

Identifikasi Galur dan Gen-gen Terkait Toleran Kekeringan pada Padi Transgenik cv. T309 yang Mengandung Vektor Penanda Aktivasi

Tri J. Santoso*, Aniversari Apriana, Atmitri Sisharmini, dan Kurniawan R. Trijatmiko

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111
Telp. (0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820; *E-mail: trijsant@yahoo.com

Diajukan: 2 September 2013; Diterima: 4 November 2013

ABSTRACT

Identification of Lines and Genes Associated with Drought Stress Tolerance in Transgenic Rice cv. T309 Containing Activation-Tagging Vector. *Tri J. Santoso, Aniversari Apriana, Atmitri Sisharmini, and Kurniawan R. Trijatmiko.* Activation tagging is an efficient tool for functional analysis of the rice genes. We have developed a number of transgenic rice lines (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica* cv. Taipei 309) containing activation tagging vector. However, the phenotypes and genotypes of these lines, in relation to the drought stress, have not been analyzed. The objectives of this research were to identify transgenic rice lines that showed tolerance to the drought stress and to identify the genes that may be associated with the drought stress. The drought stress tolerance in transgenic rice lines was identified by testing their tolerance to the drought stress and also by detecting the presence of *bar* and *hptII* genes. The result showed that 56 out of 59 rice lines were resistant to Basta herbicide and three of them showed tolerance to drought stress, namely PA.T-1.2, PA.T-4.1, and PA.T-5.1 lines. PCR analysis showed that PA.T-1.2 and PA.T-4.1 contained both *hptII* and *bar* genes, while the PA.T-5.1 line contained *bar* gene only. *Thermal Asymmetric Interlaced-PCR* (TAIL-PCR) analysis showed that two genes may be associated with the drought stress tolerance. Those genes are *OSJNBa0004120.14* that produces *uridylylate putative kinase* and *OsPPCK2L* that produces *phosphoenolpyruvate carboxylase kinase*.

Keywords: Rice (*Oryza sativa* L.), activation tagging, drought stress tolerance, TAIL-PCR.

ABSTRAK

Identifikasi Galur dan Gen-gen Terkait Toleran Kekeringan pada Padi Transgenik cv. T309 yang Mengandung Vektor Penanda Aktivasi. *Tri J. Santoso, Aniversari Apriana, Atmitri Sisharmini, dan Kurniawan R. Trijatmiko.* Penanda aktivasi merupakan cara yang efisien untuk menganalisis fungsi gen-gen tanaman. Sejumlah galur tanaman padi transgenik cv. T309 yang mengandung vektor penanda aktivasi telah dihasilkan dari penelitian terdahulu. Galur-galur tersebut belum dianalisis fenotipe dan genotipenya dalam kaitannya dengan toleransi cekaman kekeringan. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi galur-

galur tanaman padi transgenik cv. T309 yang toleran terhadap kekeringan dan mengidentifikasi gen-gen yang mungkin berkaitan dengan sifat tersebut. Metode seleksi tanaman padi transgenik yang toleran kekeringan dilakukan dengan menguji ketahanannya terhadap Basta, menguji toleransinya terhadap kekeringan, dan mendeteksi keberadaan gen *bar* dan *hptII*. Gen-gen yang diduga terkait dalam mekanisme toleransi terhadap kekeringan diidentifikasi dengan analisis TAIL *Thermal Asymmetric Interlaced-PCR* (TAIL-PCR). Dari 59 tanaman transgenik putatif penanda aktivasi cv. T309 yang diuji, 56 tanaman toleran Basta. Dari 56 tanaman tersebut, tiga tanaman toleran terhadap kekeringan, yaitu galur PA.T-1.2, PA.T-4.1, dan PA.T-5.1. Hasil analisis PCR menunjukkan bahwa galur padi PA.T-1.2 dan PA.T-4.1 mengandung gen *bar* dan gen *hptII*, sedangkan PA.T-5.1 hanya mengandung gen *bar*. Hasil analisis TAIL-PCR pada PA.T-5.1, menunjukkan keberadaan dua gen yang mungkin terlibat dalam toleransi terhadap kekeringan, yaitu gen *OSJNBa0004120.14* yang menghasilkan *putative uridylylate kinase* dan gen *OsPPCK2L* yang menghasilkan *phosphoenolpyruvate carboxylase kinase*.

Kata kunci: Padi (*Oryza sativa* L.), penanda aktivasi, toleran kekeringan, TAIL-PCR.

PENDAHULUAN

Luas lahan yang mengalami kekeringan saat ini sudah sangat mengkhawatirkan. Menurut laporan dari Direktur Perlindungan Tanaman Pangan Kementerian Pertanian, lahan persawahan yang mengalami kekeringan tahun 2011 jauh lebih luas dibandingkan dengan tahun 2010. Selama bulan Januari hingga Juli 2011 lahan persawahan yang mengalami kekeringan sekitar 84.365 ha, sedangkan pada periode yang sama tahun 2010 sekitar 8.373 ha (Wahyudi, 2012). Oleh karena itu, pemerintah memerlukan langkah-langkah antisipatif dan strategis untuk mengatasi masalah kekeringan, antara lain dengan penanaman varietas padi toleran cekaman kekeringan. Varietas tersebut dapat dirakit dengan pendekatan pemuliaan konvensional atau rekayasa genetik.

Pengembangan varietas tanaman toleran kekeringan dapat dilakukan dengan pendekatan rekayasa genetik apabila tersedia gen toleran kekeringan. Gen-

gen yang berhubungan dengan toleran kekeringan dapat diidentifikasi dan diisolasi serta dipelajari lebih lengkap fungsinya. Gen-gen tersebut dapat digunakan untuk merakit varietas toleran kekeringan.

Identifikasi dan analisis fungsi gen dapat dilakukan melalui dua pendekatan, yaitu *forward genetics* dan *reverse genetics* (Bouchez dan Höfte, 1998). Pada pendekatan *forward genetics*, identifikasi dan analisis fungsi gen diawali dengan mengkarakterisasi fenotipe populasi mutan, kemudian dilakukan sekuen gen. Perbedaan fenotipe tertentu yang ditunjukkan oleh tanaman mutan ketika dibandingkan dengan tanaman tipe liarnya memungkinkan untuk mengidentifikasi sekuen gen yang bertanggung jawab terhadap perbedaan tersebut.

Penelitian terdahulu telah menghasilkan tanaman padi cv. T309 generasi T₁ yang mengandung vektor penanda aktivasi (Sisharmini *et al.*, 2009). Vektor penanda aktivasi berdasar transposon yang digunakan dalam penelitian ini adalah pAc-DsATag-Bar-gosGFP (Trijatmiko, 2005). Vektor penanda aktivasi ini mengandung dua elemen, yaitu elemen *Activator* (Ac) dan *Dissociation* (Ds). Elemen Ac mengkode enzim transposase di bawah kontrol promotor Ac yang disambungkan dengan gen *green fluorescent protein* (*gfp*) di bawah kendali promotor Gos. Elemen kedua, yaitu elemen Ds, berisi elemen 4× *enhancer* dari promotor CaMV 35S dan gen *bialaphos resistance* (*bar*) di bawah kendali promotor Ubiquitin. Elemen ini akan meningkatkan ekspresi gen-gen tetangga di dekatnya, yang menghasilkan fenotipe *gain of function* (Tani *et al.*, 2004).

Gen *bar* mengkode sifat ketahanan terhadap herbisida Basta (senyawa bialaphos atau disebut juga *phosphinothricin* (Kolesnik *et al.*, 2004). Keberadaan kedua gen dalam tanaman padi penanda aktivasi dapat digunakan untuk menentukan kestabilan padi penanda aktivasi tersebut. Tanaman padi penanda aktivasi, yang mengandung gen *bar* namun tidak mengandung gen *hptIII*, berarti bahwa posisi integrasi penanda aktivasi dalam genom padi telah stabil. Tanaman padi penanda aktivasi yang stabil adalah tanaman yang hanya mengandung komponen transposon Ds dan sudah tidak membawa elemen transposon Ac, sehingga elemen transposon Ds tidak bisa berpindah-pindah lagi. Elemen transposon Ac merupakan elemen yang menghasilkan enzim transposase sehingga elemen Ds untuk berpindah-pindah. Sementara itu, elemen transposon Ds itu sendiri tidak mampu menghasilkan enzim transposase sehingga elemen tersebut akan stabil atau tidak berpindah-pindah dan tetap berada dalam genom (Sallaud *et al.*, 2004).

Marsch-Martinez *et al.* (2002) berhasil mengembangkan populasi mutan tanaman *Arabidopsis thaliana* yang mengandung penanda aktivasi menggunakan transposon tersebut. Aharoni *et al.* (2004) berhasil mengidentifikasi tanaman-tanaman mutan dan gen yang bertanggung jawab terhadap sifat toleransi kekeringan dari populasi tanaman mutan tersebut.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi galur-galur tanaman padi transgenik penanda aktivasi cv. T309 yang toleran terhadap kekeringan dan mengidentifikasi gen-gen yang terlibat dengan sifat toleransi terhadap kekeringan.

BAHAN DAN METODE

Identifikasi Galur-galur Padi Transgenik cv. T309 yang Toleran Kekeringan

Penelitian ini menggunakan materi tanaman padi transgenik cv. T309 yang mengandung vektor penanda aktivasi generasi T₁ dan padi kontrol, yaitu cv. T309, IR20, Cabacu, dan Gajah Mungkur. Vektor penanda aktivasi yang digunakan untuk merakit tanaman padi transgenik disajikan pada Gambar 1.

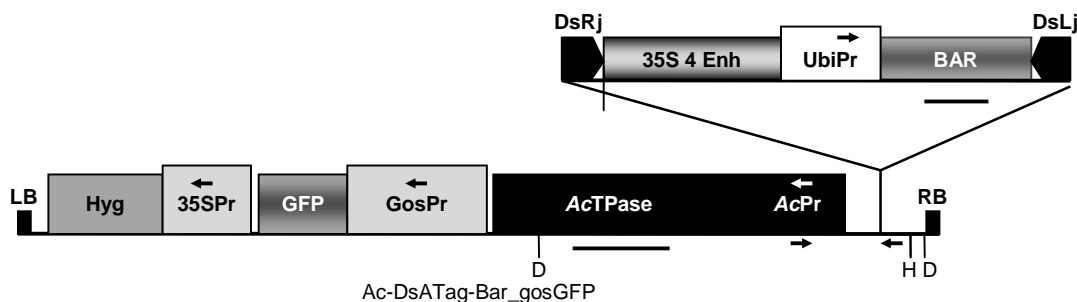
Uji Ketahanan Kecambah Padi terhadap Larutan Basta

Uji ketahanan kecambah padi terhadap larutan Basta menggunakan metode Wang dan Waterhouse (1997). Sebanyak 15 benih tiap varietas dioven selama 3 hari pada suhu 50°C, kemudian dipindahkan ke cawan petri yang beralaskan kertas saring. Benih disiram dengan air secukupnya pada pagi dan sore hari sampai berkecambah.

Kecambah berumur 2-3 hari diseleksi dengan memindahkan kecambah ke dalam media larutan Basta selama 6 hari. Konsentrasi larutan Basta yang digunakan adalah 200 mg/l. Kecambah padi dikategorikan tahan Basta apabila pertumbuhan tunas tidak terhambat dan tidak berwarna coklat, sedangkan kecambah peka Basta diindikasikan dengan tunas padi berwarna coklat dan pertumbuhan terhambat. Pengamatan dilakukan selama 12 hari, kemudian padi yang tahan Basta dipindahkan ke dalam pot berisi media tanam.

Uji Toleransi Tanaman Padi terhadap Cekaman Kekeringan

Bibit padi yang tahan Basta dan telah dipindahkan ke pot dengan diameter 15 cm yang berisi media tanam, kemudian diuji cekaman kekeringan. Pengujian cekaman kekeringan mengikuti prosedur dari Oh *et al.* (2005). Komposisi media tanam berupa tanah,



Gambar 1. Vektor penanda aktivasi berdasar transposon yang mengandung dua elemen, Ac dan Ds, pada daerah T-DNA-nya. LB = left border, Hyg = hygromycin phosphotransferase, 35SPR = promotor 35S, GFP = green fluorescent protein, GosPr = promotor Gos, AcTPase = Activator transposase, AcPr = promotor Activator, 35S 4 Enh = 35S 4x enhancer, UbiPr = promotor Ubiquitin, BAR = bialaphos resistance (gen ketahanan terhadap herbisida Basta), RB = right border, H = HindIII, D = DraI, DsRj = Dissociation Right Junction, DsLj = Dissociation Left Junction (Trijatmiko, 2005).

pasir, dan pupuk kandang, dengan perbandingan 1 : 1 : 1. Berat media tanam untuk masing-masing pot adalah 700 g. Setiap pot berisikan enam bibit padi. Sebelum bibit ditanam, media pot disiram dengan 200 ml air. Penyiraman dilakukan setiap hari pada pagi dan sore hari dengan jumlah air sebanyak 200 ml selama 3-4 minggu.

Padi yang telah dipindahkan ke media pot selama 3-4 minggu kemudian diberi perlakuan kekeringan selama satu minggu atau sampai tanaman kontrol peka mengalami kekeringan, dengan cara tidak diberi perlakuan penyiraman. Setelah diperlakukan kekeringan, padi disiram kembali dengan air sebanyak 200 ml air. Apabila setelah disiram kembali pada tanaman padi kontrol yang peka kekeringan masih mampu hidup kembali (*recovery*) maka perlakuan kekeringan dilanjutkan hingga tanaman kontrol mati. Tanaman padi yang mengalami *recovery* dibiarkan hidup selama 2-3 minggu dan digunakan untuk analisis molekuler.

Deteksi Keberadaan Gen *HptII* dan Gen *Bar*

Isolasi DNA tanaman padi transgenik terseleksi menggunakan metode *cetyltrimethylammonium bromide* (CTAB) yang dilakukan oleh Doyle dan Doyle (1990). Metode ini melalui tiga tahap, yaitu preparasi ekstrak sel, pemurnian DNA, dan presipitasi DNA. Pelet DNA dikeringkan di dalam oven selama 5 menit, kemudian dilarutkan dalam bufer TE yang mengandung ribonuklease (RNase) 20 mg/l dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. DNA siap diamplifikasi menggunakan PCR.

Amplifikasi DNA dilakukan pada total reaksi 20 µl yang terdiri atas 2,0 µl 10× bufer PCR (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8,3), 1,2 µl 50 mM MgCl₂, 0,4 µl 10 mM dNTP mix, 1 µl dari masing-masing primer (10 µM), 1 unit Taq DNA polimerase (5 unit/µl), dan 2 µl DNA cetakan. Primer yang digunakan adalah sepa-

sang primer untuk gen ketahanan Basta (*bar*) dan sepasang primer untuk gen seleksi *hptII*. Reaksi amplifikasi dilakukan dengan mesin PCR (PCT 100) dengan program tahap denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, penempelan primer pada suhu 60°C selama 30 detik, dan pemanjangan pada suhu 72°C selama 45 detik. Program PCR diulang sebanyak 35 siklus. Proses pemanjangan akhir pada suhu 72°C selama 5 menit. Setelah program PCR selesai selanjutnya dilakukan elektroforesis hasil PCR.

Sebanyak 10 µl produk PCR ditambahkan 1 µl *loading dye* dan dicampur sempurna, kemudian dimasukkan ke dalam sumur gel dan dilarikan dalam gel agarosa 1% pada tegangan listrik 80 volt. Gel agarosa diwarnai dengan larutan etidium bromida (10 mg/l) selama 10 menit, dan divisualisasi pada *UV Illuminator ChemiDoc EQ Biorad*.

Identifikasi Gen-gen yang Terlibat pada Sifat Toleransi Kekeringan

Penelitian ini menggunakan DNA total dari tanaman padi transgenik T309 terpilih, yang toleran kekeringan dan mengandung gen *hptII* dan atau gen Basta.

Isolasi DNA menggunakan metode Doyle dan Doyle (1990). DNA digunakan sebagai cetakan dalam *Thermal Asymetric Interlaced-PCR* (TAIL-PCR) untuk mengamplifikasi fragmen genom padi tempat terintegrasinya elemen penanda aktivasi pada mutan yang teraktivasi untuk karakter toleran kekeringan.

Analisis TAIL-PCR menggunakan pasangan primer *arbitrary degenerated* (AD) dan primer spesifik elemen transposon Ds. Proses TAIL-PCR dilakukan dalam tiga tahap. Pada tahap I, amplifikasi fragmen DNA dilakukan dengan primer DS5-1 dan primer AD-1, AD-3, dan AD-4. Pada tahap II, produk amplifikasi tahap I digunakan sebagai cetakan untuk amplifikasi fragmen DNA dengan primer DS5-2 dan AD-1, AD-3,

dan AD-4. Pada tahap III, produk amplifikasi tahap II digunakan sebagai cetakan untuk amplifikasi fragmen DNA dengan primer DS5-3 dan AD-1, AD-3, dan AD-4. Dengan menerapkan sistem "Nested PCR" (primer spesifik Ds untuk tahap II lokasinya lebih ke dalam dibandingkan dengan tahap I, dan primer spesifik Ds untuk tahap III lokasinya lebih ke dalam dibandingkan dengan tahap II).

Produk amplifikasi dari TAIL-PCR tahap III diligasikan dengan fragmen vektor *pGEM-T easy* (Promega), dan ditransformasikan ke *Escherichia coli DH5*. Koloni yang tumbuh di medium seleksi ditumbuhkan di medium LB cair, dan plasmid diisolasi dengan metode lisis alkali. Keberhasilan kloning dikonfirmasi dengan melakukan PCR menggunakan pasangan primer M13F-M13R dan memisahkan produk amplifikasi pada elektroforesis gel agarosa, dilanjutkan pewarnaan dengan EtBr dan visualisasi menggunakan perangkat *Chemidoc*.

Klon-klon DNA yang diperoleh kemudian disekuensekan dan data sekuense yang diperoleh di-*blasting* ke database di *gene bank* untuk memperoleh informasi tentang gen yang terkait dengan karakter toleran kekeringan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi Galur-galur Padi cv. T309 Transgenik yang Toleran Kekeringan

Ketahanan Kecambah Padi terhadap Larutan Basta. Hasil skrining menunjukkan bahwa semua galur padi transgenik tahan terhadap herbisida Basta, kecuali galur padi dengan kode PA.T-3 (Tabel 1). Dari 59 kecambah tanaman yang berasal dari sembilan galur transgenik putatif cv. T309 yang diuji, 56 kecambah tanaman tahan terhadap larutan Basta. Enam galur padi yang semua individu tanamannya (100%) menunjukkan tahan terhadap larutan Basta, yaitu

PA.T-1, PA.T-4, PA.T-5, PA.T-7, PA.T-8, dan PA.T-9 (Tabel 1). Hal ini mengindikasikan bahwa galur-galur padi transgenik yang diuji membawa gen ketahanan terhadap Basta (gen *bar*).

Skrining kecambah padi transgenik cv. T309 menggunakan larutan Basta merupakan salah satu metode skrining yang relatif sederhana dan cepat untuk mengidentifikasi adanya integrasi dari rakitan penanda aktivasi ke dalam genom padi. Seperti diketahui bahwa selain membawa elemen $4 \times$ *enhancer*, konstruk rakitan penanda aktivasi yang digunakan dalam penelitian ini juga membawa gen ketahanan terhadap herbisida Basta. Galur-galur padi yang mengandung penanda aktivasi dan tahan terhadap larutan Basta berarti galur-galur tersebut telah membawa gen ketahanan terhadap Basta. Skrining dengan larutan Basta juga telah dilakukan oleh Sisharmini *et al.* (2009) menggunakan teknik pengolesan daun padi dengan larutan Basta. Dengan teknik pengolesan, ketahanan padi transgenik terhadap Basta ditandai dengan tidak terbakarnya daun setelah pengolesan, sementara padi yang tidak tahan akan terbakar. Kelebihan teknik skrining ketahanan terhadap Basta dengan cara merendam benih saat perkecambahan dibandingkan dengan pengolesan pada daun adalah tanaman-tanaman padi yang tahan (membawa gen *bar*) akan diketahui lebih awal. Di samping itu, skrining lebih akurat karena benih dapat kontak langsung dengan larutan Basta, sementara dengan pengolesan hanya dilakukan pada ujung daun dan diduga respon ketahanannya akan dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti pencahayaan dan suhu.

Uji Toleransi Tanaman Padi terhadap Cekaman Kekeringan. Hasil pengujian toleransi tanaman terhadap kekeringan menunjukkan tiga tanaman dari tiga galur berbeda toleran terhadap kekeringan, yaitu PA.T-1.2, PA.T-4.1, dan PA.T-5.1 (Tabel 2). Tanaman toleran kekeringan ditandai dengan kemampuan pu-

Tabel 1. Jumlah kecambah padi transgenik penanda aktivasi cv. T309 yang tumbuh pada media seleksi Basta 200 mg/l.

Kode galur	Jumlah benih dikecambahkan	Jumlah benih berkecambah	Kecambah tahan Basta	
			Jumlah	Persentase
PA.T-1	15	13	12	92
PA.T-2	15	7	7	100
PA.T-3	15	0	0	0
PA.T-4	15	3	3	100
PA.T-5	15	12	12	100
PA.T-6	15	6	4	66
PA.T-7	15	2	2	100
PA.T-8	15	8	8	100
PA.T-9	15	8	8	100
Taipei 309	15	12	0	0

lih (*recovery*) dari daun yang layu setelah mengalami kekeringan selama 3-4 minggu dan daun menghijau kembali setelah disiram (Gambar 2). Tanaman peka daunnya akan berwarna coklat kering dan menggugul, beberapa anakan tampak patah/lunglai, dan tidak terdapat warna hijau pada seluruh bagian tanaman atau tanaman mati (Gambar 2).

Kontrol peka tidak mengalami pemulihan, termasuk kontrol padi yang selama ini diketahui toleran terhadap cekaman kekeringan, yaitu Gajah Mungkur dan Cabaccu. Gajah Mungkur dan Cabaccu adalah dua varietas padi yang toleran kekeringan dan sering digunakan sebagai pembandingan untuk daya tembus

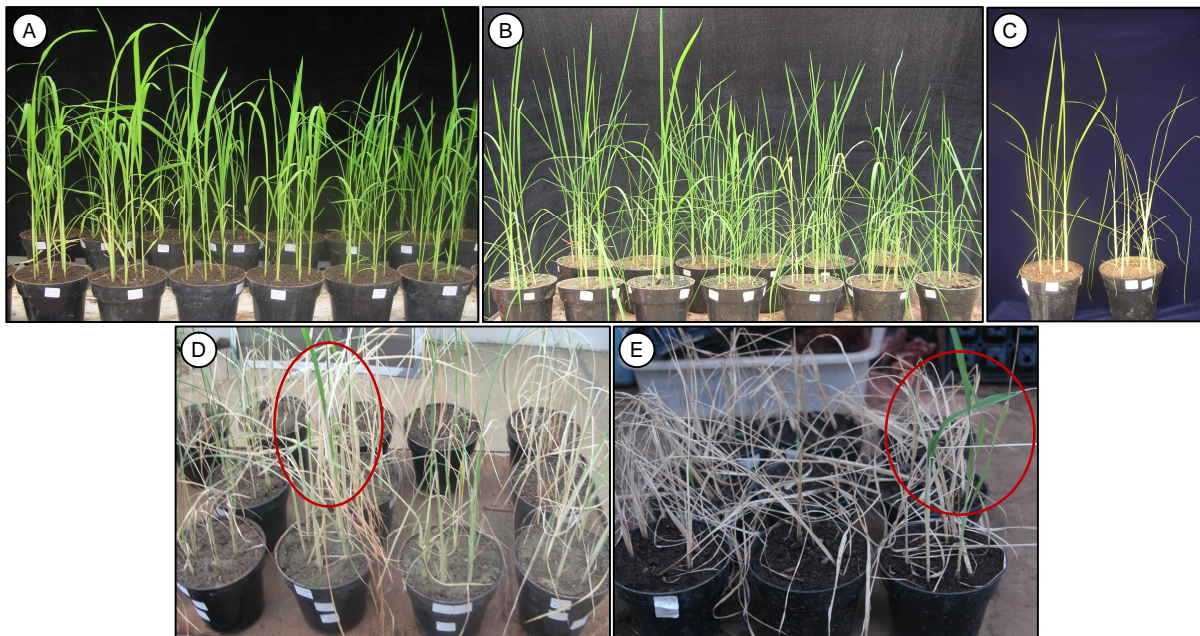
akar padi. Padi Gajah Mungkur adalah varietas yang selain toleran kekeringan juga berumur sangat genjah (Harahap *et al.*, 1995), serta mempunyai daya tembus akar yang tinggi (Suardi dan Abdullah, 2003). Selanjutnya, ketiga tanaman padi transgenik cv. T309 yang mempunyai kemampuan pemulihan dipelihara di rumah kaca dan digunakan sebagai bahan analisis molekuler.

Deteksi Keberadaan Gen *hptII* dan Gen *bar*.

Hasil amplifikasi PCR menggunakan sepasang primer *hptII* menunjukkan bahwa tanaman padi PA.T-1.2 dan PA.T-4.1 mengandung gen *hptII* dengan ukuran 500 bp, sedangkan tanaman padi PA.T-5.1 tidak mengan-

Tabel 2. Jumlah tanaman yang mempunyai kemampuan pulih (*recovery*) setelah diberi perlakuan cekaman kekeringan di rumah kaca.

Kode galur	Jumlah tanaman yang diberi perlakuan cekaman kekeringan	Tanaman yang dapat pulih (<i>recovery</i>)	
		Jumlah	Persentase
PA.T-1	12	1	8,33
PA.T-2	7	0	0
PA.T-4	3	1	33,33
PA.T-5	12	1	8,33
PA.T-6	4	0	0
PA.T-7	2	0	0
PA.T-8	8	0	0
PA.T-9	8	0	0
Taipei 309	12	0	0
Cabacu	12	0	0
Gajah mungkur	12	0	0
IR20	12	0	0



Gambar 2. Padi transgenik penanda aktivasi yang menunjukkan sifat toleransi terhadap perlakuan cekaman kekeringan. A = padi transgenik penanda aktivasi berumur sekitar 4 minggu yang siap untuk diberi perlakuan cekaman kekeringan, B = padi penanda aktivasi mulai diberi perlakuan kekeringan, C = penampilan tanaman padi transgenik penanda aktivasi toleran dan tidak toleran pada 5 hari setelah perlakuan, D dan E = tanaman padi penanda aktivasi yang mampu untuk pulih setelah perlakuan cekaman kekeringan.

dung gen *hptII* (Gambar 3A). Keberadaan gen *hptII* dikonfirmasi dengan keberadaan pita DNA berukuran 500 bp pada kontrol plasmid yang mengandung gen *hptII*.

Hasil amplifikasi PCR menggunakan primer gen *bar* menunjukkan bahwa tanaman padi PA.T-1.2, PA.T-4.1, dan PA.T-5.1 mengandung gen *bar*. Hal ini diketahui dari hasil amplifikasi DNA sebesar 500 bp (Gambar 3B). Tanaman yang mengandung gen *bar* mengindikasikan bahwa ketiga tanaman padi tersebut masih mengandung elemen transposon Ds karena gen *bar* berada dalam satu elemen dengan transposon Ds.

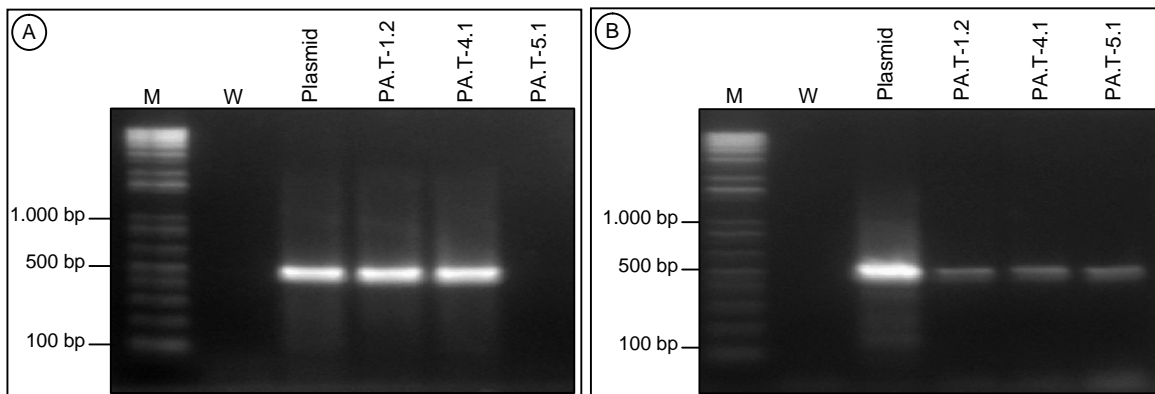
Berdasarkan keberadaan gen *hptII* dan gen *bar* dapat diketahui bahwa tanaman padi PA.T-5.1 mengandung gen *bar*, tetapi tidak mengandung gen *hptII*. Hal itu berarti bahwa tanaman padi PA.T-5.1 tersebut merupakan tanaman padi transgenik yang stabil. Elemen Ds yang berada dalam satu elemen dengan gen *bar* tidak mampu menghasilkan enzim transposase sehingga elemen tersebut stabil atau tetap berada pada suatu posisi dalam genom (Sallaud *et al.*, 2004).

Identifikasi Gen-gen yang Terlibat pada Sifat Toleransi Kekeringan

Analisis TAIL-PCR dilakukan untuk menentukan dan mengetahui sekuen gen yang berada di dekat sekuen elemen transposon yang telah diketahui. Tanaman padi transgenik yang mengandung elemen Ds berarti juga mengandung elemen 4x *enhancer* dari promoter CaMV 35S yang ditempatkan dalam transposon yang berfungsi sebagai pembawa (*carrier*) (Gambar 1). *Enhancer* dapat mengaktifkan proses transkripsi (*transcriptional activation*), sehingga apabila *enhancer* tersebut telah terintegrasi dalam genom maka dapat mengaktifkan ekspresi gen yang

berada di dekatnya. Ekspresi yang meningkat (*over-expression*) dari gen-gen dapat menghasilkan fenotipe baru yang berbeda dengan tanaman kontrol (non transgenik), sehingga penanda aktivasi tersebut dapat digunakan untuk mengidentifikasi fungsi suatu gen (Trijatmiko, 2005). Hilangnya ekspresi atau fungsi dari suatu gen (*loss of function*) dapat juga digunakan untuk mengidentifikasi fungsi gen, karena insersi elemen transposon berada pada bagian dari gen yang kehilangan fungsinya sehingga akan menghasilkan fenotipe baru. Oleh karena itu, evaluasi sifat tanaman yang berhubungan dengan toleransi terhadap kekeringan dilakukan dengan membandingkan antara tanaman padi cv. T309 transgenik yang mengandung penanda aktivasi dengan tanaman kontrol (non transgenik). Tanaman padi transgenik yang mempunyai toleransi terhadap kekeringan lebih tinggi daripada kontrol akibat keberadaan sisipan elemen 4x *enhancer* di dekat atau di tengah gen yang mengatur toleransi kekeringan.

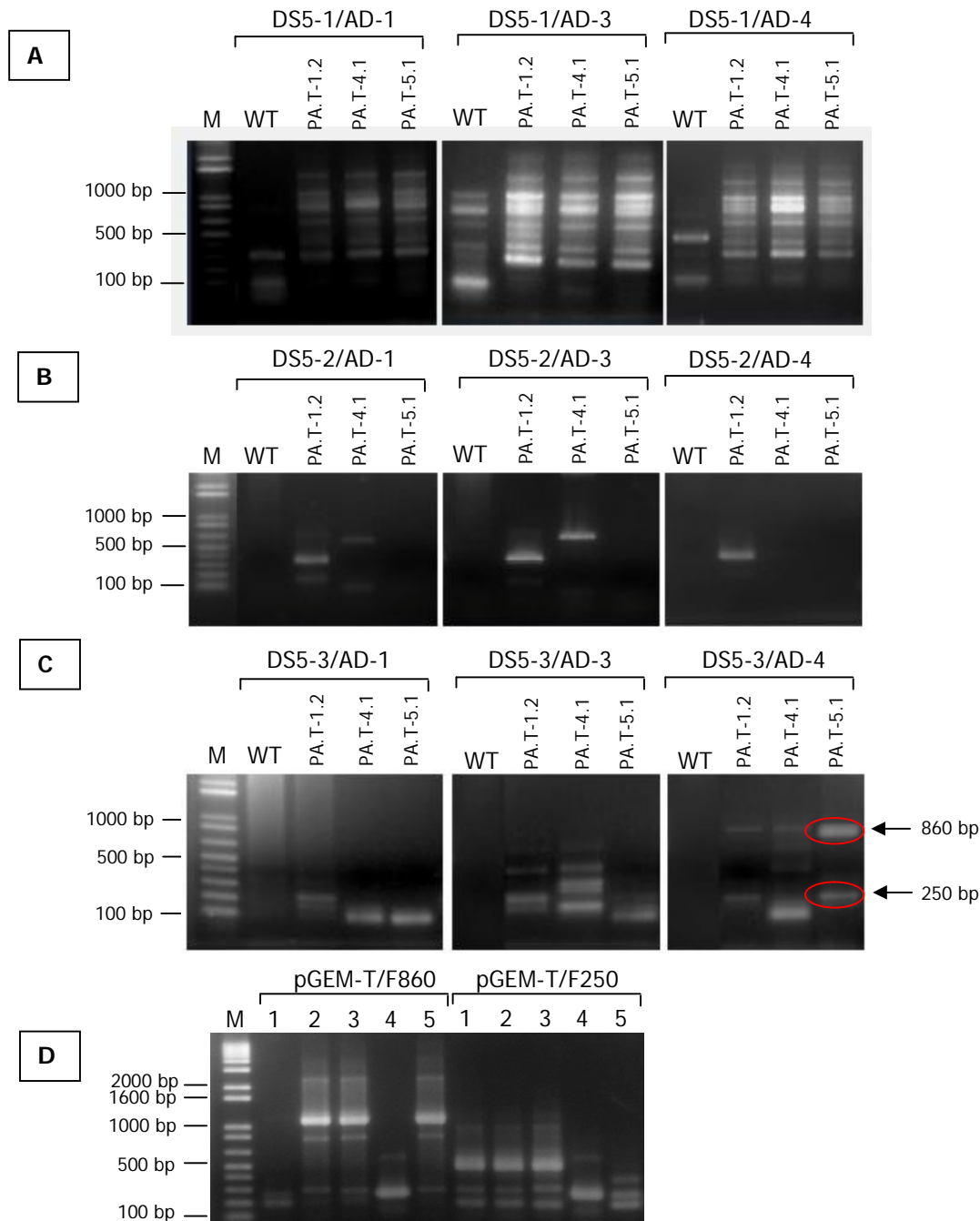
Analisis TAIL-PCR padi transgenik cv. T309 PA.T-1.2, PA.T-4.1, dan PA.T-5.1 menggunakan primer DS-5 yang dikombinasikan dengan primer *degenerate* AD-1, AD-3, dan AD-4 menghasilkan amplicon yang bervariasi dari TAIL-PCR I, II, maupun III (Gambar 4). Pada TAIL-PCR tahap I, padi transgenik menghasilkan 6-9 amplicon DNA, sedangkan padi kontrol (WT) menghasilkan 2-6 amplicon DNA. Pada TAIL-PCR tahap II, padi transgenik menghasilkan 1-3 amplicon DNA, sedangkan padi kontrol (non transgenik, WT) tidak menghasilkan amplicon DNA. Pada penelitian ini jumlah amplicon yang diperoleh pada TAIL-PCR II lebih sedikit dibandingkan dengan jumlah amplicon pada TAIL-PCR I. Pada TAIL-PCR III padi transgenik menghasilkan 1-3 amplicon DNA sedangkan padi kontrol tidak menghasilkan amplicon DNA. Amplicon-amplicon yang diperoleh pada TAIL-PCR III merupa-



Gambar 3. Hasil amplifikasi PCR pada tiga padi transgenik penanda aktivasi menggunakan primer gen *hptII* (A) dan *bar* (B), M = 1 kb plus DNA ladder (*Invitrogen*), W = air.

kan amplikon yang sudah spesifik sehingga dari amplikon tersebut dapat diidentifikasi sekuen gen yang diduga terkait dengan toleransi kekeringan. Untuk identifikasi sekuen gen yang diduga terkait dengan karakter toleran kekeringan digunakan ampli-

kon TAIL-PCR III dengan kombinasi primer DS5-3/AD-4 yang berasal dari tanaman padi PA.T-5.1. Amplikon itu dipilih karena berasal dari tanaman tanaman transgenik yang mengandung penanda aktivasi yang posisi integrasinya dalam genom telah stabil.



Gambar 4. Hasil analisis TAIL-PCR menggunakan primer DS-5 dan AD pada galur-galur padi transgenik penanda aktivasi terkait dengan sifat toleransi kekeringan. A = TAIL-PCR I dengan kombinasi primer DS5-1/AD-(1,3,4), B = TAIL-PCR II dengan kombinasi primer DS5-2/AD-(1,3,4), C = TAIL-PCR III dengan kombinasi primer DS5-3/AD-(1,3,4), D = verifikasi pGEM-T/F860 atau pGEM-T/F250 dengan *EcoRI*.

Amplikon dengan ukuran sekitar 860 bp dan 250 bp hasil TAIL-PCR III (tanda lingkaran merah pada Gambar 4C) diisolasi dan disisipkan ke vektor kloning *pGEM-T easy*. Penyisipan fragmen DNA 860 bp dan 250 bp ke vektor kloning *pGEM-T easy* telah menghasilkan koloni-koloni bakteri *E. coli*. Kebenaran penyisipan fragmen berukuran 860 bp dalam plasmid rekombinan pGEM-T/F860 dan penyisipan fragmen berukuran 250 bp dalam pGEM-T/F250 diverifikasi menggunakan enzim restriksi *EcoRI*. Hasil verifikasi menunjukkan bahwa pGEM-T/F860 dan pGEM-T/F250 masing-masing menghasilkan tiga plasmid rekombinan yang benar (pGEM-T/F860-2, -3, -5, pGEM-T/F250-1, -2, dan -3), yaitu mengandung fragmen-fragmen sisipan yang diinginkan (Gambar 4D).

Analisis sekuen amplikon 860 dan 250 bp dilakukan dengan mengirim sampel plasmid rekombinan yang benar ke Laboratorium Analisis Jasa, yaitu *First BASE Laboratory*. Sekuen DNA amplikon yang berukuran 860 bp menunjukkan keberadaan dua bagian sekuen DNA yang berbeda, yaitu sekuen DNA dari genomik padi (berwarna merah) dan sekuen dari elemen DS/T-DNA *vector* (berwarna hijau). Analisis penelusuran sekuen (*blasting*) menunjukkan bahwa sekuen genomik padi tersebut terkait dengan gen *OSJNBa0004120.14* yang berada pada kromosom 6 genom dari subspecies *japonica* yang mengeskpresikan *putative uridylate kinase* (Gambar 5). Kandidat

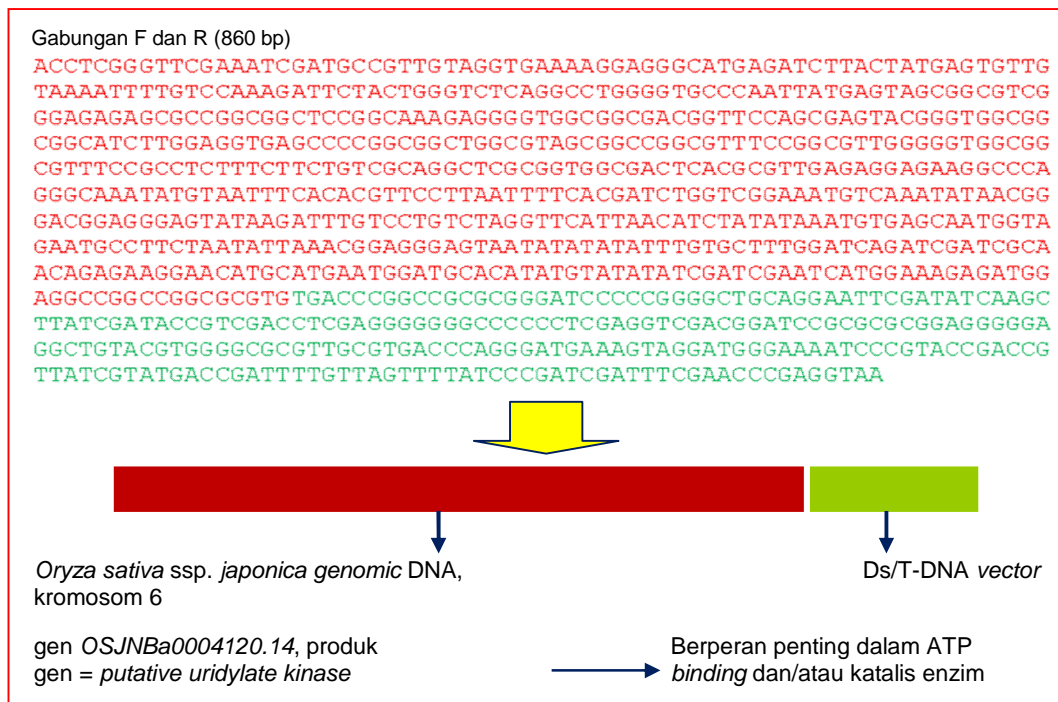
gen tersebut diketahui merupakan gen yang direpresi di bawah kondisi cekaman kekeringan dalam interaksinya dengan toleransi cekaman kekeringan (Trijatmiko, 2005).

Sekuen DNA amplikon berukuran 250 bp menunjukkan keberadaan dua bagian sekuen yang berbeda, yaitu sekuen dari genom padi (berwarna hijau) dan sekuen DNA dari Ds/T-DNA *vector* (berwarna merah). Bagian sekuen genom padi berhubungan dengan mRNA *OsPPCK2L* yang mentranslasi pembentukan *phosphoenolpyruvate carboxylase kinase* (Gambar 6). mRNA *OsPPCK2L* diketahui termasuk ke dalam gen-gen yang diinduksi secara khusus oleh cekaman kekeringan (Trijatmiko, 2005).

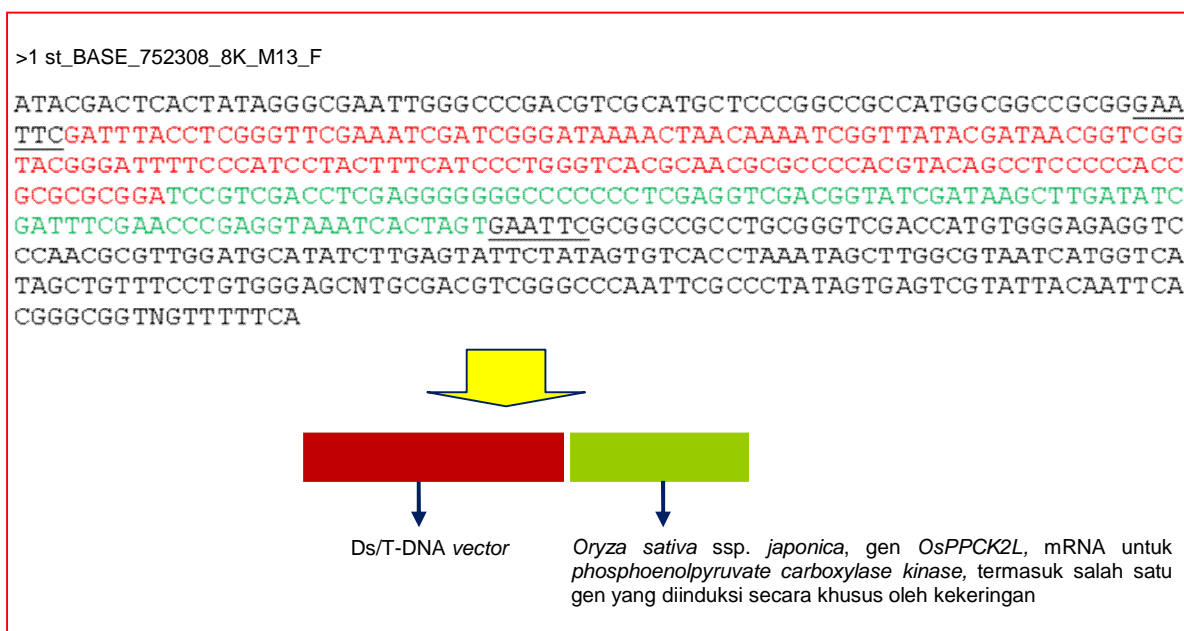
Penelitian lanjutan perlu dilakukan untuk membuktikan apakah gen-gen tersebut berkontribusi pada sifat toleransi terhadap kekeringan. Pembuktian itu dapat dilakukan dengan mengkonstruksi gen *OSJNBa0004120.14* dan gen *OsPPCK2L* ke dalam vektor ekspresi dan mentransformasikannya ke dalam tanaman.

KESIMPULAN

Galur PA.T-5.1 menunjukkan toleransi terhadap kekeringan dan mengandung gen *bar* tetapi tidak mengandung gen *hptIII*, sehingga posisi integrasi penanda aktivasi dalam genom telah stabil. Dua gen yang ber-



Gambar 5. Hasil *blasting* sekuen DNA dari fragmen amplikon DS5-3/AD3 berukuran sekitar 860 bp dari padi mutan penanda aktivasi terkait dengan sifat toleransi terhadap kekeringan.



Gambar 6. Hasil *blasting* sekuen DNA dari fragmen amplicon DS5-3/AD-3 berukuran sekitar 250 bp dari padi transgenik penanda aktivasi terkait dengan sifat toleransi terhadap kekeringan.

asal dari PA.T-5.1 diduga terlibat dalam toleransi cekaman kekeringan, yaitu gen OSJNBa0004120.14 dan *OsPPCK2L* yang masing-masing mengekspresikan *putative uridylate kinase* dan *phosphoenolpyruvate carboxylase kinase*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Dr. Sutrisno atas bimbingan yang diberikan selama penelitian dan penulisan makalah. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Dewi Praptiwi dan Zainati Fachrina atas bantuan teknis selama pelaksanaan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Aharoni, A., S. Dixit, R. Jetter, E. Thoenes, G. Van Arkel, and A. Pereira. 2004. The *SHINE* clade of AP2 domain transcription factors activates wax biosynthesis, alters cuticle properties, and confers drought tolerance when overexpressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16(9):2463-2480.
- Bouchez, D. and H. Höfte. 1998. Functional genomics in plants. *Plant Physiol.* 118:725-732.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- Harahap, Z., Suwarno, E. Lubis, dan T.W. Susanto. 1995. Padi Unggul Toleran Kekeringan dan Naungan. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan Bogor. 21 hlm.
- Kolesnik, T., I. Szeverenyi, D. Bachmann, C.S. Kumar, S. Jiang, R. Ramamoorthy, M. Cai, Z.G. Ma, V. Sudaresan, and S. Ramachandran. 2004. Establishing an efficient Ac/Ds tagging system in rice: Large scale analysis of Ds flanking sequences. *Plant J.* 37:301-314.
- Marsch-Martinez, N., R. Greco, G. Van Arkel, L. Herrera Estrella, and A. Pereira. 2002. Activation tagging using the En-I maize transposon system in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 129:1544-1556.
- Oh, S.J., S.I. Song, Y.S. Kim, H.Y. 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 Physiol.* 138(1):341-351.
- Sallaud, C., C. Gay, P. Larmande, M. Bes, P. Piffanelli, B. Piegu, G. Droc, F. Regad, E. Bourgeois, D. Meynard, C. Perin, X. Sabau, A. Ghesquiere, J.C. Glazmann, M. Delseny, and E. Guiderdoni. 2004. High throughput T-DNA insertion mutagenesis in rice: A first step toward in silico reverse genetics. *Plant J.* 39: 450-464.
- Sisharmini, A., A. Apriana, W. Enggarini, dan K.R. Trijatmiko. 2009. Pengembangan populasi mutan penanda aktivasi: I. Transformasi padi *japonica* tropis lokal Sulawesi cv. Asemendi dengan bantuan *Agrobacterium tumefaciens*. *J. AgroBiogen* 5(2):49-56.
- Suardi, D. dan B. Abdullah. 2005. Padi liar tetua toleran kekeringan. *Bul. Plasma Nutrafah* 9(1):33-38.
- Tani, H., X. Chen, P. Nurmberg, J.J. Grant, M.S. Maria, A. Chini, E. Gilroy, P.R.J. Birch, and G.J. Loake. 2004. Activation tagging in plants: A tool for gene discovery. *Funct. Integr. Genomic* 4:258-266.

Trijatmiko, K.R. 2005. Comparative analysis of drought resistance genes in *Arabidopsis* and rice. Ph.D. thesis, Wageningen University, the Netherlands. p. 111-128.

Wahyudi A. 2012. Bulog: Kekeringan Ancam Target Produksi Beras. http://jaringnews.com/ekonomi/umum/2_2468. [28 September 2012].

Wang, M.B. and P.M. Waterhouse. 1997. A rapid and simple method of assaying plants transformed with hygromycin or PPT resistance genes. *Plant Mol. Biol. Rep.* 15:209-215.
