

## Transformasi Padi Indica Kultivar Batutegi dan Kasalath dengan Gen Regulator HD-Zip untuk Perakitan Varietas Toleran Kekeringan

### *Transformation of HD-Zip Regulatory Gene for Batutegi and Kasalath Indica Rice Cultivars for Improvement of Drought Tolerant Variety*

Enung Sri Mulyaningsih<sup>1\*</sup>, Hajrial Aswidinnoor<sup>2</sup>, Didy Sopandie<sup>2</sup>,  
Pieter B.F. Ouwkerk<sup>3</sup>, dan Inez Hortense Slamet Loedin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, Jl. Raya Bogor Km. 46 Cibinong 16911, Indonesia

<sup>2</sup>Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor (Bogor Agricultural University), Jl. Meranti Kampus IPB Darmaga 16680, Indonesia

<sup>3</sup>Institute of Biology IBL Leiden University Netherlands

Diterima 24 Desember 2009/Disetujui 15 Maret 2010

#### ABSTRACT

*Crop extensification in marginal dryland area mostly is constrained by extended dry season and water deficiency. Genetic engineering at the level of transcription factors (TF) is particularly a promising strategy in developing drought tolerant rice cultivar. HD-Zip genes are TF that function in plant adaptation to some environmental stresses including water deficit. The recombinant plasmid pC1301H Oshox6 which contained HD-Zip Oshox6 gene was placed under a drought inducible promoter called LEA promoter, gusA and hpt genes were driven with CaMV promoter. The aim of research was to obtain indica rice transgenic plants of Batutegi and Kasalath cultivars using pC1301H Oshox6 plasmid. Recombinant plasmid was transformed into immature rice embryos using Agrobacterium tumefaciens. Kasalath cultivar showed a better capacity to form embryogenic calli compared to Batutegi. Transformation efficiency of Batutegi is lower (1.5-10.3%) than Kasalath (2.2-28.3%). Regeneration efficiency is 25-83.3% and 7.7-100% for Batutegi and Kasalath, respectively. Number of putative transformant plantlets of Batutegi and Kasalath are 63 and 48 plantlets, respectively. Southern blot analysis (using hpt probe) on 12 independent lines of each Batutegi and Kasalath cultivars showed different gene copy number, ranging from one to four copies of gene.*

*Keywords: agrobacterium tumefaciens, LEA promoter, HD-Zip Oshox6, rice*

#### PENDAHULUAN

Salah satu upaya peningkatan produktivitas padi di Indonesia adalah dengan ekstensifikasi ke lahan marginal kering. Luas lahan kering potensial yang dapat dimanfaatkan mencapai 51 juta ha dimana 48 juta ha di antaranya berada di luar Jawa (Ar-Riza, 2002). Permasalahan utama ekstensifikasi pada lahan ini adalah cekaman kekeringan, sehingga perlu dikembangkan varietas padi gogo toleran kekeringan.

Padi toleran kekeringan dapat diperoleh melalui beberapa cara antara lain transformasi genetik. Hal yang penting dalam perakitannya ialah memahami mekanisme toleransi kekeringan. Sifat toleransi kekeringan disandikan oleh banyak gen sehingga Shinozaki dan Yamaguchi-Shinozaki (2007) mengelompokkan gen-gen ini dalam dua kelompok. Kelompok pertama ialah gen-gen terkait dengan perlindungan sel selama kekeringan (menjaga tekanan osmotik, perbaikan sel, detoksifikasi dan adaptasi

struktural) dan kelompok kedua terkait dalam mekanisme regulasi respon terhadap kekeringan (protein kinase, enzim-enzim terkait metabolisme phosphoinositide, dan faktor transkripsi (FT)).

Transformasi genetik pada level FT berpotensi untuk mendapatkan tanaman padi toleran kekeringan, karena FT berperan besar dalam meregulasi sejumlah gen lain yang bertanggung jawab terhadap sifat kekeringan. Beberapa gen regulator FT yang telah dikarakterisasi antara lain *DREB* (*dehydration responsive element binding*) (Yamaguchi-Shinozaki dan Shinozaki 2001), *SNAC* (*stress responsive NAC1*) (Hu *et al.*, 2006), dan *HD-Zip* (*Homeodomain leucine zipper*) (Meijer *et al.*, 1997; Meijer *et al.*, 2000). Peningkatan ekspresi gen-gen regulator ini pada berbagai tanaman dilaporkan dapat meningkatkan toleransi cekaman kekeringan (Scarpella *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2006).

Beberapa bukti menunjukkan bahwa HD-Zip terkait dengan adaptasi perkembangan tanaman terhadap cekaman lingkungan. Gen *HD-Zip* tanaman padi dikelompokkan dalam famili I, II, III yang terdiri dari 33 gen *HD-Zip Oshox* (*Oryza sativa homeobox*) yang posisinya tersebar dalam 12 kromosom. Dari jumlah tersebut baru dua gen *Oshox* yang

\* Penulis untuk korespondensi. e-mail : enungf@yahoo.com

telah diidentifikasi yaitu *Oshox1* (HD-Zip II) dan *Oshox4* (HD-Zip I) yang diregulasi oleh cekaman kekeringan. Pola ekspresi gen tersebut ada yang meningkat dan menurun ketika ada cekaman kekeringan yang ditentukan oleh tingkat sensitivitas tanaman terhadap cekaman kekeringan (Agalou *et al.*, 2008). Salah satu gen *Oshox* yang belum diidentifikasi ialah *Oshox6* (HD-Zip I) dengan pola regulasi meningkat ketika ada cekaman kekeringan.

Gen regulator FT cekaman kekeringan pada tanaman transgenik yang telah dilaporkan umumnya menggunakan promoter konstitutif seperti CaMV (*Cauliflower Mosaic Virus*). Penggunaan promoter tersebut dapat menghasilkan fenotipe tanaman yang tidak diharapkan (kerdil dan steril). Penggunaan promoter terinduksi kekeringan menjadi dasar pertimbangan karena promoter ini akan bekerja mengekspresi gen targetnya hanya jika ada induser. Salah satu promoter terinduksi cekaman kekeringan ialah *OsLEA3-1* (*late embryogenesis abundant*) yang memiliki ekspresi kuat hanya pada kondisi kekeringan dan memiliki ekspresi yang rendah pada saat kondisi normal (Xiao *et al.*, 2007).

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan padi gogo indica transgenik kultivar Batutegi dan Kasalath yang mengandung gen *HD-Zip Oshox6* dengan promoter *OsLEA* yang terintegrasi ke dalam genom.

### BAHAN DAN METODE

Benih padi kultivar Batutegi dan Kasalath diperoleh dari Balai Penelitian Padi Muara Bogor. Plasmid rekombinan yang digunakan ialah pC1301H *Oshox6* yang diperoleh dari Dr. Pieter B.F. Ouwkerk, PRI Leiden University. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI pada Oktober 2008 sampai dengan November 2009.

Benih belum masak (*immature*) yang berumur 8-12 hari setelah anthesis dari kultivar Batutegi dan Kasalath dikupas dan disterilisasi mengikuti prosedur yang dikemukakan Toki *et al.* (2006). Embrio *immature* dikeluarkan dari benih *immature* menggunakan pinset dalam ruang laminar. Embrio *immature* yang diambil berukuran 1.3-1.8 mm dan material ini digunakan untuk transformasi genetik.

Plasmid rekombinan pC1301H *Oshox6* (Gambar 1) ditransformasikan ke dalam sel kompeten *A. tumefaciens* strain EHA 105 dengan menggunakan elektroporator. *A. tumefaciens* ditumbuhkan 3 hari dalam medium AB yang mengandung 20 mg L<sup>-1</sup> rifampisin dan 50 mg L<sup>-1</sup> kanamisin pada suhu 28 °C. Bakteri diambil menggunakan spatula dan dilarutkan menggunakan media AAM (media AA

mengandung 0.1 M aseto-siringone) hingga kerapatan sel mencapai sekitar 0.3 pada panjang gelombang λ600.

### Transformasi Genetik ke dalam Embrio

Transformasi genetik menggunakan metode yang dikemukakan Hiei dan Komari (2006) yang dimodifikasi karena metode ini paling sesuai untuk kultivar Batutegi dan Kasalath berdasarkan penelitian sebelumnya (Mulyaningsih *et al.*, 2009). Material tanaman yang ditransformasi ialah embrio *immature* yang telah dipersiapkan sebelumnya. Pada saat regenerasi, kalus kultivar Batutegi yang telah cukup besar dan mulai menunjukkan warna kehijauan dipindahkan ke dalam media regenerasi RNM (sesuai dengan percobaan Hiei dan Komari, 2006). Pada Kasalath, kalus diregenerasikan dalam media R05 (media dasar MS + 30 g L<sup>-1</sup> sukrosa + 30 g L<sup>-1</sup> sorbitol + 1 mg L<sup>-1</sup> kinetin + 1 mg L<sup>-1</sup> NAA + 10 g L<sup>-1</sup> agarose tipe 1). Dua minggu kemudian plantlet yang terbentuk selanjutnya dikulturkan pada media perakaran (MS + 2 mg L<sup>-1</sup> NAA + 25 mg L<sup>-1</sup> higromisin). Plantlet dengan perakaran cukup kuat selanjutnya dipindahkan ke dalam media tanah dalam pot. Pengamatan dilakukan terhadap :

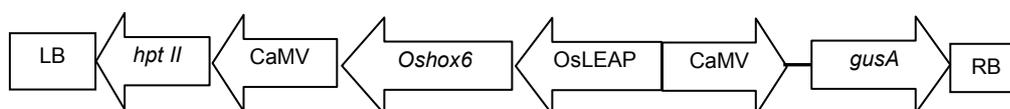
$$\text{Efisiensi transformasi (\%)} = \frac{\text{Jumlah embrio (kalus) tahan higromisin}}{\text{Jumlah embrio (kalus) awal ditransformasi}} \times 100\%$$

$$\text{Efisiensi regenerasi (\%)} = \frac{\text{Jumlah kalus beregenerasi}}{\text{Jumlah kalus tahan higromisin}} \times 100\%$$

### Analisis Integrasi Gen Metode Polimerase Chain Reaction (PCR)

Analisis PCR dilakukan untuk konfirmasi awal keberadaan gen sisipan pada tanaman generasi pertama (*T<sub>0</sub>*). Konfirmasi berdasarkan keberadaan gen penanda yang ada dalam daerah T-DNA (*hpt*) dalam genom. DNA genomik diisolasi dengan metode CTAB (*hexaethyl trimethyl ammonium bromide*) terhadap tanaman kontrol (tidak ditransformasi) dan terhadap kandidat tanaman transgenik hasil transformasi.

Primer yang digunakan ialah *hpt forward* 5'-GATGCCTCCGCTCGAAGTAGCG-3' dan *reverse* 5'-GCATCTCCC GCCGTGCAC-3' untuk gen *hpt*. Volume untuk 1x reaksi PCR ialah 12.5 µl dengan komposisi sebagai berikut: 6.25 µl taq polimerase kit (*dream taq*), 0.2 µM primer *hpt reverse*, 0.2 µM primer *hpt forward*, 100 ng DNA



Gambar 1. Skema daerah T-DNA dalam vektor transformasi pC1301H *Oshox6*. RB, Right border; *hpt II*, gen penyeleksi higromisin; CaMV, promoter dari *Cauliflower Mozaic Virus*; gen *Oshox6*; OsLEAP, promoter dari padi *late embryogenesis abundant*, gen penanda *gusA*; RB, Right Border.

hasil isolasi sebagai cetakan. Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan alat PCR Thermal Cycler (Biometra) pada kondisi PCR sebagai berikut: satu siklus denaturasi (95 °C, 3 menit); 30 siklus amplifikasi [denaturasi 95 °C 1 menit, *annealing* 65 °C 1 menit, sintesis 72 °C 1 menit]; 72 °C 10 menit (pemanjangan final); 4 °C (penyimpanan). Hasil PCR dianalisis pada 1% gel agarose. Gel diwarnai menggunakan ethidium bromida untuk visualisasi pita DNA produk PCR. Produk amplifikasi yang diharapkan muncul berukuran ±500 pb (pasang basa).

*Analisis Integrasi Gen dengan Southern Blot*

Analisis *southern blot* bertujuan untuk mengetahui pola integrasi gen sisipan dalam genom dan jumlah salinan gen tersebut. Pengujian dilakukan terhadap transforman generasi pertama ( $T_0$ ) dengan menggunakan DNA pelacak *hpt*. Metode *southern blot* memerlukan DNA genom sebagai DNA cetakan yang dianalisis. DNA tanaman diperoleh dari hasil isolasi daun dengan menggunakan metode CTAB. Sebanyak 10 µg DNA genom dipotong menggunakan enzim restriksi *BamHI* semalam. Setelah dipisahkan dalam agarose gel 0.8%, blotting dilakukan dengan metoda alkali transfer ke membran nilon bermuatan positif. Analisis *southern* hibridisasi mengacu kepada protokol kit dari GE Healthcare (Amersham, UK).

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

*Transformasi Genetik ke dalam Embrio Padi*

Hasil transformasi diperoleh dari empat kejadian (*event*) transforman untuk kultivar Batutegi dan tujuh *event*

untuk Kasalath masing-masing dari 50 dan 38 kali kegiatan transformasi (Tabel 1).

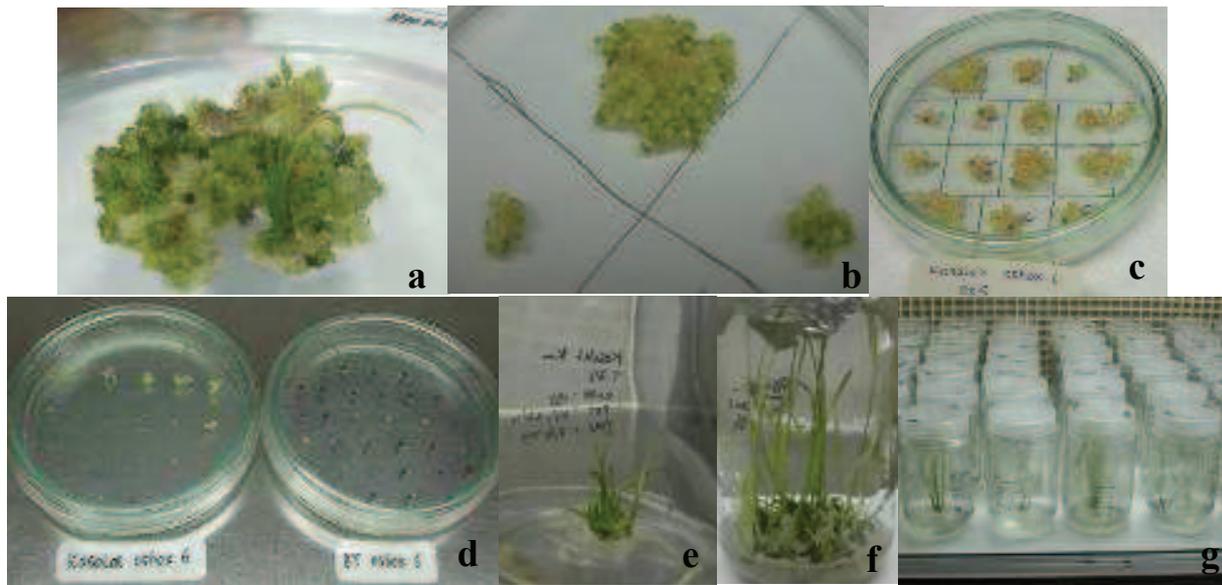
Kesulitan dalam transformasi padi indica antara lain rendahnya kemampuan embrio membentuk kalus embriogenik, rendahnya kalus beregenerasi, dan pencoklatan jaringan setelah kokultivasi (Lin dan Zhang 2005; Ramesh *et al.*, 2009). Selain itu, diduga pula rendahnya efisiensi transformasi pada indica terkait dengan antibiotik yang digunakan, karena antibiotik dapat bersifat meracuni kalus (Khanna dan Raina, 1999).

Rendahnya kemampuan embrio membentuk kalus embriogenik dan tahan higromisin nyata ditunjukkan oleh kultivar Batutegi. Persentase keberhasilannya adalah 2.8-10.3% sedangkan pada Kasalath 9.8-33.3%. Angka ini mempengaruhi nilai efisiensi transformasi yaitu 1.5-10.3% untuk Batutegi dan 2.2-28.3% untuk Kasalath. Rendahnya efisiensi transformasi pada percobaan ini memperkuat dugaan bahwa kultivar indica Batutegi dan Kasalath termasuk indica grup I yang dinamakan '*true indica rice*' (Zhang *et al.*, 1998) yang sebagian besar diantaranya merupakan kultivar rekalsitran untuk kegiatan kultur jaringan dan transformasi (Wünn *et al.*, 1996).

Jumlah tanaman transforman yang diperoleh mencapai 63 tanaman dari 11 embrio yang beregenerasi pada Batutegi dan 48 tanaman Kasalath dari 21 embrio beregenerasi. Hasil ini menggambarkan bahwa secara umum kemampuan kultivar Batutegi untuk beregenerasi lebih tinggi dibandingkan Kasalath. Satu embrio Batutegi dapat menghasilkan tanaman transforman lebih banyak dibandingkan Kasalath, walaupun pada satu *event* transformasi Kasalath diperoleh nilai efisiensi regenerasi 100%. Fenomena ini diduga karena Kasalath adalah varietas lokal Thailand yang termasuk indica, sedangkan Batutegi

Tabel 1. Ringkasan kegiatan transformasi pC1301H *Oshox6* pada kultivar Batutegi dan Kasalath

Kultivar	Jumlah embrio	Kalus embriogenik	Embrio tahan higromisin	Embrio regenerasi	Jumlah plantlet	Efisiensi transformasi (%)	Efisiensi regenerasi (%)
<b>BATUTEGI</b>							
I	85	4	4	1	2	4.7	25.0
II	58	6	6	5	20	10.3	83.3
III	196	16	3	2	21	1.5	66.7
IV	248	7	4	3	20	1.6	75.0
Total				11	63		
<b>KASALATH</b>							
I	99	32	7	1	1	7.1	14.3
II	100	10	7	1	1	7.0	14.3
III	338	70	20	3	7	5.9	15.0
IV	167	45	39	3	7	23.4	7.7
V	184	18	4	1	6	2.2	25.0
VI	85	19	2	2	8	2.4	100.0
VII	120	40	34	10	18	28.3	29.4
Total				21	48		



Gambar 2. Kegiatan transformasi dan regenerasi kultivar Batutegi dan Kasalath: a) Plantlet dan kalus embriogenik Batutegi dari satu embrio, b) Kalus embriogenik Batutegi, c) Kalus embriogenik Kasalath, d) Perbandingan antara embrio setelah kokultivasi pada Kasalath (kiri) dan Batutegi (kanan), e) Plantlet Kasalath, f) Plantlet Batutegi, g) Populasi plantlet dari kedua kultivar

adalah varietas unggul padi gogo hasil persilangan. Jadi kemungkinan ada tetuanya yang termasuk japonica tropis/javanica (Erwina Lubis, Pemulia padi gogo, komunikasi pribadi). Hal ini yang mungkin menyebabkan respon regenerasi Batutegi lebih baik dari pada Kasalath. Nilai efisiensi regenerasi Batutegi berkisar 25-83.3% sedangkan untuk Kasalath 7.7-100%. Hasil kegiatan dan regenerasi disajikan pada Gambar 2.

Hiei dan Komari (2006) telah menggunakan media regenerasi RNM dalam percobaannya terhadap 10 kultivar indica. Pada penelitian ini terlihat bahwa penggunaan media RNM untuk Batutegi telah menghasilkan plantlet dalam jumlah yang banyak juga menunjukkan bahwa media tersebut telah sesuai. Media RNM kurang tepat jika digunakan pada Kasalath karena seringkali daya regenerasi kalus menjadi hilang meskipun telah terbentuk spot hijau pada kalus ketika dalam media pra regenerasi (data tidak ditampilkan). Menurut Ge *et al.* (2006), potensi induksi kalus dan regenerasi kultur jaringan padi sangat tergantung pada beberapa faktor seperti genotipe tanaman donor, tipe dan status fisiologi eksplan, komposisi dan konsentrasi garam, komponen organik dan hormon pengatur pertumbuhan dalam media. Dari sejumlah faktor tersebut, perbedaan genotipe adalah yang paling penting. Ge *et al.* (2006) mengembangkan sistem kultur jaringan untuk peningkatan efisiensi regenerasi terhadap suatu seri *near isogenic line* dari kultivar IR 24 (4 genotipe) dan tiga kultivar indica lainnya. Genotipe padi yang digunakan ini mewakili keragaman plasma nutfah padi indica. Modifikasi yang dilakukan ialah pada media induksi kalus, media subkultur dan media regenerasi. Percobaan modifikasi media induksi kalus dan media regenerasi untuk meningkatkan efisiensi transformasi dan regenerasi juga dilakukan Lin dan Zhang (2005) dan Zaidi *et al.* (2006). Dalam penelitian ini media regenerasi

untuk Kasalath menggunakan media R05 (Slamet-Loedin, 2007 tidak dipublikasi).

#### Analisis Integrasi Gen

Analisis PCR dilakukan dengan menggunakan primer spesifik untuk gen penyeleksi *hpt*. Posisi gen *hpt* pada daerah T-DNA dalam plasmid pC1301H *Oshox6* berdampingan dengan LB (batas kiri). Keberadaan gen *hpt* dapat merupakan indikasi keberadaan gen lain dalam satu T-DNA yang sama. Dengan demikian jika hasil PCR menunjukkan keberadaan pita gen *hpt* dalam genom dapat mengindikasikan bahwa gen target sisipan OsLEAP + *Oshox6* juga telah terintegrasi dalam genom (Gambar 1). Keberadaan gen *hpt* dalam genom sebagai indikasi telah terintegrasinya gen target juga telah dilakukan sebelumnya (Zaidi *et al.*, 2006).

Hasil PCR menunjukkan bahwa 30 tanaman dari 37 tanaman kultivar Batutegi yang diuji mengandung gen *hpt*. Pada kultivar Kasalath, 20 tanaman dari 23 tanaman yang diuji mengandung gen *hpt*. Keberadaan gen *hpt* diamati berdasarkan munculnya pita hasil amplifikasi sebesar 500 pb. Hasil PCR dapat menunjukkan keberadaan pita *hpt* pada sebagian tanaman yang berasal dari satu *event* embrio yang sama, dan diduga bahwa tanaman-tanaman tersebut berkembang dari beberapa sel yang berbeda meskipun dari embrio yang sama. Ketahanannya dalam media yang mengandung higromisin diduga bersifat *escape*. Oleh karena itu perlu dilihat pola integrasi gen sisipan dalam genom untuk membedakan tanaman-tanaman tersebut secara genetik. Pola integrasi gen dilakukan dengan analisis *Southern blot*. Hasil PCR dapat dilihat pada Tabel 2 dan Gambar 3.

Hasil analisis *Southern blot* pada kultivar Batutegi

Tabel 2. Hasil analisis integrasi dan pola integrasi gen sisipan (OsLEAP + *Oshox6*) pada generasi pertama (T<sub>0</sub>) tanaman padi kultivar Batutegei dan Kasalath menggunakan primer *hpt* untuk PCR dan pelacak *hpt* untuk *Southern blot*.

Batutegei			Kasalath		
Kode	PCR	Salinan gen	Kode	PCR	Salinan gen
B-I.1.B	-	0	K-III.1.B	+	1
B-II.1.A	+	3*	K-III.2.A	+	1
B-II.1.B	+	1	K-III.2.B	+	1*
B-II.1.D	+	3*	K-III.2.C	+	1*
B-II.1.E	+	3	K-III.3.A	+	1
B-II.1.F	+		K-IV.1.A	+	1
B-II.1.G	+		K-IV.1.B	+	3
B-II.1.H	+		K-IV.2.A	+	3
B-II.2.A	+	1	K-IV.3.A	+	
B-II.3.A	+	1	K-IV.8.A	-	
B-II.4.A	+	1	K-IV.9.A	+	
B-II.4.B	+		K-V.1.A	+	1
B-II.5.C	+		K-V.1.B	+	1
B-II.5.D	+		K-V.1.C	+	
B-II.5.F	+		K-V.1.E	+	
B-III.1.A	+	1*	K-VI.1.F	+	
B-III.1.B	+	1*	K-VI.1.G	+	
B-III.1.C	-	0	K-VII.1.A	+	1
B-III.1.D	+	4	K-VII.2.A	-	0
B-III.1.E	+	3**	K-VII.3.A	+	2
B-III.1.F	-		K-VII.6.A	+	1
B-III.1.G	+	1*	K-VII.8.A	+	
B-III.1.H	+	1*	K-VII.9.A	-	
B-III.1.I	+	3**			
B-III.2.A	-	0			
B-III.2.B	-	0			
B-III.2.C	+	1			
B-III.2.D	-				
B-III.2.E	+				
B-III.2.G	-				
B-IV.1.A	+	1			
B-IV.1.B	+				
B-IV.1.C	+				
B-IV.1.D	+				
B-IV.1.G	+				
B-IV.2.B	+				
B-IV.3.B	+	1			

Keterangan: (+) = mengandung *hpt* (-) = tidak mengandung *hpt* ( ) = tidak diuji

\* / \*\* Jumlah bintang yang sama dalam satu *event* kalus yang sama bersifat *sister lines*

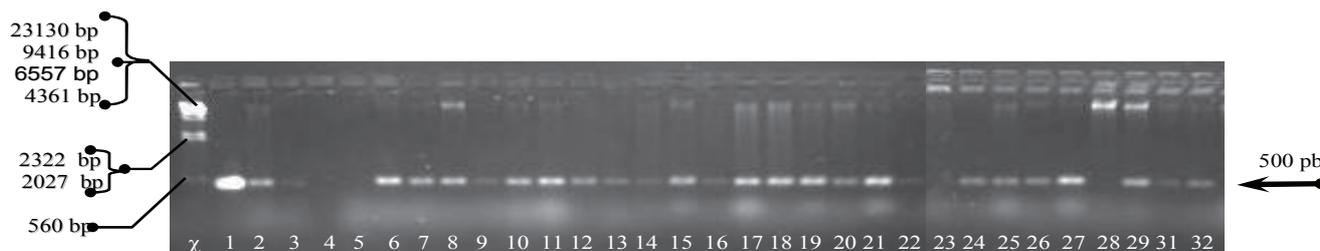
menunjukkan jumlah salinan gen sisipan antara 1-4 salinan dan pada Kasalath 1-3 salinan. Rincian jumlah salinan gen pada Batutegei ialah 11 tanaman dengan salinan tunggal, 5 tanaman dengan 3 salinan, 1 tanaman dengan 4 salinan dan 6 tanaman yang tidak menunjukkan keberadaan gen sisipan.

Sebaran jumlah salinan gen sisipan pada Kasalath ialah 10 tanaman dengan 1 salinan, 1 tanaman dengan 2 salinan, 2 tanaman dengan 3 salinan, dan 1 tanaman tidak menunjukkan jumlah salinan gen sisipan. Tidak terdeteksinya keberadaan salinan gen dalam genom tanaman diduga karena tanaman

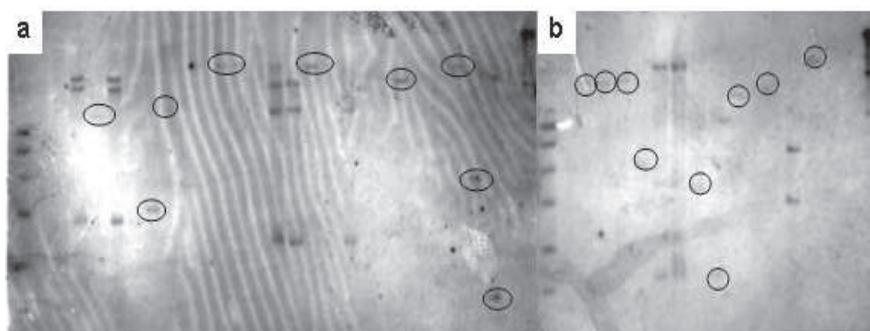
tersebut bukan transgenik.

Berdasarkan posisi integrasi dalam genom, gen sisipan dapat dipetakan. Tanaman-tanaman dari satu embrio yang sama dianggap seragam secara genetik apabila jumlah dan posisi gen sisipan dalam genom berada dalam pola yang sama. Tanaman yang demikian dinamakan *sister lines* (galur-galur kembar). Sebaliknya jika posisi dan jumlah gen sisipan berbeda meskipun berasal dari embrio yang sama maka secara genetik tanaman tersebut berbeda satu dengan yang lainnya. Hal ini terjadi karena pada saat

transformasi banyak sel dari kalus tanaman yang tersisipi, dan masing-masing sel tersebut akan membentuk tanaman. Tanaman-tanaman yang demikian dinamakan *independent line* (galur independen). Berdasarkan pola integrasi gen sisipan maka pada kultivar Batutegi diperoleh 12 galur independen masing-masing 8 galur dengan salinan tunggal, 3 galur dengan 3 salinan gen, dan 1 galur dengan 4 salinan. Sedangkan pada Kasalath diperoleh 12 galur independen, masing-masing 9 galur dengan salinan tunggal, 1 galur dengan 2 salinan dan 2 galur dengan 3 salinan (Tabel 2 dan Gambar 4).



Gambar 3. Hasil analisis PCR menggunakan primer *hpt* pada populasi Batutegi dan Kasalath hasil transformasi menggunakan pC1301H *Oshox6*;  $\lambda$ HindIII; 1. plasmid pC1301H *Oshox6*; 2. Batutegi K+; 3. Kasalath K+; 4. Batutegi K-, 5. Kontrol (air) 6-13 transforman Batutegi; 14-32 transforman Kasalath



Gambar 4. Hasil analisis *Southern blot* menggunakan pelacak *hpt* pada populasi Batutegi (a) dan Kasalath (b) hasil transformasi menggunakan pC1301H *Oshox6*. Lingkaran menunjukkan pola integrasi gen sisipan tunggal

## KESIMPULAN

Kemampuan membentuk kalus embriogenik dan tahan terhadap higromisin pada kultivar Batutegi lebih rendah dibandingkan kultivar Kasalath. Efisiensi transformasi adalah 1.5-10% untuk Batutegi dan 2.2-28.3% untuk Kasalath. Tanaman transforman Batutegi mencapai 63 dari 11 embrio beregenerasi dan 48 tanaman Kasalath dari 21 embrio beregenerasi. Kemampuan regenerasi kultivar Batutegi 25-83.3% dan 7.7-100% untuk kultivar Kasalath.

Tiga puluh tanaman kultivar Batutegi dan 20 tanaman Kasalath mengandung *hpt*. Berdasarkan pola integrasi gen sisipan diperoleh 12 galur independen masing-masing untuk Batutegi dan Kasalath, dengan jumlah salinan antara 1-4. Pada Batutegi diperoleh 8 galur dengan satu salinan, 3 galur dengan tiga salinan, dan 1 galur dengan empat salinan, sedangkan pada Kasalath diperoleh 9 galur dengan satu salinan, 1 galur dengan dua salinan dan 2 galur dengan tiga salinan.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Dr Satya Nugroho dan Dr Amy Estiati atas bantuan bahan kimia, diskusi dan sarannya. Terimakasih pula kepada Oktri Yurika atas bantuannya di laboratorium.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agalou, A., S. Purwantomo, E. Overnas, H. Johannesson, X. Zhu, A. Estiati, R.J. de Kam, P. Engstrom, I.H. Slamet-Loedin, Z. Zhu, M. Wang, L. Xiong, A.H. Meijer, P.B.F. Ouwkerk. 2008. A genome wide survey of HD-Zip genes in rice and analysis of drought responsive family members. *Plant Mol. Biol.* 66:87-103.
- Ar-Riza, I. 2002. Teknologi aplikatif produksi padi gogo di lahan kering beriklim basah. *Pertanian Lahan Kering*

dan Lahan Rawa (prosiding). Puslitbang Sosial Ekonomi Pertanian Badan Litbang Pertanian. Banjar Baru 18-19 Desember 2002.

- Ge, X., Z. Chu, Y. Lin, S. Wang. 2006. A tissue culture system for different germplasms of Indica rice. *Plant Cell Rep.* 25:392-402.
- Hiei, Y., T. Komari. 2006. Improved protocols for transformation of Indica rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 85:271-283.
- Hu, H., M. Dai, J. Yao, B. Xiao, X. Li, Q. Zhang, L. Xiong. 2006. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *PNAS.* 103:12987-12992.
- Khanna, H.K., S.K. Raina. 1999. *Agrobacterium*-mediated transformation of indica rice cultivars using binary and super binary vectors. *Aust. J. Plant Physiol.* 26:311-324.
- Lin, Y.J., Q. Zhang. 2005. Optimising the tissue culture conditions for high efficiency transformation of Indica rice. *Plant Cell Rep.* 23:540-547.
- Meijer, A.H., E. Scarpella, E.L. van Dijk, L. Qin, A.J. Taal, S. Rueb, S.E. Harrington, S.R. McCouch, R.A. Schilperoort, J.H.C. Hoge. 1997. Transcriptional repression by *Oshox1*, a novel homeodomain leucine zipper protein from rice. *Plant J.* 11:263-276.
- Meijer, A.H., R.J. De. Kam, I. d'Erfurth, W. Shen, J.H.C. Hoge. 2000. HD-Zip protein of family I and II from rice: interaction and functional properties. *Mol. Gen. Genet.* 236:12-21.
- Mulyaningsih, E.S., H. Aswidinnoor, D. Sopandie, P.B.F. Ouwerkerk, S. Nugroho, I.H. Slamet-Loedin. 2009. Transformation strategy for indica rice of Batutegi and Kasalath cultivars in attempt to discover drought-tolerant related genes. p. 489-500. *In* A. Malik, B. Prasetya, E. Chasanah, H. Minarsih, K. Mulya, K.G. Wiryawan, P. Lisdiyanti, S. Nugroho, Suharsono, T.M. Ermayanti, W. Purbowasito (Eds) Proceedings of The 4<sup>th</sup> Indonesian Biotechnology Conference. Bogor, 5-7 August 2008.
- Ramesh, M., V. Murugiah, A.K. Gupta. 2009. Efficient in vitro plant regeneration via leaf base segment of indica rice (*Oryza sativa* L.). *Indian J. Exp. Bio.* 47:68-74.
- Scarpella, E., E.J. Simons, A.H. Meijer. 2005. Multiple regulatory elements contribute to the vascular-specific expression of the rice HD-Zip gene *Oshox1* in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 46:1400-1410.
- Shinozaki, K., K. Yamaguchi-Shinozaki. 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J. Exp. Bot.* 58:221-227.
- Toki, S., N. Hara, K. Ono, H. Onodera, A. Tagiri, S. Oka, H. Tanaka. 2006. Early infection of scutellum tissue with *agrobacterium* allows high-speed transformation of rice. *Plant J.* 47:969-976.
- Wünn, J., A. Kloti, P.K. Burkhardt, G.C.G. Biswass, K. Launis, V.A. Iglesias, I. Potrykus. 1996. Transgenic Indica rice breeding line IR-58 expressing a synthetic *cryIAb* gene from *Bacillus thuringiensis* provides effective insect pest control. *Biol. Technol.* 14:171-176.
- Xiao, B., Y. Huang, N. Tang, L. Xiong. 2007. Overexpression of a LEA gene in rice improves drought resistance under the field condition. *Theor. Appl. Genet.* 115: 35-46.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., K. Shinozaki. 2001. Improving plant drought, salt and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. p. 176-189. *In* Rice biotechnology: Improving yield, stress tolerance and grain quality – No. 236. (Novartis Foundation Symposium), Willey, Chichester.
- Zaidi, M.A., M. Narayanan, R. Sardana, I. Taga, S. Postel, R. Johns, M. McNulty, Y. Mottiar, J. Mao, E. Loit, I. Altosaar. 2006. Optimizing tissue culture media for efficient transformation of different indica rice genotypes. *Agronomy Res.* 4:563-575.
- Zhang, S., W. Song, L. Chen, D. Ruang, N. Taylor, P. Ronald, R. Beachy, C. Fauquet. 1998. Transgenic elite indica varieties, resistant to *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. *Mol. Breeding* 4:551-558.