

# Evaluasi Diversitas Genetik Tanaman Padi Transgenik

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

*Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian*

## ABSTRAK

Perakitan varietas unggul yang tahan merupakan pilihan yang murah dan aman untuk pengendalian hama penggerek batang padi. Teknik pemuliaan konvensional masih menghadapi kendala untuk usaha tersebut karena belum ada varietas padi dengan tingkat ketahanan yang cukup untuk dikembangkan atau disilangkan. Pendekatan bioteknologi atau rekayasa genetik seperti teknik transformasi dapat dikembangkan untuk membantu program pemuliaan konvensional. *Bacillus thuringiensis* (Bt) diketahui menghasilkan suatu kristal protein yang ber-sifat toksin terhadap hama. Bt toksin yang dikode oleh gen *cry1A(b)* telah terbukti efektif terhadap hama dari golongan Lepidoptera, sehingga dapat digunakan untuk mengendalikan hama penggerek batang. Untuk menghasilkan tanaman transgenik melibatkan beberapa tahap dalam teknik biologi molekuler atau seluler, salah satunya adalah karakterisasi atau identifikasi gen yang telah di-introduksi ke dalam jaringan tanaman. Usaha tersebut bertujuan untuk mengkonfirmasi integritas gen yang diintroduksi dan menentukan jumlah kopinya di dalam genom tanaman, serta menentukan apakah gen tersebut dapat berfungsi dengan benar atau salah. Identifikasi dari jaringan tanaman yang tertransformasi dapat dilakukan dengan sejumlah teknik di antaranya adalah penggunaan teknik PCR dan analisis Southern Blot. Identifikasi gen *cry1A(b)* menggunakan amplifikasi PCR telah diperoleh 16 tanaman (dari 38 tanaman) T1 cv. Taipei-309 yang positif mengandung gen *cry1A(b)*. Pada analisis PCR I diperoleh 6 tanaman dan analisis PCR II diperoleh 10 tanaman positif. Tanaman padi yang positif PCR (pengujian I) ternyata juga positif pada analisis Southern Blot yang ditandai dengan terbentuknya 3 pita DNA. Hasil ini mengindikasikan bahwa gen *cry1A(b)* telah terintegrasi pada beberapa tempat pada genom tanaman padi. Hasil konfirmasi analisis PCR dengan bioasai menunjukkan bahwa ekspresi gen *cry1A(b)* tidak stabil yang diduga karena adanya pembungkaman gen (*gene silencing*) melalui proses metilasi gen.

**Kata kunci:** Transgenik, *Bacillus thuringiensis*, PCR

## ABSTRACT

The production of resistant varieties is economic and safe choice to control rice stem borer. The conventional rice improvement technique has several constraints due to the lack of high resistance rice varieties to be developed or crossed. Biotechnology approach or genetic engineering such as transformation technique can be developed to facilitate the conventional plant breeding program. The *Bacillus thuringiensis* (Bt) known produced the protein crystal that toxic to lepidopteran so that it can be used to control the rice stem borer. The production of transgenic plant involved several stages in molecular biology and cellular techniques, one of those is characterization or identification of the introduced gene into the plant genome. The characterization or identification aims to confirm the integrity of introduced gene and to decide the copy number in the plant genome as well as whether the gene function or not. Identification of the transformant can be conducted using some techniques such as PCR and Southern Blot analysis. The identification of *cry1A(b)* gene using PCR amplification result in 16 plants (from 38 plants) T1 cv. T309 that contains *cry1A(b)* gene. The Southern Blot analysis is now being conducted at the step of

restriction digestion of the total genomic DNA. Therefore, the result of Southern Blot analysis cannot yet be reported.

**Key words:** Transgenic, *Bacillus thuringiensis*, PCR

## PENDAHULUAN

Kehilangan hasil padi yang nyata tiap tahun disebabkan oleh adanya kendala faktor biotik dan abiotik. Kendala biotik utama dalam upaya peningkatan dan pengembangan varietas unggul selain hama wereng coklat (Hanarida dan Soewito, 1993) adalah hama penggerek batang padi. Perakitan varietas unggul yang tahan merupakan pilihan yang murah dan aman untuk pengendalian hama tersebut. Teknik pemuliaan konvensional masih menghadapi kendala untuk usaha tersebut karena belum ada varietas padi dengan tingkat ketahanan yang cukup untuk di-kembangkan atau disilangkan. Pendekatan bioteknologi atau rekayasa genetik seperti teknik transformasi dapat dikembangkan untuk membantu program pemuliaan konvensional.

Rekayasa genetik akan memperbaiki karakter penting seperti sifat ketahanan tanaman terhadap serangga (Bennet, 1993). Teknologi transformasi juga akan memberikan wahana bagi pemulia tanaman untuk memperoleh gen atau kelompok gen baru yang lebih luas. Suatu gen yang tidak terdapat pada suatu spesies tanaman tertentu dimungkinkan untuk dapat diperoleh dari organisme lain seperti bakteri, virus, binatang, dan tanaman lain (Herman, 1996).

*Bacillus thuringiensis* (Bt) diketahui menghasilkan suatu kristal protein yang bersifat toksin terhadap hama. Bt toksin yang dikode oleh gen *cry1A(b)* telah terbukti efektif terhadap hama dari golongan Lepidoptera, sehingga dapat digunakan untuk mengendalikan hama penggerek batang. Maqbool *et al.* (1998) menggunakan gen *cry2A* untuk merakit tanaman padi transgenik tahan hama penggerek batang kuning dan hama penggulung daun padi. Kloning dari gen protein kristal insektisidal dan ekspresinya pada tanaman transgenik akan memberikan alternatif untuk membantu strategi pemuliaan konvensional untuk proteksi terhadap serangan serangga.

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; Abedinia *et al.*, 1997; Khanna dan Raina, 1999) atau dengan penembakan partikel (Sudhakar *et al.*, 1998; Maqbool *et al.*, 1998).

Untuk menghasilkan tanaman transgenik melibatkan beberapa tahap dalam teknik biologi molekuler atau seluler, salah satunya adalah karakterisasi atau identifikasi gen yang telah diintroduksi ke dalam jaringan tanaman (Bennet, 1993). Keberhasilan teknik transformasi ditandai dengan keberhasilan menyisipkan rangkaian gen yang diintroduksi ke dalam genom

tanaman, dapat diekspresikan dan tetap terpelihara dalam seluruh proses pembelahan sel berikutnya. Maka diperlukan upaya untuk mengkonfirmasi integritas gen yang diintroduksi dan menentukan jumlah kopinya di dalam genom tanaman, serta menentukan apakah gen tersebut dapat berfungsi dengan benar atau salah. Identifikasi dari jaringan tanaman yang tertransformasi dapat dilakukan dengan sejumlah teknik di antaranya adalah penggunaan teknik PCR dan analisis Southern Blot (Chee *et al.*, 1991).

Pada penelitian sebelumnya, telah dihasilkan tanaman hasil transformasi dengan gen GUS, gen ketahanan higrormisin dan gen *cry1A(b)*, menggunakan teknik penembakan partikel. Hasil yang diperoleh ternyata belum memuaskan, karena varietas yang responsif terhadap kultur *in vitro* sangat menurun daya regenerasinya setelah dilakukan transformasi. Arencibia *et al.* (1998) melaporkan adanya somak-lonal sifat fenotip dan sifat fungsional di dalam populasi tanaman transgenik. Bahkan Arencibia *et al.* (1998) menemukan variasi somaklonal dari tanaman transgenik yang dihasilkan dengan elektroporasi protoplas dan pengujian lapang menunjukkan beberapa perubahan negatif baik morfologi atau fertilitas.

## BAHAN DAN METODE

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 37 tanaman padi generasi T1 dan 15 tanaman generasi T0 putatif transgenik cv. Taipei-309 hasil transformasi menggunakan penembakan partikel dengan plasmid *pUBB*.

### Isolasi DNA Jaringan Tanaman

DNA total genomik diekstraksi dari tanaman padi kontrol dan transgenik mengikuti prosedur Dellaporta *et al.* (1983) yang dimodifikasi. Daun diambil dan digerus dengan bantuan nitrogen cair. Hasil gerusan dimasukkan dalam tabung corning 50 ml dan ditambah bufer ekstraksi secukupnya serta diinkubasi pada suhu 65°C selama 15 menit pada waterbath. Larutan ditambah Chisam dengan perbandingan 1 : 1 dan dishaker selama 15 menit. Campuran disentrifugasi pada 4000 rpm selama 2 menit. Supernatan diambil dan dipindah ke tabung baru, kemudian ditambah ethanol absolut dingin. DNA yang terpresipitasi dicuci dengan ethanol 70% dan dikeringkan. DNA dilarutkan kembali dengan bufer TE.

### Analisis PCR

Kehadiran gen *cry1A(b)* yang diintroduksi ke tanaman diuji dengan PCR. Pengujian PCR dilakukan dengan total volume reaksi 25 µl mengandung 100 ng DNA genomik sebagai cetakan, 10 µM masing-masing dNTP, 1 unit enzim *Taq DNA Polimerase* dalam larutan bufer dan 0,2 µM masing-masing dari 2 primer spesifik untuk gen *cry1A(b)*. Sintesis urutan basa dari primer tersebut adalah 5'-CGA CAT CTC CTT GTC CTT GAC AC-3' dan 5'-ACA CCC

TGA CCT AGT TGA GCA AC-3'. Reaksi amplifikasi dilakukan berdasarkan metode Wang *et al.* (1993) yang di-modifikasi dengan menggunakan mesin PCR MJ Research PCT-100. Program PCR terdiri dari inkubasi awal pada suhu 94°C selama 5 menit dilanjutkan dengan 35 siklus pada suhu 94°C selama 1 menit, 45°C selama 1 menit, dan 72°C selama 2 menit. Siklus terakhir untuk pemanjangan akhir pada suhu 72°C selama 5 menit. Sebanyak 10 µl produk PCR digunakan untuk elektroforesis pada 1% gel agarose.

#### **Analisis Southern Blot**

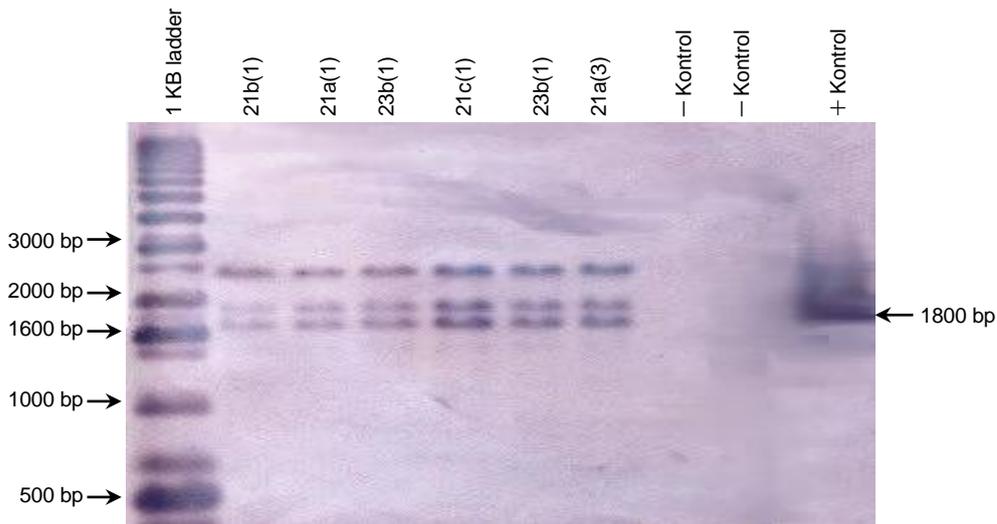
Analisis Southern Blot dilakukan mengikuti prosedur dari Panaud *et al.* (1993). DNA genomik (20 µg) dipotong menggunakan enzim restriksi *Bam*HI dan *Eco*RI. DNA yang terpotong difraksionasi pada gel agarose 1% selama semalam. Selanjutnya, DNA ditransfer (*blotting*) ke membran nylon hybond N<sup>+</sup> (Amersham). DNA fragmen dari gen *cry1A(b)* dipotong dengan enzim restriksi *Bam*HI dan *Eco*RI dan dilabel dengan pelabel *dig-UTP* (Boehringer Mannheim) menggunakan mesin PCR. DNA genomik tanaman padi pada membran dihibridisasi dengan probe yang terlabel dan dilakukan deteksi signal serta autoradiografi.

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **Identifikasi Gen *Cry1A(b)* dengan Amplifikasi PCR**

Analisis PCR merupakan metode deteksi secara cepat untuk mengetahui keberadaan transgen di dalam jaringan tanaman putatif transgenik. Pada metode ini, digunakan 2 primer nukleotida spesifik untuk mengamplifikasi daerah spesifik dari gen *cry1A(b)*. Fragmen DNA yang dihasilkan dari amplifikasi gen tersebut akan mempunyai ukuran 1000 pasangan basa (1 Kb). Hasil penelitian tahun 2000 menunjukkan bahwa dari pengujian PCR I telah diamplifikasi sebanyak 24 tanaman T1 (cv. Taipei-309) putatif transgenik. Dari 24 tanaman tersebut, diperoleh 6 tanaman yang menunjukkan positif mengandung gen *cry1A(b)*. Ini ditandai dengan terbentuknya pita DNA yang mempunyai ukuran seperti yang diharapkan (1000 bp). Sementara pada pengujian PCR II, dilakukan amplifikasi sebanyak 14 tanaman T1 (cv. Taipei-309) putatif transgenik dan diperoleh 10 tanaman yang menunjukkan positif mengandung gen *cry1A(b)*. Kesepuluh tanaman tersebut adalah 21a(2), 21a(10), 21a(11), 21c(1), 21c(3), 23a(3), 23a(9), 23b(2), 23b(12), dan 23b(14).

Pada penelitian tahun 2001, dilakukan pengujian PCR III sebanyak 19 tanaman T1 putatif transgenik tetapi tidak ada satu pun dari 19 tanaman tersebut mengandung gen *cry1A(b)*. Sebenarnya 19 tanaman putatif tersebut berasal dari 1 kalus sehingga ketika dilakukan pengujian PCR apabila satu tanaman tidak mengandung gen *cry1A(b)* maka kemungkinan tanaman yang lain juga tidak mengandung gen tersebut. Pengujian PCR sebaiknya dilakukan pada generasi T0 sehingga ketika tanaman tersebut tidak mengandung gen



M = 1 Kb ladder, 1-6 = tanaman putatif transgenik, 7-8 = tanaman tidak ditransformasi (kontrol negatif), 9 = kontrol positif (plasmid *pSBB*)

**Gambar 1.** Hasil analisis Southern Blot dari DNA sampel tanaman T1 putatif transgenik (cv. Taipei-309) yang dipotong dengan enzim *EcoRI* dan *BamHI*

target bisa langsung dibuang, tetapi karena kendala waktu dan ketersediaan bahan maka pengujian ini baru bisa dilakukan pada generasi T1.

Pengujian PCR IV dilakukan pada 9 tanaman putatif transgenik generasi T0. Dari kesembilan tanaman putatif transgenik juga tidak ada yang mengandung gen *cry1A(b)*. Akan tetapi, meskipun tidak ada yang positif mengandung gen *cry1A(b)*, informasi ini akan bermanfaat karena tanaman yang tidak mengandung gen target tersebut dapat dibuang seawal mungkin sehingga tidak banyak memakan waktu dan biaya serta bahan penelitian.

Pada pengujian PCR V, telah diamplifikasi sebanyak 28 tanaman yang terdiri dari 10 tanaman generasi T0 (4 di antaranya merupakan tanaman T0 yang pernah diamplifikasi pada pengujian PCR IV) dan 18 tanaman generasi T1. Hasil amplifikasi PCR ditampilkan pada Gambar 1. Pada pengujian PCR V diperoleh 11 sampel tanaman dari generasi T1 yang positif mengandung gen *cry1A(b)*. Kesebelas tanaman tersebut adalah 22a, 22c, 22f, 22g, 22h, 22j, 22k, 23b, 24, 26a, dan 26c. Setelah dilihat lebih lanjut ternyata dari kesebelas tanaman yang positif tersebut hanya berasal dari 2 kalus yang berbeda. Tanaman 22a, 22c, 22f, 22g, 22h, 22j, 22k, 24, 26a, dan 26c berasal dari kalus T5h, sedangkan tanaman 23b berasal dari kalus T5b. Terdapat sampel tanaman yang mengandung gen *cry1A(b)* dan tidak mengandung gen *cry1A(b)*, meskipun berasal dari kalus yang sama, menunjukkan bahwa tanaman tersebut telah mengalami segregasi pada generasi T0 sehingga ada variasi pada generasi T1-nya.

## Identifikasi Gen *Cry1A(b)* Menggunakan Analisis Southern Blot

Identifikasi tanaman transgenik menggunakan amplifikasi PCR dari transgen sangat penting karena dengan teknik tersebut dapat mengidentifikasi tanaman putatif transgenik secara cepat dan dalam jumlah yang banyak. Jadi dengan teknik tersebut akan menghemat waktu dan tenaga. Akan tetapi, informasi mengenai gen target yang telah ditransfer akan menjadi fungsional tidak dapat dijelaskan dengan teknik PCR. Maka dari itu, identifikasi transgen perlu dilakukan menggunakan analisis Southern Blot. Dengan metode ini akan diketahui informasi tentang jumlah kopi dari gen target sehingga level ekspresi dari masing-masing gen target yang ditransfer dapat ditentukan.

DNA dari 6 tanaman T1 yang positif PCR pada pengujian I digunakan sebagai bahan untuk analisis Southern Blot. Setelah dipotong dengan 2 enzim restriksi *EcoRI* dan *BamHI* yang merupakan enzim pengapit gen *cry1A(b)* (sekitar 1,8 kb), DNA ditransfer ke membran nylon dan selanjutnya dihibridisasi dengan probe spesifik gen *cry1A(b)* serta dideteksi dengan senyawa chemiluminesen (NBT-BCIP). Hasil hibridisasi Southern Blot menunjukkan bahwa 6 sampel tanaman yang positif pada pengujian PCR ternyata juga positif pada analisis Southern Blot-nya yang ditandai dengan terbentuknya 3 pita DNA. Hasil ini semakin membuktikan bahwa gen *cry1A(b)* yang ditembakkan telah terintegrasi ke dalam kromosom tanaman padi. Pola pita DNA yang terbentuk sama karena sampel tanaman T1 yang diuji merupakan tanaman yang berasal dari kalus yang sama.

Dengan pemotongan menggunakan 2 macam enzim restriksi *EcoRI* dan *BamHI* seharusnya hanya akan dihasilkan 1 pita DNA yang mempunyai ukuran se-kitar 1,8 kb. Akan tetapi hasil pengujian Southern Blot ini terbentuk 3 pita DNA yang berukuran masing-masing 1,8; 1,9; dan 2,6 kb. Hasil ini menunjukkan bahwa gen *cry1A(b)* mungkin telah terintegrasi di beberapa tempat pada genom tanaman padi. Dari ketiga fragmen DNA tersebut, fragmen yang berukuran 1,8 kb bersesuaian dengan sekuen gen *cry1A(b)* utuh. Sementara 2 pita yang lain, berukuran lebih besar dari 1,8 kb. Hal ini diduga karena telah berubahnya salah satu atau kedua situs enzim restriksi (*EcoRI* dan *BamHI*) selama integrasi gen tersebut ke dalam genom tanaman.

Pengujian tahap terakhir di dalam upaya memperoleh tanaman transgenik adalah melihat ekspresi gen diintroduksi ke dalam tanaman tersebut. Setelah diketahui bahwa transgen terintegrasi ke dalam kromosom tanaman melalui analisis PCR dan Southern Blot, maka perlu dilakukan pengujian ekspresi toksin dari gen *cry1A(b)* (bioasai). Kegiatan bioasai dilakukan dengan menginfestasi serangga hama penggerek batang pada tanaman padi putatif transgenik. Hasil bioasai kemudian dikonfirmasi dengan hasil pengujian PCR dan Southern Blot. Pada Tabel 1 ditampilkan hasil analisis PCR II yang dikonfirmasi dengan hasil bioasai dari tanaman padi T1 putatif transgenik (cv. Taipei-309).

**Tabel 1.** Hasil analisis PCR II dan analisis bioasai tanaman padi T1 putatif transgenik (cv. Taipei-309)

| Contoh  | Hasil PCR | Bioasai      |
|---------|-----------|--------------|
| 21c(3)  | Positif   | Agak peka    |
| 23a(8)  | Negatif   | Sangat peka  |
| 21a(13) | Negatif   | Peka         |
| 21c(1)  | Positif   | Peka         |
| 23a(3)  | Positif   | Agak tahan   |
| 21b(13) | Negatif   | Sangat tahan |
| 23b(14) | Positif   | Peka         |
| 21c(14) | Negatif   | Sangat peka  |
| 21a(2)  | Positif   | Sangat peka  |
| 23b(2)  | Positif   | Peka         |
| 23b(12) | Positif   | Sangat peka  |
| 21a(11) | Positif   | Belum diuji  |
| 21a(10) | Positif   | Belum diuji  |
| 23a(9)  | Positif   | Peka         |

Dari Tabel 1 terlihat bahwa terdapat variasi hasil bioasai dari 14 sampel tanaman padi T1 putatif transgenik yang diuji. Dari hasil analisis PCR yang positif, tidak ada satu sampel pun yang menunjukkan adanya sifat ketahanan terhadap hama penggerek batang, kecuali satu sampel yang memberikan kategori agak tahan, yaitu 23a(3). Rata-rata kategori yang ditunjukkan dari sampel yang positif PCR adalah peka terhadap hama penggerek batang. Dari hasil ini menunjukkan bahwa meskipun gen *cry1A(b)* telah terintegrasi ke dalam kromosom tanaman, akan tetapi belum menjamin gen tersebut akan terekspresi dengan baik sehingga menghasilkan protein kristal yang toksik terhadap serangga hama penggerek batang. Tidak terekspresinya atau mungkin terekspresi dalam level yang cukup rendah dari gen *cry1A(b)* salah satu penyebabnya karena ada pembungkaman gen (*gene silencing*). Pembungkaman gen dapat terjadi pada tingkat transkripsi maupun pasca-transkripsi (Nugroho, 1996). Mekanisme pembungkaman gen pada penelitian ini diduga karena terjadinya metilasi melalui perpasangan DNA-DNA (DNA-DNA *pairing*). Hal ini dapat terjadi ketika beberapa salinan transgen terintegrasi sekaligus pada kromosom tanaman, baik pada posisi berurutan maupun dengan posisi yang berbeda dalam satu genom. Dan ini sesuai dengan hasil analisis Southern Blot yang mengindikasikan bahwa gen *cry1A(b)* terintegrasi pada sedikitnya 3 tempat yang berbeda pada kromosom padi. Jumlah kopi/salinan transgen yang berintegrasi ternyata berhubungan langsung dengan inaktivasi gen. Inaktivasi gen biasanya diikuti oleh metilasi. Jadi semakin banyak salinan transgen yang dimiliki semakin tinggi kemungkinan terjadinya metilasi pada transgen, sehingga ekspresi dari gen menjadi tidak stabil (tidak terekspresi).

## KESIMPULAN

Identifikasi gen *cry1A(b)* menggunakan amplifikasi PCR telah diperoleh 16 tanaman (dari 38 tanaman) T1 cv. Taipei-309 yang positif mengandung gen *cry1A(b)*. Pada analisis PCR I diperoleh 6 tanaman dan analisis PCR II diperoleh 10 tanaman positif. Tanaman padi yang positif PCR (pengujian I) ternyata juga positif pada analisis Southern Blot yang ditandai dengan terbentuknya 3 pita DNA. Hasil ini mengindikasikan bahwa gen *cry1A(b)* telah terintegrasi pada beberapa tempat pada genom tanaman padi. Hasil konfirmasi analisis PCR dengan bioasai menunjukkan bahwa ekspresi gen *cry1A(b)* tidak stabil karena ada pembungkaman gen (*gene silencing*) melalui proses metilasi gen.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Abedinia, M., R.J. Henry, A.B. Blakeney, and L. Lewin. 1997.** An efficient transformation system for the Australian rice cultivar, Jarrah. *Australian Journal Plant Physiology* 24:133-141.
- Arencibia, A., E. Gentinetta, E. Cuzzoni, S. Castiglione, A. Kohli, P. Vain, M. Leech, P. Christou, and F. Sala. 1998.** Molecular analysis of the genome of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants produced via particle bombardment or intact cell electroporation. *Molecular Breeding* 4:99-109.
- Bennet, J. 1993.** Genes for crop improvements. *Genetic Engineering* 16:93-113.
- Chee, P.P., R.F. Drong, and J.L. Slightom. 1991.** Using polymerase chain reaction to identify transgenic plants. *Plant Mol. Biol. Manual* C3:1-28.
- Dellaporta, S.T., J. Wood, and J.B. Hicks. 1983.** A plant DNA miniprep: Versi II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 14:19-21.
- Hanarida, I. dan T. Soewito. 1993.** Peningkatan ketahanan varietas padi terhadap wereng coklat (*Nilaparvata lugens* Stål.). *Buletin Penelitian* 6:1-24.
- Herman, M. 1996.** Rekayasa genetika untuk perbaikan tanaman. *Buletin Agrobio* 1(1):24-34.
- 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 T-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.
- 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  $\delta$ -endotoxin *cry2A* *Bacillus thuringiensis* gene. *Molecular Breeding* 00:1-7.
- Nugroho, S. 1996.** Beberapa faktor penyebab inaktivasi ekspresi transgen dan upaya mengatasinya. *Biotan* 1:7-9.
- Panaud, O., G. Magpantay, and S. McCouch. 1993.** A protocol for non-radioactive DNA labelling and detection in the RFLP analysis of rice and tomato using single copy probes. *Plant Mol. Biol.* 11(1).
- 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.
- Wang, H., M. Qi, and A.J. Cutler. 1993.** A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucleic Acids Res.* 21(17):4153-4154.