

Transformasi Padi dengan Bombardmen Mikroprojektil

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 Tanaman Pangan, Bogor, pada tahun anggaran 2001. Penelitian bertujuan untuk mendapatkan tanaman padi transgenik yang tahan terhadap hama penggerek batang padi. Transformasi dilakukan dengan teknik bombardmen mikroprojektil menggunakan plasmid *pUBB* dan *pUBC* yang dikotransformasi dengan plasmid *pRQ6*. Plasmid *pUBB* dan *pUBC* masing-masing membawa gen ketahanan terhadap penggerek batang padi yang disebut *cryIAb* dan *cryIAc*. Sedangkan *pRQ6* mengandung gen penanda *gus* dan penyeleksi higromisin. Prosedur penembakan dilakukan dengan dua cara, yaitu prosedur yang dikembangkan oleh Fauquet *et al.* (1996) dan Sawant *et al.* (2000). Hasil yang telah diperoleh adalah (1) Tanaman putatif transgenik hasil regenerasi (283 tanaman) dari 30 kalus Taipei-309 yang mengandung gen *cryIAb* dan 1 kalus Taipei-309 yang mengandung gen *cryIAc*; (2) Media regenerasi RNB (NB+BAP 4 mg/l+NAA 0,8 mg/l) dan NK1N0,5 (NB + kinetin 1 mg/l + NAA 0,5 mg/l) yang dapat menghasilkan planlet dari kalus hasil transformasi; (3) Prosedur penembakan Sawant *et al.* (2000) menggunakan partikel emas yang telah dioven semalam pada suhu 180°C dan isopropanol untuk preparasi DNA plasmid) lebih efektif dibandingkan dengan prosedur Fauquet *et al.* (1996); dan (4) Hasil uji *gus* menunjukkan 7 (9,46%) dari 74 tanaman (T0) yang telah diuji menunjukkan hasil positif.

Kata kunci: Transformasi padi, *pUBB/pUBC*, bombardmen mikroprojektil

ABSTRACT

The research was carried out in the Molecular Biology Laboratory, Molecular Biology Division, RIFCB, Bogor, in year 2001. The aim of the research is to produce transgenic rice resistant to stem borer. The transformation technique was carried out by means of particle bombardment using plasmid *pUBB* and *pUBC* that had been co-transformed with plasmid *pRQ6*. Plasmid *pUBB* and *pUBC* contain the *cryIAb* and *cryIAc*, respectively. These two genes are the resistant gene against to stem borer. Plasmid *pRQ6* contains the genes responsible as a reporter gene (*gus* gene) and selectable marker (*hph* gene). The procedure of bombardment is carried by two ways, i.e. by Fauquet *et al.* (1996) and Sawant *et al.* (2000). The results showed (1) 30 calli Taipei-309 containing *cryIAb* gene and 1 callus Taipei-309 containing *cryIAc* regenerated 283 putative transgenic plants, (2) Regeneration media RNB (NB + BAP 4 mg/l + NAA 0.8 mg/l) and NK1N0.5 (NB + kinetin 1 mg/l + NAA 0.5 mg/l) could produce planlets from the transformed calli, (3) The procedure of bombardment by Sawant *et al.* (2000) using gold particles incubated in 180°C overnight and isopropanol-treated plasmid DNA is more effective than the one by Fauquet *et al.* (1996), (4) The *gus* assay result show 7 (9.46%) out of 74 assayed plant T0 are positive.

Key words: Rice transformation, *pUBB/pUBC*, particle bombardment

PENDAHULUAN

Salah satu pembatas 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 enam spesies hama penggerek batang padi di Indonesia, penggerek batang padi putih (*Scirphophaga innotata* Wlk.) dan penggerek batang padi kuning (*S. incertulas* Wlk.) merupakan spesies dominan. Pemakaian insektisida untuk pengendalian hama ini tidak berhasil, karena larva langsung masuk ke dalam batang padi segera setelah telur menetas dan terus berkembang melalui beberapa tahapan sampai menjadi pupa.

Varietas unggul 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 menunjukkan bahwa sifat ketahanan tersebut ternyata lebih bersifat fisis, karena ukuran batang kecil sehingga tidak disukai oleh hama penggerek batang.

Telah diketahui bahwa *Bacillus thuringiensis* memproduksi kristal protein yang mempunyai insektisidal. Gen yang mengkode "inset 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 diharapkan mempunyai ketahanan terhadap hama penggerek batang padi. Teknik transformasi di dalam upaya memperoleh tanaman padi transgenik telah dilakukan dengan menggunakan beberapa metode yang ada, seperti melalui vektor *Agrobacterium tumefaciens* (Hiei *et al.*, 1994; 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 bergantung pada genotipe dan metode regenerasinya. Dalam sistem penembakan partikel memerlukan sel/jaringan yang mampu untuk membelah dan dapat ditumbuhkan dalam media seleksi antibiotik atau herbisida sesuai dengan gen yang dibawa dalam DNA yang tertransformasi. Gen *cryIAb* dan *cryIAc* yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari kerja sama internasional dengan Universitas Ottawa, Canada melalui Prof. Dr. Illimar Altosaar. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan tanaman padi transgenik generasi T0 yang mengandung gen *cryIA* dengan metode yang dimodifikasi.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor tahun anggaran 2001. Varietas padi yang digunakan adalah varietas padi unggul, yaitu Asemandi (varietas lokal yang banyak disukai di Sulawesi), Bio I dan Cisadane (varietas harapan), dan Taipei-309 sebagai kontrol.

Induksi Kalus

Kalus diinduksi dari embrio tua padi Asemandi, Bio I, Cisadane, dan Taipei-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.

Subkultur

Kalus yang embriogenik dipindahkan ke medium induksi kalus (NB) yang baru setiap 2 minggu.

Persiapan Kalus Embriogenik untuk Transformasi

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.

Plasmid

Dalam penelitian ini digunakan plasmid yang diperoleh dari Universitas Ottawa, Canada melalui Prof. Dr. Illimar Altosaar dari Departemen Biokimia, Fakultas Kedokteran. Plasmid tersebut adalah *pUBB* dan *pUBC* yang berisi gen *cryIAb* dan *cryIAc*. Sebagai gen penanda digunakan *pRQ6* berisi gen *gus* dan *hpt* yang mengandung gen resisten terhadap antibiotik higromisin.

Sistem penembakan plasmid menggunakan ko-transformasi antara plasmid yang mengandung gen *cry* (gen target) dengan plasmid yang berisi gen penanda (gen marker) dengan perbandingan 4 : 1 untuk gen target.

Transformasi dan Seleksi

Penembakan plasmid menggunakan dua prosedur, yaitu (1) prosedur yang dikembangkan kemudian disempurnakan oleh Fauquet *et al.* (1996) dan (2) prosedur yang telah dilakukan oleh Sawant *et al.* (2000). Media regenerasi yang digunakan RNB (merupakan media NB yang ditambah dengan hormon BAP 4 mg/l dan NAA 0,8 mg/l) dan NK1N0,5 (media NB yang mengandung hormon kinetin 1 mg/l dan NAA 0,5 mg/l).

Uji Gus

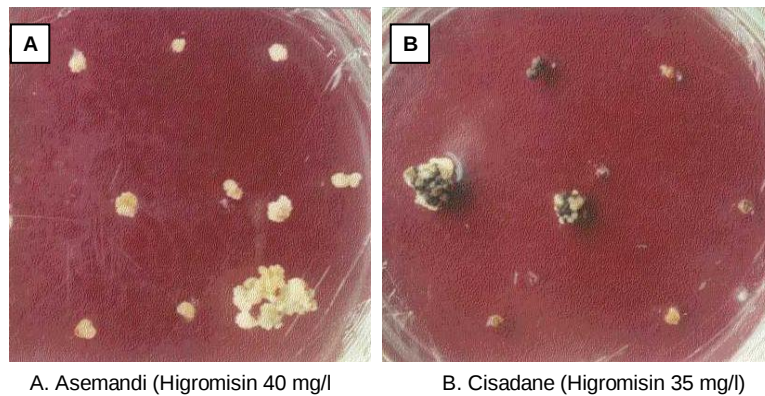
Ekspresi gen *gus* diuji berdasarkan metode Rueb *et al.* (1994) dengan substrat X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-inolyl glucoronide).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Teknik transformasi pada penelitian ini menggunakan biolistik yang mempunyai prinsip dasar untuk memindahkan gen dengan menggunakan mikroprojek-til berkecepatan tinggi agar dapat menembus lapisan luar sel untuk mengintroduksi material genetik ke dalam sel hidup (Birch dan Bower, 1994). 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 (Hunold *et al.*, 1994). Penembakan plasmid dilakukan dengan cara ko-transformasi antara plasmid *pRQ6* (yang berisi gen penanda *gus* dan gen penyeleksi *hpt*) dan *pUBB/pUBC* (berisi gen *cryIAb/cryIAc*) dengan perbandingan molaritas 1 : 4. Dengan perbandingan ini diharapkan persentase masuknya gen target (*cryIAb/cryIAc*) ke dalam sel akan lebih tinggi dibandingkan dengan gen penanda dan gen penyeleksi.

Materi penembakan yang digunakan adalah kalus embriogenik yang berasal dari embrio tua padi. Kalus embriogenik hasil subkultur pada media induksi kalus (NB) yang mengandung hormon 2,4-D dipanen dan ditempatkan pada media osmotikum selama 4 jam sebelum dilakukan penembakan plasmid. Media osmotikum adalah media NB yang mengandung manitol dan sorbitol dengan konsentrasi tinggi (1,2 M). Perlakuan ini dimaksudkan 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* dari transforman jagung 6,8 kali lebih tinggi setelah dilakukan penembakan plasmid (Vain *et al.*, 1993). Setelah 4 jam dalam media osmotikum kemudian dilakukan 2 kali penembakan plasmid dengan tekanan vakum 27 cm Hg dengan jarak penembakan 7 cm.

Kalus yang telah ditembak kemudian dipindah ke media seleksi. Untuk varietas Taipei-309 dan Asemendi digunakan media seleksi (NB) yang mengandung higromisin 40 mg/l sedangkan untuk varietas Bio I dan Cisadane digunakan media seleksi (NB) mengandung 35 mg/l higromisin. Hal ini berdasarkan penelitian tahun sebelumnya 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 karena konsentrasi higromisinnya terlalu tinggi. Oleh karena itu, untuk penelitian tahun 2001 konsentrasi higromisin pada media



Gambar 1. Kalus yang tahan pada media seleksi

seleksi diturunkan. Kalus yang tahan terhadap media seleksi, kemudian disubkultur ke media yang sama untuk memastikan bahwa kalus tersebut benar-benar telah mengandung gen *pRQ6*. Untuk varietas Indica (Bio I dan Cisadane) pada seleksi tingkat pertama, kalus hasil penembakan ada yang tahan dan dapat berproliferasi, namun setelah kalus tersebut dipindah ke media seleksi kedua banyak yang mati (Gambar 1). Hal ini kemungkinan disebabkan kalus tersebut *escape*. Untuk mengatasinya, kemungkinan harus menaikkan konsentrasi antibiotik pada media seleksi.

Kalus yang tahan dengan sistem seleksi berjenjang jumlahnya akan terus menurun sampai pada tahap regenerasi (Tabel 1 dan 2). Hal ini dapat dimengerti, karena hanya kalus yang benar-benar mengandung gen ketahanan yang dapat lolos sampai tingkat regenerasi. Kalus yang dapat lolos sampai tahap regenerasi berkisar antara 0-20,5% untuk kalus yang telah ditembak dengan plasmid *pUBB* dan *pRQ6* dan 1,4-4,0% untuk kalus yang telah ditembak dengan *pUBC* dan *pRQ6*. Namun demikian, tidak semua kalus dapat membentuk tanaman hijau (planlet), hanya 8,2-8,8% kalus dapat membentuk planlet yang mengandung plasmid *pUBB*, dan 0-0,5% kalus dapat membentuk planlet yang mengandung plasmid *pUBC*. Pada tahap *green spot*, kalus yang ditembak dengan plasmid *pUBB* mencapai 0,55-3,88% dan pada kalus yang ditembak dengan plasmid *pUBC* mencapai 0,55-1,4%, sedangkan kalus dari varietas Bio I dan Cisadane belum dapat beregenerasi. Selain itu, kalus yang berasal dari empat varietas yang digunakan sebagai sumber eksplan menunjukkan respon yang berbeda setelah dilakukan penembakan plasmid. Respon kalus yang paling tinggi regenerasinya adalah varietas Taipei-309 (Japonica), Asemandi (Javanica), Bio I, dan Cisadane (Indica). Hal ini berarti sumber eksplan (genotipe) 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 pada tanaman padi Javanica, Indica, dan Japonica.

Pada penelitian ini digunakan dua prosedur transformasi, yaitu prosedur Fauquet *et al.* (1996) dan prosedur Sawant *et al.* (2000) yang merupakan prosedur Fauquet yang dimodifikasi. Hasil yang diperoleh dalam membandingkan kedua prosedur ini disajikan pada Tabel 1 dan 2. Penggunaan prosedur transformasi ke-dua, lebih banyak menghasilkan kalus yang tahan terhadap media seleksi dibandingkan dengan prosedur transformasi pertama. Hasil ini membuktikan bahwa penggunaan prosedur transformasi kedua lebih efisien dibandingkan dengan prosedur penembakan yang pertama. Pada prosedur Sawant *et al.* (2000), partikel emas dioven (dikeringkan) semalam pada suhu 180°C dan preparasi DNA menggunakan isopropanol, sedangkan pada prosedur Fauquet *et al.* (1996) partikel emas tidak dioven dan preparasi DNA menggunakan ethanol absolut. Menurut Sawant *et al.* (2000), perlakuan tersebut dapat menaikkan efisiensi transformasi, ditunjukkan oleh kalus yang ditembak dengan prosedur tersebut dapat menghasilkan *blue spot* 7 kali lebih banyak daripada kalus yang ditembak dengan menggunakan prosedur biasa. Pada prosedur Sawant *et al.* pengeringan yang dilakukan pada partikel emas dan penggunaan isopropanol dalam preparasi DNA, kemungkinan dapat mengurangi penggumpalan pada partikel emas dan pengikatan DNA pada partikel emas dapat meningkat, sehingga presipitasi DNA ke dalam sel/jaringan lebih optimal.

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

Prosedur transformasi	Varietas	Jumlah eksplan	Jumlah kalus yang tahan pada media seleksi				Jumlah kalus beregenerasi		Jumlah kalus dengan spot hijau
			NH	PRNH	RNB	NK1N0,5	RNB	NK1N0,5	
1	Taipei-309	170	28	25	25(14,7)	-	14(8,2)	-	2(1,2)
	Asemandi	180	13	7	2(1,1)	-	0	-	1(0,55)
	Bio I	135	5	0	0	-	0	-	0
	Cisadane	150	5	0	0	-	0	-	0
2	Taipei-309	180	45	40	37(20,5)	37	16(8,88)	12(6,66)	7(3,88)
	Asemandi	170	24	9	8(4,7)	8	0	-	3(1,76)
	Bio I	95	17	0	3(3,16)	0	0	-	0
	Cisadane	115	12	0	8(6,9)	0	0	-	0

1 = prosedur transformasi Fauquet *et al.* (1996), 2 = prosedur transformasi Sawant *et al.* (2000), NH = media seleksi NB + 40 atau 35 mg/l higromisin, PRNH = media preregenerasi NB + BAP 2 mg/l + NAA 1 mg/l + ABA 5 mg/l + 40 mg/l higromisin, RNB = media regenerasi NB + BAP 4 mg/l + NAA 0,8 mg/l, NK1N0,5 = media regenerasi NB + Kinetin 1 mg/l + NAA 0,5 mg/l.

Angka dalam tanda kurung menyatakan persentase

Tabel 2. Transformasi tanaman padi menggunakan mikroprojektil dengan plasmid *pUBC* dan *pRQ6* pada molaritas 4 : 1

Prosedur transformasi	Varietas	Jumlah eksplan	Jumlah kalus yang tahan pada media seleksi				Jumlah kalus beregenerasi		Jumlah kalus dengan spot hijau
			NH	PRNH	RNB	NK1N0,5	RNB	NK1N0,5	

1	Taipei-309	70	3	3	1(1,4)	-	0	-	1(1,4)
	Asemandi	50	2	2	2(4,0)	-	0	-	0
	Bio I	45	5	0	0	-	0	-	0
	Cisadane	50	2	0	0	-	0	-	0
2	Taipei-309	192	27	20	5(2,6)	-	1(0,5)	-	2(1,04)
	Asemandi	180	10	6	4(2,2)	-	0	-	1(0,55)
	Bio I	108	8	0	0	-	0	-	0
	Cisadane	112	7	0	0.	-	0	-	0

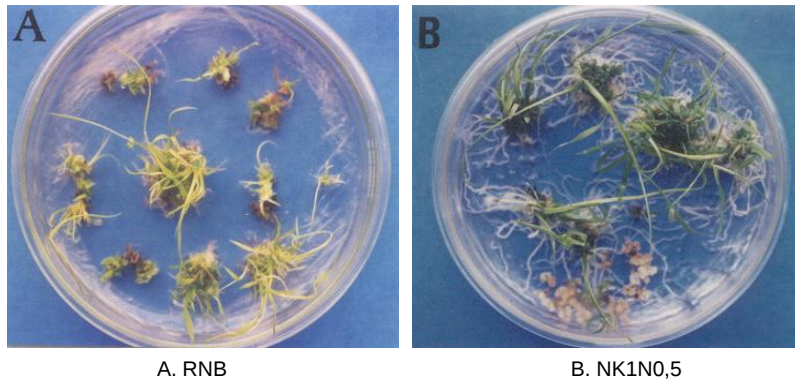
1 = prosedur transformasi Fauquet *et al.* (1996), 2 = prosedur transformasi Sawant *et al.* (2000), NH = media seleksi NB + 40 atau 35 mg/l higromisin, PRNH = media preregenerasi NB + BAP 2 mg/l + NAA 1 mg/l + ABA 5 mg/l + 40 mg/l higromisin, RNB = media regenerasi NB + BAP 4 mg/l + NAA 0,8 mg/l, NK1N0,5 = media regenerasi NB + Kinetin 1 mg/l + NAA 0,5 mg/l

Angka dalam tanda kurung menyatakan persentase

Tanaman hasil transformasi hanya diperoleh dari varietas Taipei-309 sedangkan Asemandi baru pada tahap *green spot*. Tanaman dari varietas Taipei-309 di-hasilkan dari 30 kalus hasil penembakan yang mengandung gen *cryIAb* dan 1 kalus yang mengandung gen *cryIAc*. Untuk meregenerasikan kalus hasil transformasi di-gunakan 2 formulasi media, yaitu RNB dan NK1N0,5. Dua belas dari 37 kalus Taipei-309 hasil transformasi yang mengandung gen *cryIAb* berhasil beregenerasi pada 2 macam media regenerasi tersebut. Namun demikian, morfologi tanaman yang dihasilkan sedikit berbeda, yaitu planlet yang tumbuh pada media NK1N0,5 lebih banyak membentuk akar dibandingkan dengan planlet yang tumbuh pada media RNB (Gambar 2). Hal ini kemungkinan disebabkan karena perbandingan hormon sitokinin (Kinetin) dan auxin (NAA) yang kurang berimbang di dalam media regenerasi.

Hasil uji *gus* pada kalus dan daun terhadap 74 tanaman T0 diperoleh 7 tanaman yang menunjukkan hasil positif berwarna biru dengan persentase 9,46%. Dari uji *gus* tersebut membuktikan bahwa DNA plasmid (*pRQ6*) telah masuk ke dalam tanaman yang juga didukung oleh ketahanan tanaman tersebut pada media seleksi yang mengandung higromisin

Dari hasil penelitian tahun ini baru varietas Taipei-309 yang menunjukkan hasil optimal, sedangkan varietas lain masih belum menunjukkan hasil yang meng-gembirakan. Oleh karena itu, sampai saat ini masih terus dilakukan penelitian, ter-utama optimasi media regenerasi untuk kalus padi Indica dan Javanica hasil pe-nembakan plasmid agar diperoleh tanaman yang cukup untuk seleksi dan diper-oleh transforman yang mengandung gen *cry*.



Gambar 2. Morfologi planlet yang dihasilkan dari media regenerasi

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan:

1. Telah diperoleh 283 tanaman putatif transgenik Taipei-309 dari hasil regenerasi 30 kalus yang mengandung gen *cryIAb* dan 1 kalus yang mengandung gen *cryIAc*.
2. Media regenerasi RNB dan NK1N0,5 keduanya dapat menghasilkan planlet.
3. Prosedur penembakan yang dikembangkan oleh Sawant *et al.* (2000) terbukti lebih efektif, dengan dihasilkannya lebih banyak kalus yang tahan pada media seleksi.
4. Uji *gus* terhadap 74 nomor tanaman, menunjukkan 7 (9,46%) tanaman memperlihatkan hasil positif.

DAFTAR PUSTAKA

- Ambarwati, A.D. 1993.** Regenerasi tanaman padi Javanica, Indica, dan Japonica. *Dalam* Prosiding Lokakarya Penelitian Komoditas dan Studi Khusus. S. Brotonegoro, T. Sudjana, A. Santika, dan A. Hardjamulia (*Eds.*). AARP, Badan Litbang Pertanian bekerjasama dengan Dirjen DIKTI. II:746-756.
- Birch, R.G. and R. Bower. 1994.** Principles of gene transfer using particle bombardment. *In* Sun-Yang, N. 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.
- Heinrich, E.A. 1980.** Varietal resistant to the brown planthopper and yellow stemborer. *In* Rice Improvement in China and Other Asia Countries. IRRI and Chinese Acad. Agric. Sci. p. 195-218.
- Hiei, Y., S. Ohta, T. Komari, and T. Kumashiro. 1994.** Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the DNA. *The Plant Journal* 6(2):271-282.
- Hunold, R., R. Bronner, and G. Hahne. 1994.** Technical advance. Early events in microprojectile.
- 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.
- Maqbool, S.B., T. Husnain, S. Riazuddin, L. Masson, and P. Christou. 1998.** Effective control of yellow stemborer and rice leaf folder in transgenic rice indica varieties Basmati 370 and M7 using the novel δ -endotoxin *cry2A* *Bacillus thuringiensis* gene. *Molecular Breeding*. p. 1-7.
- Pathak, M.D. and Z.R. Khan. 1994.** Insect pests of rice. IRRI. The Philippines.
- Rueb, S. and L.A.M. Hensgens. 1994.** Improved histochemical staining for β -D-glucuronidase activity in monocotyledonous plant. *In* Hiei, Y., S. Ohta, T. Komari, and T. Kumashiro (*Eds.*). 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. *Transgenic Research* 7:1-6.
- 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 *cryIAb* 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. Coocing, and M.R. Davey. 1988.** Transgenic rice plants produced by electroporation-mediated plasmid uptake into protoplasts. *Plant Cell Rep.* 7:379-384.