Transformasi

Transformasi dan regenerasi tanaman dilaksanakan berdasarkan metode Greco *et al.* (2001). Sebanyak 200 biji padi varietas Nipponbare steril digunakan untuk sekali proses transformasi dan 10 biji padi ditanam pada media induksi kalus (media bsal NB + 30 g/l sukrosa (pH 5,8) + 3 g/l phytagel + 2,5 mg/l 2,4-D). Jaringan kalus yang embriogenik di ko-kultivasi dengan memasukkan dalam media ko-kultivasi cair (media dasar R2 + 10 g/l glukosa (pH 5,2) + 2,5 mg/l 2.4-D + 100 µM acetosyringone) yang mengandung *Agrobacterium* (Agl-1) berisi *OsDREB*1A. Kalus kemudian ditanam pada media ko-kultivasi padat (Media dasar R2 + 10 g/l glukosa (pH 5,2) + 3 g/l phytagel + 2,5 mg/l 2.4-D + 100 µM acetosyringone) dan diinkubasi selama tiga hari dalam keadaan gelap (25^{o}C). Kalus yang segar dipindahkan ke media seleksi (media dasar R2 + 30 g/l glukosa (pH 6,0) + 3 g/l phytagel + 2,5 mg/l 2.4-D + 400 mg/l cefotaxime + 100 mg/l vancomycine + 50 mg/l hygromycine), kemudian diinkubasi dalam ruang gelap (28^{o}C) selama dua minggu dan disubkultur pada media yang sama. Kalus yang embriogenik dipindahkan ke dalam media induksi embrio (media dasar LS + 30 g/l sukrosa (pH 5,8) + 100 ml/l air kelapa + 3g/l phytagel + 2,5 mg/l 2.4-D + 400 mg/l cefotaxime + 100 mg/l vancomycine + 50 mg/l hygromycine) dan diinkubasi dalam ruang gelap (28^{o}C) selama dua minggu.

Regenerasi Tanaman

Kalus embriogenik yang terseleksi dipindahkan pada media regenerasi embrio (media dasar LS + 40 g/l sukrosa (pH 5,8) + 3 g/l phytagel + 0,5 mg/l IAA + 0,3 mg/l BAP + 400 mg/l cefotaxime + 100 mg/l vancomycine + 50 mg/l hygromycine) dan diinkubasi dalam ruang kultur selama dua minggu pada suhu 25°C. Kalus yang ada bercak hijau disubkultur pada media yang sama. Kalus yang sudah tumbuh daun/tunas sepanjang minimal sekitar 1 cm disubkultur pada media perakaran. Planlet disimpan dalam ruang kultur pada suhu 28°C.

Aklimatisasi

Planlet (tunas) dengan tinggi tanaman minimal 5 cm dipindahkan ke media air selama satu minggu dan disimpan pada suhu ruang. Planlet yang masih hidup dipindahkan pada media pembibitan selama dua sampai tiga minggu, selanjutnya bibit tanaman padi yang berasal dari planlet yang tumbuh (hidup) dipindahkan pada media tanam normal dan dipelihara sampai menghasilkan biji.

Pengamatan dilakukan terhadap tinggi tanaman, jumlah anakan, panjang malai, dan jumlah gabah.

Analisis Molekuler dengan Teknik PCR

Isolasi DNA yang berasal dari serbuk daun muda tanaman padi berdasarkan prosedur Shure *et al.* (1983). DNA hasil isolasi diuji integrasinya dengan elektroforesis dan diukur konsentrasinya menggunakan spektrofotometer. Selanjutnya DNA diencerkan dengan ddH_2O untuk mencapai konsentrasi 10 ng/ml. Campuran reaksi (2μl buffer 10 PCR + 1,2 μl MgCl + 0,4 μl DNTPs + 2 μl primer mix HPT + 0,16 μl Taq DNA polimerase + 9,24 μl ddH_2O + 5 μl sampel DNA) diamplifikasi menggunakan mesin PCR. Profil suhu yang digunakan adalah predenaturasi 94 °C selama 5 menit, dilanjutkan dengan 35 siklus yang meliputi pemisahan (*denaturation*) pada suhu 94°C selama 1 menit, penempelan primer (*annealing*) pada suhu 55°C selama 1 menit, pemanjangan primer (*extension*) pada suhu 72°C selama 2 menit. Pada tahap akhir PCR dilakukan pemanjangan akhir pada 72 °C selama 5 menit. Fragmen-fragmen DNA pada gel agarose divisualisasi dengan menggunakan *Chemidoc gel system* hasilnya berupa pita-pita DNA.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Plasmid pCambia 1310 yang mengandung gen *OsDREB1A* berukuran sekitar 12 kb, kemudian dipotong dengan enzim EcoRI, sedangkan plasmidnya sendiri berukuran 11 kb. Hasil potongan plasmid tersebut adalah untuk plasmid pCambia 1301 dengan ukuran 11 kb, sedangkan gen *OsDREB1A* beserta promotor 35S berukuran 1.600 bp. Konfirmasi ini bertujuan untuk memastikan bahwa gen yang akan digunakan untuk transformasi sudah benar.

Transformasi Varietas Nipponbare

Induksi kalus yang berasal dari biji padi varietas Nipponbare dilakukan sebanyak empat kali kegiatan. Setiap transformasi dilakukan dalam petridis menggunakan 200 biji padi sebagai bahan untuk induksi kalus dan diulang empat kali. Setiap petridis berisi 10 biji padi. Hasil induksi kalus padi memperlihatkan bahwa tidak semua biji padi yang digunakan dapat menghasilkan kalus (Tabel 1). Varietas Sintanur belum berhasil diinduksi untuk menghasilkan kalus, sedangkan varietas Cisadane dan Taipei-309 dapat diinduksi menghasilkan kalus (Somantri *et al*. 2003). Biji yang berhasil menjadi kalus berkisar antara 6-10 kalus per petridis dan beberapa biji yang telah berhasil menjadi kalus mengalami kontaminasi yang disebabkan oleh jamur. Varietas Nipponbare termasuk padi yang mudah untuk induksi kalus.

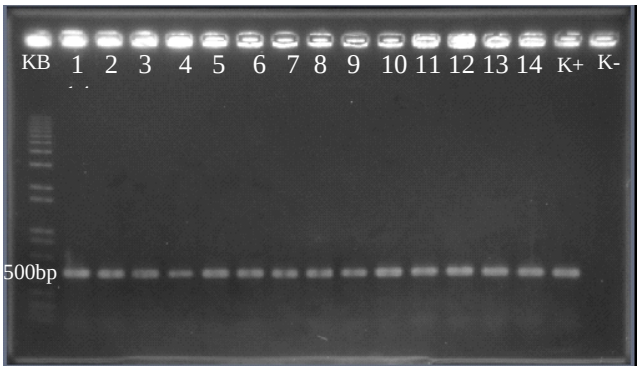
Kalus yang telah diko-kultivasi dengan bakteri *Agrobacterium* yang mengandung gen *OsDREB*1A dan disubkultur pada media seleksi mengalami perubahan warna menjadi coklat sampai coklat tua, hitam akhirnya mati dan berwarna putih kekuningan. Kalus yang berwarna putih dan kekuningan ini biasanya akan mengalami regenerasi menjadi planlet. Namun, tidak semua kalus menjadi planlet karena adanya sel yang terus-menerus membelah dan sel yang dapat berkembang menjadi planlet.

Regenerasi

Kalus yang telah mengalami regenerasi tidak semuanya menghasilkan planlet yang sempurna, yaitu daunnya berwarna hijau dan planlet yang tidak sempurna

Tabel 1. Hasil transformasi dan regenerasi tanaman padi varietas Nipponbare putatif transgenik dengan menggunakan gen *OsDREB*1A.

Transformasi ke	Jumlah biji	Jumlah kalus	Jumlah planlet	Jumlah tanaman
1	200	179	98	22
2	200	133	67	27
3	200	152	81	35
4	200	105	57	19
Total	800	469	303	103



Gambar 1. Hasil amplifikasi PCR DNA 14 genotipe tanaman padi Nipponbare putatif transgenik sebesar 500 bp (No. 1-14), K+ = kontrol positif; K- = kontrol negatif; KB = marker.

berwarna putih atau albino karena planlet tidak mempunyai klorofil. Penelitian Dewi *et al.* (2006) pada kultur antera padi juga menghasilkan tanaman hijau dan tanaman putih (albino) yang berasal dari kalus. Pada kultur jaringan padi, regenerasi tanaman yang berasal dari kalus dapat menghasilkan tanaman yang berwarna hijau dan putih (albino).

Kalus yang telah menjadi planlet mempunyai akar berwarna coklat dan putih, pada umumnya planlet yang akarnya berwarna coklat mati. Planlet kemungkinan tersebut berasal dari kalus yang tidak mengalami transformasi dan akhirnya mati dalam media perakaran atau pada waktu aklimatisasi. Planlet yang akarnya berwarna putih sebagian besar dapat hidup menjadi tanaman dan ada juga yang mati. Planlet berwarna hijau tidak semuanya memperlihatkan pertumbuhan yang baik, seperti terhambatnya pertumbuhan tanaman sehingga tanaman tetap pendek dan akhirnya mati atau batang tidak tegar dan berwarna hijau kekuningan. Planlet atau tanaman yang baik adalah yang batangnya tegak /tegar dan berwarna hijau tua. Planlet seperti ini pada akhirnya dapat menjadi tanaman yang tumbuh dengan baik.

Biji varietas Nipponbare sebanyak 800 butir yang diinduksi tidak semuanya menjadi kalus. Setiap melakukan transformasi, biji padi yang berhasil menjadi kalus tidak sama banyaknya, demikan juga kalus yang berhasil menjadi planlet dan planlet yang dapat tumbuh terus menjadi tanaman. Tabel 1 memperlihatkan bahwa dari 800 butir biji padi Nipponbare hanya 469 biji yang dapat diinduksi menjadi kalus dan menghasilkan 303 planlet. Tanaman yang dihasilkan dari 303 planlet sebesar 103 tanaman putatif transgenik dan sudah dianalisis PCR, hasilnya positif dengan adanya pita DNA berukuran 500 bp (Gambar 1).

Aklimatisasi

Pada umumnya tanaman hasil aklimatisasi yang ditanam pada media tanah dapat tumbuh dengan baik, namun ada beberapa yang mati. Tanaman yang tumbuh satu batang tidak menghasilkan malai atau malai hampa dan akhirnya mati. Tanaman pendek anakannya menghasilkan sedikit malai tapi hampa dan akhirnya mati, tanaman seperti rumput tidak menghasilkan malai. Tanaman yang tumbuh normal dan menghasilkan malai tapi hampa. Tanaman ada yang menghasilkan malai tapi tidak sempurna, tidak membuka dan hampa atau biji yang dihasilkan sedikit, jumlah malai bervariasi antara 1-20 malai per tanaman. Semua tanaman transgenik menghasilkan biji lebih sedikit dari tanaman induknya (Tabel 2). Hal tersebut disebabkan terjadi segregasi pada tanaman T0 akibat transformasi gen *OsDREB*1A ke dalam genom padi.

Tanaman padi transgenik pada umumnya lebih rendah dari tanaman induknya, namun ada satu genotipe yang lebih tinggi, yaitu A8.1.1 (91cm). Untuk jumlah malai ada beberapa genotipe yang melebihi tanaman induknya seperti A7.2.2, A9.2.1, B14(1)4.3A1, dan C15.1.3A, sedangkan genotipe lainnya kebanyakan lebih rendah dari induknya. Panjang malai tanaman padi transgenik secara umum tidak ada yang melebihi tanaman induknya. Tanaman induk terpanjang 21 cm, sedangkan tanaman padi transgenik mempunyai malai terpanjang 20 cm. Genotipe padi transgenik dengan malai terpendek adalah A7.2.2 (4,3 cm), sedangkan terpanjang B11.1.2 (20 cm).

Jumlah gabah total genotipe padi transgenik yang melebihi induknya (5 biji) ada dua yaitu genotipe A9.2.1 (563 biji) dan B14(1)4.3A1 (653 biji), sedangkan jumlah gabah genotipe lainnya lebih sedikit dari induknya. Untuk jumlah gabah isi genotipe transgenik tidak ada yang melebihi genotipe induknya yaitu 393 biji, dan genotipe transgenik dengan jumlah gabah isi tertinggi yaitu genotipe A11.1.2.1(3), bahkan ada genotipe yang tidak menghasilkan biji seperti: genotipe B14(2)4.1A dan D5.1.

Perubahan karakter agronomi seperti tinggi tanaman, panjang malai, dan jumlah anakan padi hasil transformasi disebabkan oleh pengaruh gen *OsDREB*1A yang telah dimodifikasi dan menyisip pada genom padi. Gen *OsDREB*1A tersebut dimungkinkan telah menyisip pada tempat yang tidak sesuai sehingga mengganggu perkembangan atau pertumbuhan tanaman. Tanaman transgenik yang ditanam pada kondisi normal menjadi terhambat pertumbuhannya tetapi juga dapat meningkatkan toleransi terhadap cekaman kekeringan (Ito *et al*. 2006).

Tabel 2. Tinggi tanaman, jumlah dan panjang malai, jumlah gabah dari 24 genotipe padi Nipponbare putatif transgenik.

Genotip	Tinggi tanaman (cm)	Jumlah malai	Panjang malai (cm)	Jumlah gabah isi	Jumlah gabah hampa	Total jumlah gabah
A11.1.2.1(3)	78	7	12,0-16,0	240	53	293
A7.2.2	66	10	4,3-9,4	52	37	89
A7.1.1A(2)	83	1	10,7	21	8	29
A9.2.1	57	17	9,5-15,7	12	551	563
A8.1.1	91	8	8,0-10,0	50	141	191
A12.2.2B(3)	70	2	11,5-12,6	56	25	81
B14(2)3.2B1	64	4	12,0-14,5	71	66	137
B14(2)3.2B2	75	5	12,5-16,0	105	134	239
B14(2)2.2.1A	46	3	14,0-20,0	88	41	129
B14(2)4.1A	34	5	11,0-13,5	0	65	65*
B11.1.2	66	2	15,0-20,0	47	43	90
B14(1)4.3A1	76	13	14,0-17,5	255	398	653
C15.1.3A	85	11	7,0-13,5	2	308	310
C14.3.2A	72	7	7,5-15,5	92	150	242
C15.1.3B1	50	9	10,0-14.0	110	142	252
C11.1.2	62	5	9,5-14,5	100	153	253
C15.4.1	76	1	9,5	7	9	16
C14(2)3.3	72	4	11,0-17,0	122	61	181
D15.2.1A	60	3	11,0-12,5	36	59	95
D11.1.1	64	5	13,0-15,0	96	39	135
D7.1.1	34	1	11,5	12	7	19
D5.1	33	1	9,0	0	14	14*
D10.1.1	64	0	0	0	0	0**
D18	48	2	7,0-10,5	0	35	35*
Nipponbare	88	9	14,0-21,0	393	141	534

* Mempunyai malai tapi hampa, ** Tidak mempunyai malai

Analisis Padi Transgenik dengan Teknik PCR

Semua genom padi transgenik yang dianalisis menggunakan primer HPTII menunjukkan adanya fragmen atau pita DNA berukuran 500 bp yang mengindikasikan bahwa genom tersebut sudah mengandung gen *OsDREB*1A.

KESIMPULAN

1. Induksi kalus dari biji padi Nipponbare telah dapat menghasilkan kalus. Kalus yang telah ditransformasi dan diregenerasi ada yang berwarna kekuningan, hijau, dan putih.
2. Dari 800 biji yang diinduksi, hanya 469 yang menjadi kalus dan menghasilkan 103 tanaman putatif transgenik. Tanaman putatif transgenik umumnya lebih rendah dari tanaman kontrol Nipponbare (88 cm), hanya satu genotipe yang lebih tinggi dari kontrol yaitu A9.2.1 (91cm). Jumlah malai dari tanaman putatif transgenik pada umumnya lebih sedikit dari tanaman kontrol dan empat genotipe lebih banyak (A7.2.2, A9.2.1 B14(1)4.3.1A dan C15.1.3A). Rata-rata hasil gabah isi semua genotipe tanaman putatif transgenik lebih sedikit daripada tanaman kontrol (393 biji) dan tiga genotipe tidak menghasilkan biji (B14(2)4.1A, D5.1, dan D18).
3. Hasil analisis dengan teknik PCR memperlihatkan bahwa semua genom padi yang dianalisis sudah mengandung gen *OsDREB*1A.

DAFTAR PUSTAKA

Dewi, I.S., B.S. Purwoko, H. Aswidinnoor, I.H. Soemantri, dan M.A. Chozin. 2006. Regenerasi tanaman pada kultur antera beberapa aksesi padi Indica toleran aluminium. AgroBiogen 2(1):30-35.

Dubouzet, J.G., Y.Z.Y Sakuma, Y.Y. Ito, M. Kasuga, E.G. Dubouzet, Z.S. Miura, M. Seki, K. Shinozaki, and K.Y. Shinozaki. 2003. *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. Plant 33:751-763.

Gilmour, S.J., D.G. Zarka, E.J, Stockinger, M.P. Salazar, J.M. Houghton, and M.F. Thomashow. 1998. Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced *COR* gene expression. Plant J. 16:433-442.

Greco, R., P.B.F. Ouwerkerk, A.J.C. Taal, C. Favalli, T. Beguiristan, P. Puigdomenech, L. Colombo, J.H.C. Hoge, A. Pereira. 2001. Early and multiple A transposition in rice suitable for efficient insertional mutagenesis. Plant Molecular Biology. 67(1):16-37.

Hsieh, T.T., Jt. Lee, Yy. Charng, and M.T. Chan. 2002. Tomato plants ectopically expressing arabidopsis CBF1 Show Enhanced Resistance to Water Deficit Stress. Plant Physiology 130:618-626.

Ito, Y., K. Katsura, K. Maruyama, T. Taji, M. Kobayashi, M. Seki, K. Shinozaki and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2006, Functional analysis of rice DREN1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice. Plant Cell Physiol. 47(1):141-163.

JIRCAS. 2005. Dehydration responsive element binding protein (*DREB)*1-type transcription factors in transgenic rice improve tolerance drought, salt, and freezing. Annual report. Topic 2, 40-41.

Kasuga, M., Q Liu, S Miura, K Yamaguchi-Shinozaki and K Shinozaki. 1999. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. Nature Biotechnology 17:287-291.

Listanto. E., G.A .Watimena, N.M. Armini, M.S .Sinaga, E. Sofiari dan M. Herman. 2009. Regenerasi Beberapa Kultivar Kentang dan Transformasi Kentang dengan Gen *RB* Melalui *Agrobacterium tumefacien*s. Hortikultuortikultura. 9(2):137-147.

Lubis, E., R. Hermanasari, Sunaryo, A. Santika, dan E. Suparman. 2008. Toleransi galur padi gogo terhadap cekaman abiotik. Prosiding. Seminar Apresiasi: Hasil Penelitian Padi Menunjang P2BN. Buku 2. Balai Besar Penelitian Tanaman Padi. p. 725-739.

Oh, S-J., S.I. Song, Y..S Kim, H-J. Jang, S.Y. Kim, M. Kim, Y-K. Kim, B.H. Nahm, and J-K. Kim. 2005. Arabidopsis CBF3/DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth. Plant Physiology Preview 11 p.

Pellegrineschi, A., M. Reynolds, M. Pacheco, R.M. Brito, R. Almeraya, K .Yamaguchi-Shinozaki, and D. Hoisington. 2004. Stress-induced expression in wheat of the Arabidopsis thaliana *DREB*1A gene delays water stress symptoms under greenhouse conditions. Genome 47:493-500.

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.

Purnamaningsih, R. 2010. Introduksi gen *Defh9-iaaM* dan *Defh9-RI-iaaM* ke dalam genom tanaman tomat menggunakan vektor *Agrobacterium tumefaciens*. Agrobiogen. 6(1):18-25.

Samullah, M.Y. dan A.A. Darajat. 2001. Toleransi beberapa genotipe padi gogo terhadap cekaman kekeringan. Penelitian Pertanian Tanaman Pangan. 20 (1):17-23.

Shinozaki, K. and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2004. Plant response to stress: regulation of plant gene expression to drought. Encyclopedia of Plant and Crop Science. DOI:10.1081/E-EPCS 120010660, Marcel Dekker, Inc. New York. p. 99-101.

Shure, M., S. Wessler, and N. Fedoroff. 1983. Molecular identification and isolation of the Waxy locus in Maize. Cell 35:225-233.

Somantri, I.H., A.D. Ambarwati, I.S. Dewi, A. Apriana, dan T.J. Santosa. 2003. Transformasi padi Japonica (T-309) dan Indica dengan Gen *Cry*!A(b). Prosiding. Hasil Penelitian Rintisan dan Bioteknologi Tanaman. Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian. p. 145-151.

Suardi, D., T.S. Silitonga, N. Abdullah, dan T. Suhartini. 2004. Evaluasi spesies padi liar toleran kekeringan. Penelitian Pertanian Tanaman Pangan. 23(1):23-27.