

Peningkatan Ketahanan Terhadap Dua Penggerek Batang pada Padi Aromatik yang Memiliki Gen *cryIA(b)* Sintetik

Enhanced resistance to two stem borer in an aromatic rice containing a synthetic cryIA(b) gene

Behzad Ghareyazie, Faramarz Alinia, Corazon A. Menguito,
Leila G. Rubia, Justina M. de Palma, Evelyn A. Liwanag,
Michael B. Cohen, Gurdev S. Khush and John Bennett

Molecular Breeding 3:401-404, 1997

© 1997 Kluwer Academic Publishers. Printed in Belgium

Diterjemahkan Oleh:

Willy Bayuardi Suwarno, SP, MSi

willy@ipb.ac.id

Dipublikasi di <http://willy.situshijau.co.id> tanggal 3 Mei 2008

Terjemahan artikel ini dapat digunakan dan disebarluaskan secara bebas, baik sebagian maupun seluruhnya, untuk tujuan non-komersial dengan syarat mencantumkan nama penulis dan sumbernya. Di luar tujuan itu, pengguna harus memperoleh izin tertulis dari penulis.

Daftar Isi

Abstrak	1
Pendahuluan	2
Bahan dan Metode	4
Induksi Kalus, Transformasi, Seleksi dan Regenerasi	4
Analisis Molekuler Tanaman yang Diduga Transgenik dan Keturunannya	4
Bioassay Serangga	5
Hasil	9
Transformasi	9
Integrasi dan Ekspresi Gen <i>cryIA(b)</i>	9
Bioassay Ketahanan Terhadap SSB pada Tanaman T ₀	10
Pewarisan Gen <i>cryIA(b)</i> dan Ketahanan SSB pada Galur 827 Progeni T ₁	11
Ketahanan Terhadap SSB pada Galur 827 Generasi T ₂	12
Ketahanan Terhadap YSB pada Galur 827 Generasi T ₂	12
Ekspresi Spesifik Jaringan dari Gen <i>cryIA(b)</i>	14
Pembahasan	15
Transformasi Padi Kelompok V	15
Seleksi Tekanan Tinggi, Analisis Molekuler dan Ekspresi Gen	15
Bioassay Progeni T ₁ dan T ₂ Tanaman 827	16
Larva yang Tidak Ditemukan	17
Perbandingan dengan Padi Lain yang Ditransformasi Gen <i>cryIA(b)</i>	17
Ekspresi Gen <i>cryIA(b)</i> Spesifik Jaringan	18

Abstrak

Kultivar padi grup isozyme V yang berisi tanaman-tanaman padi aromatik berkualitas tinggi sulit dimuliakan dengan metode konvensional karena hibridisasi seksual akan menyebabkan hilangnya karakter-karakter unggul. Tanaman-tanaman tersebut peka terhadap penggerek batang. Pada makalah ini dilaporkan tentang peningkatan ketahanan terhadap penggerek batang pada kultivar Tarom Molaii melalui transformasi dengan *microprojectile bombardment*. Kalus embriogenik yang diperoleh dari benih dewasa ditembakkan dengan partikel emas yang dilapisi dengan plasmid pCIB4421 yang membawa potongan gen toksin *cryIA(b)* dari *Bacillus thuringiensis* dan plasmid pHygII yang membawa gen *selectable marker* hygromycin phosphotransferase (*hpt*). Penggunaan hygromycin B 50 mg/l dalam media kultur dari penembakan sampai planlet berakar menyisihkan jaringan yang tidak tertransformasi. Digunakan tiga transforman *hpt* independen, dua diantaranya berisi gen *cryIA(b)*. Galur No. 627 menghasilkan potongan protein (67 kDa) *cryIA(b)* yang hampir setara dengan 0.1% total protein yang dapat larut. Gen *cryIA(b)* dikontrol oleh promotor dari gen PEP carboxylase jagung C4 dan diekspresikan pada daun namun tidak diekspresikan pada level yang dapat dideteksi pada biji dewasa. Galur 827 berisi sekitar 3 kopi gen *cryIA(b)* yang bersegregasi seperti satu lokus dominan pada generasi kedua (T_1) dan generasi ketiga (T_2) serta memiliki ketahanan yang lebih baik terhadap larva penggerek batang bergaris (*Chilo suppressalis*) instar pertama dan penggerek batang kuning (*Scirpophaga intercalas*). Galur T_2 872-6 yang homozigot untuk gen *cryIA(b)* tidak mati setelah diinfestasi dengan penggerek batang, sedangkan galur T_2 827-25 yang tidak memiliki gen tersebut rata-rata terserang 7 dead heart dan 2.25 whitehead per tanaman. Hasil tersebut membuktikan bahwa transformasi gen pada tanaman-tanaman padi aromatik grup V dapat menjadi alternatif bagi hibridisasi seksual.

Singkatan: *hpt*, gen hygromycin phosphotransferase; Bt, *Bacillus thuringiensis*; SSB, penggerek batang bergaris (*striped stem borer*); YSB, penggerek batang kuning (*yellow stem borer*); PEP, fosfoenol piruvat; CaMV, cauliflower mosaik virus; PCR, polymerase chain reaction; dNTP, deoxynucleotide triphosphate; HSI, hari setelah infestasi; BNT, beda nyata terkecil.

Pendahuluan

Karena tersebar dimana-mana dan memiliki pola infestasi yang kronis, lepidoptera penggerek batang famili Pyralidae dapat menyebabkan kehilangan hasil yang lebih tinggi dibandingkan hama serangga padi lain di Asia. Infestasi pada fase vegetatif menimbulkan gejala dead heart. Infestasi pada fase reproduktif menyebabkan kerusakan yang menghalangi transportasi nutrisi dari batang ke biji dan menghasilkan gejala infestasi penggerek batang yang dikenal dengan whitehead: panikel terbentuk penuh, namun pengisian biji gagal seluruhnya. Kehilangan hasil keseluruhan di Asia yang disebabkan oleh dua spesies utama, yakni penggerek batang kuning (YSB) *Scirpophaga intercalas* (Walker) dan penggerek batang bergaris (SSB) *Chilo suppressalis* (Walker), seringkali mencapai 5-10% [22]. Angka ini setara dengan 25 juta ton beras di Asia pada tahun panen 1995. International Rice Research Institute (IRRI) di Filipina menyeleksi lebih dari 15 000 plasma nutfah tambahan untuk ketahanan terhadap YSB dan 6 000 plasma nutfah tambahan untuk ketahanan terhadap SSB [16]. Tingkat ketahanan berkisar antara rendah hingga sedang, namun penggabungan beberapa gen ketahanan ke dalam kultivar modern berdaya hasil tinggi telah berkontribusi nyata pada pengendalian penggerek batang [12].

Adanya teknik rekayasa genetika untuk ketahanan terhadap hama pada tanaman budidaya saat ini meningkatkan peluang mendapatkan tingkat ketahanan yang tinggi terhadap penggerek batang padi. Teknik ini memiliki keuntungan antara lain: (1) ketersediaan mekanisme ketahanan yang bermacam-macam termasuk protein kristal (Cry) dari bakteri *Bacillus thuringiensis* [7, 11] dan inhibitor proteinase dari tanaman seperti kopi, kentang, kacang tanah dan padi itu sendiri [6, 23]; (2) kemampuan mengintroduksi satu atau beberapa gen secara langsung ke kultivar-kultivar populer tanpa mengalami kerugian seperti dalam hibridisasi seksual; dan (3) ketersediaan tiga metode transformasi yang berbeda untuk padi, yakni penggunaan protoplas [27], mikroproyektil [4] atau *Agrobacterium* [13].

Serangga lepidoptera sensitif terhadap banyak protein CryI dan CryII yang dihasilkan oleh strain-strain *B. thuringiensis* yang berbeda [14]. *CryIA(b)* adalah salah satu protein yang diketahui toksik ketika digabungkan dengan diet buatan yang membantu pertumbuhan penggerek batang dalam kultur (R. Aguda dan M. Cohen, tidak dipublikasi). Gen *cryIA(b)* sintetis telah ditransfer pada kultivar-kultivar yang representatif dari dua kelompok plasma nutfah (seluruhnya ada 6 kelompok) yang diidentifikasi oleh Glazmann [9] berdasarkan analisis isozym. Fujimoto *et al.* [8] melaporkan tentang transfer gen *cryIA(b)* sintetis pada kultivar Nipponbare kelompok VI (japonica), sedangkan Wunn *et al.* [33] mentransfer gen *cryIA(b)* sintetis yang lain pada kultivar Tarom Molaii dari kelompok isozym V. Kelompok ini berisi padi aromatik tipe Basmati dan Sadri yang berkualitas tinggi dan low-tillering, namun sulit diperbaiki melalui pemuliaan konvensional karena akan kehilangan karakter-karakter kualitas yang kompleks dalam hibridisasi seksual.

Dalam pekerjaan ini, gen *cryIA(b)* dikontrol oleh promotor dari gen PEP carboxylase jagung C₄. Promotor ini sebelumnya digunakan pada jagung untuk mendapatkan ketahanan tingkat tinggi terhadap penggerek batang jagung Eropa [18]. Matsuoka *et al.* [20] menunjukkan bahwa promotor dari gen PEP carboxylase jagung C₄ memiliki tingkat aktifitas transkripsi yang tinggi pada daun dan pelepah daun padi, seperti telah diduga oleh ekspresi gen reporter ¼-glucuronidase. Promotor yang digunakan oleh Fujimoto *et al.* [8] dan Wunn *et al.* [33] untuk mengontrol gen *cryIA(b)* pada padi adalah CaMV 35S. Seperti ditunjukkan saat ini, protein CryIA(b) terekspresi pada daun tanaman padi namun tidak terekspresi pada biji. Konstruksi ini efektif untuk menekan populasi *C. suppressalis* dan *S. intercalas* di Filipina.

Bahan dan Metode

Induksi Kalus, Transformasi, Seleksi dan Regenerasi

Benih dewasa dari padi aromatik Iranian Sadri varietas Tarom Molaii dipisahkan dari sekamnya, disterilkan dalam sodium hipoklorit, dibilas dengan air steril, dan ditempatkan pada cawan yang berisi media induksi kalus (N6 dengan sukrosa 3%, 2,4-D 2 mg/l, agarose 0.8%). Cawan tersebut ditempatkan dalam ruang gelap pada suhu 25°C selama 4 minggu. Untuk transformasi biolistic, 25-100 potongan kecil kalus embrogenik ditempatkan di tengah cawan yang berisi media induksi kalus. Partikel emas (diameter 1 μm) dilapisi dengan plasmid pChHygII yang membawa gen hygromycin phosphotransferase (*hpt*) dan pCIB4424 (Gambar 1) yang membawa gen *cryIA(b)* yang diatur oleh promotor dari gen PEP carboxylase jagung [18]. Kalus ditembak dengan menggunakan sistem pengantaran partikel yang digerakkan oleh helium (BioRad). Sel yang telah ditembak ditransfer ke media seleksi (media induksi kalus yang ditambah dengan 50 mg/l hygromycin B) dan disimpan dalam ruang gelap pada suhu 25°C. Kalus disubkulturkan pada media seleksi baru setiap 2 minggu hingga kalus yang diduga transgenik mudah dibedakan dengan kalus yang mengalami nekrosis. Kalus yang dapat bertahan hidup ditransfer ke media regenerasi (media N6 dengan maltosa dan 3 mg/l asam asetat naphthalene) juga ditambah dengan 50 mg/l hygromycin B. Planlet yang diregenerasi ditransfer ke larutan kultur Yoshida selama 2 minggu dan kemudian ditempatkan dalam tanah steril untuk pertumbuhan di rumah kaca transgenik IRRI.

Analisis Molekuler Tanaman yang Diduga Transgenik dan Keturunannya

PCR. DNA diekstraksi seperti dijelaskan oleh Zhang *et al.* [34]. DNA melalui 1 siklus 94°C selama 5 menit (denaturasi awal), 35 siklus masing-masing tiga langkah (94°C, 1 menit; 60°C, 1 menit; dan 72°C, 3 menit) dalam 25 μl buffer PCR (10mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl dan 1.5 mM MgCl₂) yang berisi 0.2 mM dari masing-masing dNTP, 20 ng dari masing-masing RG100 primer, dan 40

ng dari masing-masing primer Bt dari *hpt* atau *cryIA(b)* dan 1 unit polimerase *Taq*. Produk PCR dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa.

DNA gel blot. Total DNA genom diisolasi dari daun tanaman transgenik dan tanaman kontrol seperti dijelaskan [5]. Bagian DNA sebanyak 5 µg dipotong-potong dengan enzim restriksi yang tepat dan difraksinasi melalui gel agarose 0.8%. DNA ditransfer ke dalam membran nilon sesuai dengan metode Southern [29]. Filter dihibridisasi dengan probe berlabel [α -³²P] yang berisi urutan kode translasi dari gen *hpt* atau *cryIA(b)*. Filter dianalisis dengan autoradiografi.

Protein immuno gel blot. Segmen daun dari tanaman transgenik dan tanaman kontrol dilumatkan menjadi bubuk halus dengan alat penumbuk dan nitrogen cair. Pada bubuk tersebut ditambahkan 1 ml buffer ekstraksi (100 mM Tris-Cl, pH 8.1, 100 mM 2-mercapthoethanol). Ekstrak tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 12 000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan dihasilkan. Konsentrasi protein ditentukan menggunakan metode dye-binding [1]. Dari ekstrak beberapa tanaman, 50 µg protein diuji dengan SDS-PAGE. Setelah elektroforesis, protein ditransfer secara elektroforesis ke filter nitroselulosa. Filter diprobe dengan antiserum protein CryIA(b) menggunakan antibodi dari Fujimoto *et al.* [8]. Filter dicuci dan diberi perlakuan dengan antibodi sekunder (antibody goat anti-rabbit yang dikonjugasikan dengan horseradish peroxidase). Filter direaksikan dengan larutan penghasil warna yang berisi Tris-HCl pH 7.6 dan 4-chloronaphthol yang dilarutkan dalam methanol [24]. Untuk analisis ekspresi gen yang spesifik pada jaringan, total protein yang dapat larut diekstraksi dari daun, spikelet yang belum dewasa, dan biji dewasa dengan metode dari Juliano dan Boulter [17] dan kemudian dianalisa dengan immuno gel blot (80 µg protein per jalur).

Bioassay Serangga

Serangga. YSB (*Scirpophaga intercalas*) dewasa dan SSB (*Chilo suppressalis*) dikumpulkan dari pertanaman padi di Laguna, Quezon, dan Propinsi Batangas, Filipina. Semua tempat koleksi terletak dalam radius 50 km dari IRRI. Semua ngengat dikandangkan bersama tanaman padi di dalam rumah kaca selama dua

hari, setelah itu kumpulan-kumpulan telur diambil dari tanaman dan disimpan dalam mangkok plastik. Karena telur-telur dalam satu kumpulan menetas dalam beberapa jam, satu hari sebelumnya kumpulan-kumpulan telur tersebut ditempatkan dalam botol kecil dengan makanan buatan untuk menyediakan makanan bagi larva yang baru menetas. Larva neonate (berumur 0-24 jam) diambil dari dari botol kecil dan digunakan dalam bioassay yang dilakukan di ruang pengujian entomology dalam rumah kaca transgenik di IRRI. Temperatur dalam ruang tersebut diatur antara 25 hingga 29°C pada siang hari dan 21°C hingga 29°C pada malam hari. Kelembaban relatif berkisar antara 70 hingga 90%.

Pada umumnya bioassay dilakukan pada larva ngengat generasi pertama yang diambil dari lapang. Bioassay dari tanaman T₂ stadia vegetatif dengan YSB dan tanaman T₂ stadia booting dengan SSB menggunakan larva dari koloni yang diinisiasi dari ngengat yang dikoleksi dari lapang dan ditempatkan bersama tanaman padi di rumah kaca selama satu hingga tiga generasi.

Evaluasi tanaman T₀. Dari empat tanaman T₀ kontrol dan lima tanaman T₀ transgenik yang memiliki gen *cryIA(b)* (seperti terlihat oleh PCR), diambil masing-masing dua potongan batang yang kira-kira berada pada stadia booting. Dari bagian tengah masing-masing batang diambil potong-an sepanjang 7 cm dan ditempatkan pada cawan petri berisi filter paper yang lembab. Batang-batang tersebut ditempatkan bersama lima larva SSB neonate dan cawan-cawan diisolasi dengan parafilm. Setelah empat hari, batang-batang tersebut dipotong dan jumlah serta tingkat perkembangan larva dicatat.

Evaluasi tanaman T₁. Benih T₁ dari tanaman T₀ ditanam dan diklasifikasi dengan PCR dan diskor positif atau negatif untuk gen *cryIA(b)*. Tanaman negatif digunakan sebagai kontrol dalam bioassay serangga. Empat tanaman kontrol dan 27 tanaman yang memiliki gen *cryIA(b)* ditempatkan bersama lima larva SSB neonate per tiller. Tanaman kira-kira berada pada stadia booting dan memiliki satu hingga tiga tiller. Tanaman yang diinfestasi ditempatkan dalam kurungan Mylar yang berbentuk pipa dengan jendela nilon yang berlubang. Setelah tujuh

hari, tanaman-tanaman tersebut dipotong dan jumlah serta tingkat perkembangan larva dicatat.

Bioassay tanaman T_2 stadia vegetatif dengan YSB. Bioassay potongan batang dan keseluruhan tanaman dilakukan pada tanaman stadia vegetatif (35 hari setelah ditanam) dari tiga galur homozigot T_2 yang berasal dari tanaman 827, dua galur homozigot yang memiliki gen *cryIA(b)* dan satu galur kontrol homozigot yang tidak memiliki gen tersebut. Dari empat tanaman stadia vegetatif dari tiap galur diambil bagian batang sepanjang 7 cm dan disimpan dalam cawan petri berisi filter paper yang lembab. Lima larva YSB neonate ditempatkan pada tiap cawan dan cawan-cawan tersebut diisolasi. Tanaman pot yang diambil batangnya (merupakan satu tanaman tambahan dari tiap galur) masing-masing diinfestasi dengan 20 larva YSB neonate. Tanaman tersebut masing-masing memiliki 5-20 batang. Setiap tanaman yang diinfestasi ditempatkan dalam kurungan Mylar yang berbentuk pipa dengan jendela nilon yang berlubang.

Pada 2, 3, dan 4 hari setelah infestasi, potongan batang dalam cawan petri dipotong dan jumlah serta instar larva yang hidup dan yang mati dicatat. Untuk bioassay keseluruhan tanaman, pemotongan dilakukan pada 2, 4, 8, dan 25 hari setelah infestasi. Setelah 25 HSI, jumlah dead hearts per tanaman juga dicatat. Pada suhu 25°C, SSB dan YSB masing-masing membutuhkan sekitar 25 dan 28 hari untuk perkembangan larva.

Bioassay tanaman T_2 stadia booting dengan SSB. Tiga galur (dua *cryIA(b)*-positif dan kontrol) dianalisis untuk ketahanan terhadap SSB pada stadia booting (75 hari setelah tanam). Assay potongan batang dan keseluruhan tanaman dilakukan seperti assay tanaman T_2 stadia vegetatif dengan YSB. Jumlah whitehead per tanaman juga dicatat pada 25 HSI.

Bioassay tanaman T_2 stadia booting dengan YSB. Dalam assay potongan batang, batang-batang dipotong menjadi tiga bagian masing-masing berukuran 5 cm untuk mengetahui apakah kemampuan hidup larva berbeda pada bagian pangkal, tengah, dan ujung batang. Pada empat tanaman pot dari empat galur homozigot (tiga

cryIA(b) positif dan satu *cryIA(b)* negatif) yang berasal dari tanaman 827 masing-masing diambil tiga batang. Setiap bagian batang dari tiap tanaman ditempatkan dalam cawan petri terpisah yang berisi kertas filter lembab dan diinfestasi dengan lima larva neonate. Satu set potongan batang dari tiap tanaman dipotong dalam tiga waktu yang berbeda, yakni 2, 3, dan 4 hari setelah infestasi.

Analisis data bioassay. Semua bioassay diatur menurut Rancangan Acak Kelompok. Jumlah larva hidup, mati, dan yang tidak bisa pulih kembali ditransformasi-akar dan persentasinya (Tabel 1) ditransformasi-arkus-sinus [10]. Sidik ragam dilakukan dengan paket SAS [25]. Rataan tertransformasi dibandingkan dengan uji beda nyata terkecil (BNT).

Hasil

Transformasi

Ketika benih dewasa dari kultivar Tarom Molaii diinkubasi dalam media induksi kalus, 96% benih membentuk kalus. Kalus embriogenik diseleksi untuk ditembak dengan partikel emas yang dilapisi dua plasmid, satu plasmid membawa gen *hpt* dan satu lagi membawa potongan gen *cryIA(b)* sintetik. Setelah ditembak, kalus diseleksi selama 6 minggu dalam higromycin B 50 g/l, dan kalus yang hidup diinkubasi selama 4-8 minggu dalam media regenerasi yang juga mengandung antibiotik. Sepuluh regeneran ditempatkan pada media pertumbuhan akar tanpa hygromycin hingga akar pertama memiliki panjang 5 cm, kemudian ditanam secara hidroponik hingga cukup besar untuk analisis PCR. Setelah itu, tanaman-tanaman ditumbuhkan dalam pot untuk analisis DNA blot, bioassay serangga dan produksi benih. Hasil PCR menunjukkan bahwa kesepuluh regeneran membawa gen *hpt*. Hasil ini dikonfirmasi oleh DNA blot dengan probe *hpt* (tidak ditunjukkan).

Integrasi dan Ekspresi Gen *cryIA(b)*

Gambar 2 menunjukkan analisis PCR pada empat dari sepuluh transforman untuk keberadaan gen *cryIA(b)*. Keempat tanaman positif untuk satu kopi gen marker, RG100 pada kromosom 6 [2], tetapi hanya satu dari tanaman (No. 827) yang positif untuk gen *cryIA(b)*. Analisis keenam transforman lainnya menunjukkan bahwa tanaman 852 juga positif untuk gen *cryIA(b)*, dan DNA blotting membuktikan bahwa tanaman 827 dan 852 adalah transforman independen (tidak ditunjukkan). Analisis immunoblot pada tanaman 827, 852 dan dua transforman *cryIA(b)* yang berasal dari kultivar lain (untuk dilaporkan di tempat lain) menunjukkan bahwa hanya No. 827 yang memproduksi protein CryIA(b) dengan level tinggi (Gambar 3). Ukuran protein CryIA(b) yang diakumulasi di daun tanaman No. 827 adalah sebesar 67 kDa, dibandingkan dengan 132 kDa untuk protoxin CryIA(b) murni. Ukuran produk translasi yang kecil sudah diperkirakan, karena potongan gen dari plasmid pCIB4421 [18] hanya

mengkode potongan terminal N yang aktif dari protoxin [14]. Dengan 50 μ g protein yang dimuat pada gel, tingkat protein CryIA(b) sekitar 50 ng (0.1% dari total protein daun yang dapat larut).

Analisis blot DNA pada tanaman 827 mendekati beberapa keturunan T_1 nya. Segmen *Bam*HI-*Sal*I dari gen *cryIA(b)* digunakan sebagai probe. Hibridisasi dengan DNA yang tidak dipotong dilakukan secara terpisah pada berat molekul yang tinggi, dimana hasilnya mengindikasikan bahwa gen telah terintegrasi ke dalam genom tanaman padi. Ketika DNA sudah dipotong dengan *Eco*RI dan *Hind*III, kebanyakan hibridisasi adalah dengan fragmen 4.5 kb yang diperkirakan merupakan transcriptional unit dari gen *cryIA(b)*. Hasil ini mengindikasikan bahwa kebanyakan gen *cryIA(b)* terintegrasi secara utuh. Dari perbandingan intensitas pita 4.5 kb relatif dengan kontrol positif (1 dan 5 kopi per genom haploid), jelaslah bahwa tanaman 827 memiliki kurang dari 5 kopi gen *cryIA(b)*. Ketika DNA genom dipotong dengan *Hind*III, yang memotong pCIB4421 satu kali, pita hibridisasi terlihat pada 9.4, 6.0, dan 2.3 kb (tidak ditampilkan). Hasil ini memberi kesan bahwa terdapat sedikitnya tiga kopi gen *cryIA(b)* dalam genom.

Bioassay Ketahanan Terhadap SSB pada Tanaman T_0

Stau tiller tanaman T_0 yang memiliki gen *cryIA(b)* diuji untuk ketahanan terhadap larva SSB dengan assay potongan batang. Tanaman 827 terbukti sebagai satu-satunya tanaman dimana semua larva yang ditemukan mati. Hal ini mengindikasikan bahwa protein yang dideteksi dalam tanaman ini dengan immunoblotting (Gambar 3) telah aktif. Larva yang mati memiliki kepala hitam berbentuk kapsul dan karakteristik pronotum pada instar pertama (Gambar 5A). Larva yang ditemukan dari tanaman kontrol yang tidak ditransformasi masih hidup dan jauh lebih besar. Larva-larva tersebut telah berkembang hingga instar kedua dan me-nyebabkan kerusakan (Gambar 5b). Pengambilan lebih dari satu tiller dari tiap tanaman T_0 akan membahayakan pertumbuhan dan produksi benih. Bioassay berulang yang lebih ekstensif dilaksanakan pada generasi kedua dan ketiga.

Pewarisan Gen *cryIA(b)* dan Ketahanan Terhadap SSB pada Galur 827 Progeni T₁

Tanaman 827 generasi T₀ membentuk benih dengan jumlah banyak. Penampilan benih-benih tersebut tidak dapat dibedakan dengan benih Tarom Molaii non-transgenik. Keseluruhan dari 42 progeni T₁ dianalisis dengan PCR dan DNA blotting untuk menentukan pola pewarisan dari gen *cryIA(b)* dan gen *hpt*. Kedua gen diwariskan seperti satu lokus Mendelian, dan kedua lokus bersegregasi sebagai berikut: 32 progeni memiliki gen *cryIA(b)* dan gen *hpt*, dan 10 progeni tidak memiliki keduanya. Tidak ada satu progeni pun yang hanya memiliki satu gen tanpa disertai yang lain. Disimpulkan bahwa semua kopi dari kedua gen bersegregasi seperti satu lokus mendelian (3:1, $\chi^2 = 0.095$; $P < 0.01$). Jelaslah bahwa kedua plasmid telah terintegrasi pada situs yang sama atau pada dua situs yang terpaut kuat dalam genom tanaman padi. Dari lima progeni T₁ yang ditunjukkan pada Gambar 5, hanya nomor 4 yang gagal menerima kopi gen *cryIA(b)*. Progeni seperti itu digunakan sebagai kontrol negatif pada *entomological assay*.

Tabel 1 menunjukkan hasil assay keseluruhan tanaman pada progeni T₁ dari galur 827. Uji progeni terdiri dari 27 tanaman *cryIA(b)*-positif dan 4 *cryIA(b)*-negatif yang ditentukan dengan PCR dan DNA blotting. Tanaman-tanaman tersebut diinfestasi dengan larva SSB instar pertama dan dipotong-potong pada 7 HSI. Semua larva yang ditemukan dari tanaman *cryIA(b)*-positif telah mati dan tidak berkembang melewati instar pertama. Sebaliknya, larva yang ditemukan dari tanaman *cryIA(b)*-negatif masih hidup dan telah berkembang hingga instar kedua atau ketiga. Sebagian besar larva pada tanaman *cryIA(b)*-positif tidak ditemukan dan diasumsikan telah mati dan terdekomposisi atau jatuh dari tanaman.

Progeni T₂ dari tanaman T₁ dianalisis dengan PCR untuk membedakan antara tanaman T₁ homozigot untuk gen *cryIA(b)* dengan tanaman yang heterozigot untuk gen tersebut. Progeni dari empat tanaman heterozigot T₁ dikelompokkan dan dianalisis untuk keberadaan gen *cryIA(b)*: 79 tanaman

bersegregasi 59:20 untuk keberadaan dan ketiadaan gen tersebut ($\chi^2 = 0.084$ untuk 3:1; $P < 0.01$).

Ketahanan Terhadap SSB pada Galur 827 Generasi T₂

Tanaman T₂ homozigot untuk keberadaan atau ketiadaan gen *cryIA(b)* diuji untuk ketahanan terhadap SSB dalam bioassay potongan batang dan keseluruhan tanaman pada stadia booting (Tabel 2 dan 3). Dua galur homozigot untuk keberadaan gen *cryIA(b)*, 827-6 dan 827-8, menunjukkan ketahanan yang lebih baik terhadap SSB pada assay potongan daun (Tabel 2). Kematian larva pada galur *cryIA(b)*-positif lebih tinggi dari galur kontrol (827-25) pada 3 HSI dan 4 HSI, tetapi perbedaan yang nyata secara statistik hanya dijumpai pada 3 HSI.

Pada assay keseluruhan tanaman, ditemukan rata-rata 11.5 larva hidup dari 20 yang diintroduksi pada tanaman kontrol pada 25 HSI. Kebanyakan larva tersebut berada pada instar kelima (Tabel 3). Tidak ada larva yang ditemukan dari satu galur *cryIA(b)*-positif, 827-6, dimana pada galur 827-8 ditemukan rata-rata 1.75 larva per tanaman (Tabel 3).

Semua larva yang hidup pada galur No. 827-8 ditemukan pada satu tanaman, dan tanaman tersebut juga memiliki satu whitehead. Tidak ada whitehead yang dihasilkan pada galur 827-6, sedangkan pada galur kontrol dihasilkan rata-rata 2.26 whitehead per tanaman.

Ketahanan Terhadap YSB pada Galur 827 Generasi T₂

Tanaman T₂ homozigot untuk keberadaan/ketiadaan gen *cryIA(b)* diuji untuk ketahanan terhadap YSB dalam bioassay keseluruhan tanaman pada stadia vegetatif dan assay potongan batang pada stadia booting. Pada semua pengujian, kematian larva secara umum lebih tinggi, dan perkembangan larva lebih lambat pada galur *cryIA(b)*-positif dibandingkan dengan galur kontrol (Tabel 4-6).

Pada assay potongan batang stadia vegetatif (Tabel 4), jumlah larva yang mati nyata lebih tinggi pada kedua galur *cryIA(b)*-positif dibandingkan dengan tanaman kontrol pada 3 dan 4 HSI. Hampir semua larva yang ditemukan pada tanaman kontrol telah mencapai instar kedua pada 3 dan 4 HSI (tidak

ditunjukkan), tetapi tidak ada larva yang ditemukan pada tanaman *cryIA(b)*-positif. Jumlah larva yang tidak ditemukan tidak berbeda diantara tiga galur tanaman dan rata-rata kurang dari satu larva per cawan petri.

Pada assay keseluruhan tanaman stadia vegetatif (Tabel 5), jumlah larva mati nyata lebih tinggi pada galur *cryIA(b)*-positif dibandingkan dengan tanaman kontrol pada 4 dan 8 HSI. Pada 25 HSI, tidak ada larva mati yang ditemukan pada tanaman manapun, tetapi lebih banyak lagi larva hidup yang ditemukan pada tanaman kontrol dibandingkan tanaman *cryIA(b)*-positif. Tidak ada larva hidup yang ditemukan pada galur *cryIA(b)*-positif pada 8 HSI, dan hanya satu larva hidup yang ditemukan pada 25 HSI. Pada tanaman kontrol, kebanyakan larva hidup telah mencapai instar ketiga pada 8 HSI dan instar keempat dan kelima pada 25 HSI (tidak ditunjukkan). Pada 25 HSI, tidak ada dead heart yang terbentuk pada tanaman *cryIA(b)*-positif, tetapi terdapat rata-rata 7 dead heart yang terbentuk pada tanaman kontrol. Jumlah larva yang tidak ditemukan meningkat sejalan dengan waktu.

Pada potongan batang stadia booting (Tabel 6), jumlah larva yang mati pada tiga galur *cryIA(b)*-positif nyata lebih tinggi dibandingkan dengan galur kontrol pada 2, 3, dan 4 HSI. Kematian pada galur *cryIA(b)*-positif berkisar antara 3, 4, dan 5 larva per cawan petri, dimana kematian pada galur kontrol berkisar antara satu dan dua larva per cawan. Tidak ada perbedaan yang nyata antar galur dalam hal jumlah larva yang tidak ditemukan, dimana pada umumnya kurang dari satu larva per cawan. Di dalam tiap galur tanaman, jumlah larva yang mati tidak berbeda nyata diantara tiga bagian batang yang diuji (pangkal, tengah, dan ujung) pada ketiga waktu pemotongan (tidak ditunjukkan). Konsekuensinya, diambil nilai rata-rata dari ketiga bagian batang tersebut.

Disimpulkan bahwa pada stadia vegetatif dan awal stadia reproduktif tanaman T₂ yang berasal dari tanaman 827, galur homozigot *cryIA(b)*-positif menyebabkan kematian larva yang nyata lebih banyak dan perkembangan larva yang lebih lambat dibandingkan galur homozigot *cryIA(b)*-negatif. Meskipun masalah larva yang tidak ditemukan lebih genting pada assay keseluruhan tanaman dibandingkan dalam assay potongan batang dalam cawan petri, assay

keseluruhan tanaman dapat menyediakan data penting, termasuk penemuan bentuk dead heart dan whitehead yang timbul pada level yang nyata lebih tinggi pada tanaman kontrol dibandingkan tanaman *cryIA(b)*-positif. Hasil-hasil tersebut memberi kesan bahwa progeni tanaman No. 827 memperlihatkan ketahanan yang lebih baik pada penggerek batang di lapangan.

Ekspresi Spesifik Jaringan dari Gen *cryIA(b)*

Immunoblot tanaman T₂ menunjukkan bahwa gen *cryIA(b)* diekspresikan pada daun tetapi tidak pada biji dewasa (Gambar 6). Tiap jalur polyacrylamide gel berisi 80 µg dari total protein daun bendera yang dapat larut (dipanen ketika biji telah berkembang hingga stadia dough), spikelet belum dewasa yang berada pada stadia dough, atau biji dewasa tanpa sekam dari tanaman T₂ homozigot untuk keberadaan/ketiadaan gen tersebut. Metode ekstraksi dari Juliano dan Boulter [17] digunakan karena mampu mengekstrak lebih dari 90% protein biji padi yang dapat larut. Daun tanaman yang positif untuk gen *cryIA(b)* berisi potongan protein CryIA(b) 67 kDa, kadang-kadang bersama dengan sejumlah kecil protein sebanyak 60 kDa yang diasumsikan sebagai hasil kerusakan parsial pada daun tua atau akibat ekstraksi. Fujimoto *et al.* [8] juga melaporkan bahwa terdapat lebih dari satu bentuk protein CryIA(b) pada ekstrak daun. Level protein CryIA(b) yang sangat rendah ditemukan pada spikelet yang belum masak (tidak terlihat pada Gambar 6) dan dapat berasal dari palea dan lemma yang mengelilingi biji yang belum masak. Protein CryIA(b) tidak terdeteksi pada ekstrak protein yang dapat larut dari biji dewasa tanpa sekam. Hasil yang sama juga diperoleh pada biji dewasa tanpa sekam dari tanaman T₄. Disimpulkan bahwa promotor dari gen PEP carboxylase jagung C4 berfungsi sangat baik dan sesuai untuk ekspresi protein CryIA(b) pada jaringan yang diserap oleh larva instar awal, tetapi tidak mengizinkan protein untuk terakumulasi pada level yang terdeteksi pada jaringan yang dikonsumsi manusia.

Pembahasan

Transformasi Padi Kelompok V

Dilaporkan disini tentang transformasi Taroom Molaii, kultivar berkualitas tinggi, tergolong tipe sadri aromatik dari isozyme kelompok V dan memiliki ketahanan lebih baik terhadap penggerek batang. Kelebihan ini sangat penting untuk padi kelompok V, dimana tipe tanaman low tillering rapuh terhadap kehilangan nilai ekonomi akibat infestasi penggerek batang. Lebih jauh, padi kelompok V sulit untuk dimuliakan melalui teknik konvensional karena sifat kualitas biji yang kompleks hilang pada hibridisasi seksual dan hanya dapat dipulihkan setelah back crossing secara ekstensif yang memerlukan banyak musim untuk seleksi untuk ketahanan terhadap penggerek batang dan sifat-sifat yang berhubungan dengan kualitas. Prosedur biolistik digunakan disini agar transformasi varietas padi berkualitas tinggi berlangsung pada periode waktu yang singkat (kurang dari satu tahun) tanpa menghilangkan sifat-sifat genetik yang kompleks seperti kualitas biji.

Seleksi Tekanan Tinggi, Analisis Molekuler dan Ekspresi Gen

Digunakan ketahanan terhadap hygromycin sebagai seleksi pertama untuk mengidentifikasi transforman yang putatif, kemudian dilakukan PCR gen *hpt* untuk membedakan antara jaringan yang tertransformasi dan yang tidak. Persentase jaringan yang tidak tertransformasi berkurang hingga nol pada penelitian ini dengan menambahkan hygromycin pada media regenerasi, seperti direkomendasikan oleh Lie *et al.* [19] dan Zheng *et al.* [34]. PCR digunakan untuk mengidentifikasi transforman yang juga membawa gen *cryIA(b)*. Primer RG100 digunakan sebagai kontrol internal untuk keberhasilan PCR dalam seleksi molekuler dan analisis pewarisan sehingga menambah tingkat kepercayaan dengan mengurangi false negatif dalam jumlah yang besar.

DNA blot memberikan perkiraan adanya integrasi sekitar tiga kopi gen *cryIA(b)* pada genom tanaman 827. Tanaman 827 juga merupakan satu-satunya tanaman yang menghasilkan protein CryIA(b) dalam jumlah yang cukup untuk

dideteksi dengan immunoblot. Bioassay potongan daun untuk ketahanan terhadap SSB mendukung kesimpulan bahwa tanaman 827 mengandung protein insektisida, karena hanya pada tanaman itulah semua larva yang ditemukan mati; larva-larva tidak terlihat menyebabkan kerusakan pada bagian batang dan mati sebelum memasuki instar kedua. Meskipun demikian, karena kesulitan mengulangi bioassay pada tanaman T₀, hasil bioassay yang signifikan dapat diperoleh pada progeni T₁ dan T₂.

Bioassay Progeni T₁ dan T₂ Tanaman 827

Tanaman T₁ dan T₂ *cryIA(b)*-positif yang berasal dari tanaman 827 menunjukkan ketahanan yang lebih baik terhadap larva SSB pada stadia booting dan larva YSB pada stadia vegetatif dan booting. Untuk bioassay tanaman T₂, keseluruhan tanaman atau bagian batang diinfestasi secara simultan tetapi subsetnya dipotong-potong pada hari yang berbeda. Proses ini memungkinkan kita untuk membandingkan waktu perkembangan, kematian, dan pengusiran serangga antara tanaman *cryIA(b)*-positif dan tanaman kontrol. Di dalam assay, kematian meningkat lebih dari waktu exposure pada tanaman. Perbedaan kematian dan perkembangan larva antara tanaman *cryIA(b)*-positif dan tanaman kontrol secara umum tampak pada tiga atau empat hari setelah infestasi. Tanaman positif juga menderita kerusakan akibat kekurangan nutrisi. Tidak ada dead heart yang dibentuk pada tanaman T₂ stadia vegetatif dalam assay keseluruhan tanaman YSB. Di sisi lain, hanya satu whitehead yang dibentuk pada delapan tanaman T₂ stadia booting yang diuji dengan SSB. Pengamatan ketahanan terhadap penggerek batang pada kondisi lapang tentu saja masih diperlukan.

Penelitian untuk membandingkan secara langsung ketahanan galur 827 terhadap YSB dan SSB tidak dilakukan. Meskipun demikian, pada kedua spesies dilakukan pengujian potongan batang pada stadia booting, dan pada pengujian tersebut YSB memiliki laju kematian larva yang lebih tinggi (Tabel 4) dibandingkan SSB (Tabel 2). Hal ini sesuai dengan hasil pengamatan bahwa protein CryIA(b) lebih toksik (mempunyai LC₅₀ yang lebih rendah) pada YSB dibandingkan SSB (R. Aguda dan M. Cohen, data tidak dipublikasi).

Larva yang Tidak Ditemukan

Larva penggerek batang adalah serangga yang sulit dikerjakan dalam bioassay. Banyak larva neonate yang bubar dari tanaman dimana mereka ditempatkan pada awal percobaan, persis dengan bubarannya mereka dari tanaman ketika menetas pada kondisi alami. Sebagai tambahan, kematian larva secara umum tinggi, bahkan pada kultivar padi yang relatif peka. Pada assay keseluruhan tanaman, larva dapat bubar melalui jendela nilon yang berlubang dan bagian atas kurungan. Larva lebih dapat distimulir pada daun tanaman *cryIA(b)*-positif dibandingkan tanaman kontrol (Tabel 2-4). Pada waktu pemotongan yang lebih akhir (8 dan 25 HSI), larva yang mati di dalam tanaman, yang mungkin telah terdekomposisi, juga meningkatkan jumlah larva yang dicatat tidak ditemukan. Pada *assay* potongan batang, ditemukan bahwa isolasi cawan petri mencegah larva bubar, dan jumlah larva yang hilang tidak berbeda antara tanaman *cryIA(b)*-positif dan tanaman kontrol pada *assay-assay* tersebut.

Perbandingan dengan Padi Lain yang Ditransformasi Gen *cryIA(b)*

Karena perbedaan pada metodologi bioassay, tidak dimungkinkan untuk membuat perbandingan level ketahanan terhadap SSB secara langsung antara progeni T₁ dan T₂ dari galur 827 dengan dua padi lain yang ditransformasi dengan gen *cryIA(b)*. Fujimoto *et al.* [8] mentransformasi kultivar Nipponbare dengan gen *cryIA(b)* yang telah dioptimasi kodonnya dibawah kontrol promotor CaMV 35S. Mereka menguji kecambah dari dua galur transgenik dengan SSB instar kedua dan mengamati berat larva dan tingkat kematian dari 0% sampai 50% setelah tujuh hari. Wunn *et al.* [33] menggunakan gen *cryIA(b)* yang sama untuk mentransformasi kultivar IR58 dibawah kontrol promotor CaMV 35S. Pada potongan daun, kematian larva YSB dan SSB berkisar antara 70-100% setelah 3 hari. Pada keseluruhan tanaman yang diinfestasi dengan larva YSB, tidak ada larva yang ditemukan dan tidak ada whitehead yang dibentuk dalam empat hingga lima hari setelah infestasi.

Ekspresi Gen *cryIA(b)* Spesifik Jaringan

Promotor dari gen PEP carboxylase jagung C4 mengendalikan ekspresi gen *cryIA(b)* pada Taroom Molaii. Promotor fotosintesis ini belum pernah digunakan sebelumnya untuk mengendalikan ekspresi gen *cryIA(b)* pada padi. Data kami menunjukkan bahwa gen *cryIA(b)* aktif di latar belakang C_3 daun padi: protein CryIA(b) terakumulasi pada tingkat 0.1% dari total protein yang dapat larut pada daun bendera pada saat pengisian biji (Gambar 3). Walaupun promotor PEP carboxylase aktif pada daun padi, tetapi promotor tersebut tidak aktif pada tingkat yang terdeteksi pada endosperm atau embrio padi yang sedang berkembang atau yang masak (Gambar 6). Ekspresi protein insektisidal pada biji dewasa dapat berguna untuk mengendalikan serangga pasca panen seperti kumbang *Sitophilus* [15], tetapi tidak diperlukan untuk mengendalikan penggerek batang. Fujimoto *et al.* menggunakan promotor CaMV 35S untuk mengendalikan gen *cryIA(b)*. Mereka memperoleh ekspresi pada daun tetapi mereka tidak melaporkan apakah racun tersebut terakumulasi pada biji. Promotor CaMV 35S sering berkelakuan seperti constitutive promotor, dan fusi CaMV 35S-*gus* telah dilaporkan terekspresi pada berbagai jaringan padi termasuk endosperm dan embrio [21, 26, 31]. Irie *et al.* [15] mentransformasi padi dengan fusi antara promotor CaMV 35S dengan gen cystatin jagung dan menemukan bahwa 2% dari total protein biji adalah cystatin jagung. Dengan demikian, fusi CaMV 35S-*cryIA(b)* juga diharapkan terekspresi pada biji. Walaupun terdapat fakta yang berlebihan bahwa insektisida mikrobial [28] dan tanaman transgenik yang mengandung protein CryIA(b) tidak toksik pada vertebrata, tidak adanya ekspresi pada biji akan memperkecil perhatian lembaga pengatur atau konsumen padi.

Aktifitas dan spesifitas jaringan dari promotor PEP carboxylase juga akan mempengaruhi kecepatan penggerek batang untuk beradaptasi terhadap Bt toxin pada padi transgenik. Telah banyak strategi yang diusulkan untuk menunda evolusi ketahanan hama terhadap Bt toxin pada padi transgenik, diantaranya yang paling menjanjikan yaitu penggunaan kombinasi tanaman high dose dengan tanaman perlindungan, sebagai contoh, lahan ditanam dengan varietas non Bt [11, 30]. Pada tanaman high dose, titer toksin sebaiknya cukup tinggi untuk membunuh serangga yang agak tahan, dimana heterozigot pada lokus berasosiasi

dengan ketahanan [11]. Promotor PEP carboxylase diasumsikan tidak aktif pada jaringan inti yang tidak berfotosintesis, dimana kebanyakan larva memakannya pada saat mereka telah berkembang hingga instar ketiga. Dengan demikian, jika larva yang agak tahan (heterozigot) dapat hidup dalam dosis yang dimakan dari jaringan hijau, mereka dapat masuk ke jaringan inti, keluar dari kepadatan toksin lebih banyak, dan terus berkembang. Demikian pula, larva yang agak tahan dapat bertahan hidup pada spikelet dari panikel yang tidak digunakan, yang merupakan tempat makan yang lain untuk larva YSB muda sebelum berpindah ke inti. Promotor PEP carboxylase tidak aktif pada pollen dan pada panikel yang tidak digunakan. Jika palea dan lema tidak hijau lagi, tingkat toksin diasumsikan rendah. Meskipun demikian, pada bioassay keseluruhan tanaman dan po-tongan batang dari tanaman stadia booting, ditemukan banyak larva mati pada spikelet yang belum dewasa. Hal ini memberi kesan bahwa tingkat ekspresi *cryIA(b)* pada struktur tersebut setidaknya cukup untuk mencegah kerusakan yang ekstensif oleh larva yang peka.

Problem potensial dapat diatasi dengan mengkombinasikan promotor PEP carboxylase dengan gen toksin di bawah kendali promotor spesifik inti dan/atau spesifik pollen, atau menggunakan gen *cry* yang menyandi protein yang lebih toksin dibandingkan dengan *cryIA(b)*. Kami telah menghasilkan tanaman transgenik dengan promotor spesifik inti yang mengendalikan gen *cryIA(b)* (untuk dipresentasikan di tempat lain). Perbandingan kinerja kedua promotor pada padi dan reaksi larva serangga pada tanaman-tanaman tersebut akan memberi kita informasi yang lebih terhadap wacana ini.