

Analisis Molekuler dan Uji Ketahanan Tanaman Padi Transgenik yang mengandung Gen Kitinase Generasi ke tiga (T₂) terhadap *Rhizoctonia solani* Kuhn dan *Pyricularia oryzae* Cav

E.S. Mulyaningsih, S. Indrayani, dan I.H. Slamet-Loedin

Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, Jl. Raya Bogor KM 46 Cibinong 16911
email : enunqf@yahoo.com

Diterima Mei 2005 disetujui untuk diterbitkan September 2005

Abstract

Sheath blight and rice blast are two important diseases in rice caused respectively by fungi Rhizoctonia solani and Pyricularia oryzae resulting in considerable yield loss. A study on the segregation pattern of chil gene among four progenies, i.e. lines 1,7,9 and 20, followed by bioassays of both pathogens was conducted. PCR analysis using specific primers for chil gene in 30 plant samples from each line was employed to know the segregation pattern. The results showed that three of the four lines, i.e. 1, 7, and 9 performed Mendelian segregation of 3 : 1. Southern blot analysis further applied on line 1 revealed the presence of six copies of chil gene. Bioassay of P. oryzae carried out at vegetative phase indicated that all lines were susceptible to blast, on the other hands, R. solani bioassay held at heading phase showed that they were all resistant to this fungi.

Key words: blast, sheath blight, R. solani, P. oryzae, Mendelian segregation

Pendahuluan

Di Indonesia padi merupakan tanaman pangan utama di samping jagung, sagu, dan umbi-umbian. Dalam budidaya padi, cekaman biotik berupa hama dan penyakit tanaman masih merupakan ancaman utama (Baharsjah *et al.*, 1998). Penyakit hawar pelepah daun (*Rhizoctonia solani* Kuhn) dan blas (*Pyricularia oryzae* Cav) merupakan dua penyakit utama padi yang disebabkan oleh cendawan. Kedua penyakit ini telah lama dilaporkan sebagai penyakit penting baik pada padi gogo maupun padi sawah di seluruh dunia.

Kerugian akibat penyakit blas cukup besar bila dibandingkan dengan kerugian akibat penyakit lain (Ou, 1972). Sementara itu, penyakit hawar pelepah daun dilaporkan dapat menurunkan produksi padi hingga 20% bila penyakit ini berkembang sampai ke daun bendera (Ou, 1985). Bahkan, menurut Kardin *et al.* (1997) penurunan produksi dapat mencapai 35%. Jika intensitas kedua penyakit ini meningkat, stabilitas produksi yang tinggi akan terancam sehingga dapat mengganggu ketahanan pangan nasional.

Persilangan tanaman secara konvensional untuk mendapatkan tanaman tahan terhadap cendawan sulit untuk dilakukan karena perubahan suatu ras patogen seperti halnya *P. oryzae* berlangsung terlalu cepat bila dibandingkan dengan laju pelepasan varietas-varietas resisten. Oleh karena itu, dalam upaya untuk mendapatkan tanaman padi yang tahan terhadap *R. solani* dan *P. oryzae* perlu ditempuh strategi lain, misalnya melalui konstruksi padi transgenik.

Salah satu metode perakitan tanaman transgenik adalah dengan transformasi genetik melalui *Agrobacterium tumefaciens*. Gen *chil* yang menyandi enzim kitinase dilaporkan bertanggung jawab atas ketahanan tanaman terhadap serangan patogen berupa cendawan. Saat ini telah diperoleh generasi pertama padi transgenik cv Rojolele yang mengandung gen *chil* dengan promotor CaMV. Empat galur padi yang digunakan dalam penelitian ini dipilih berdasarkan atas tingkat aktivitas enzim tersebut pada

generasi sebelumnya. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis pola pewarisan gen *chil* pada generasi ketiga (*T2*) menggunakan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*), mengamati jumlah salinan gen *chil* dalam genom tanaman menggunakan teknik Southern blot, dan melihat tingkat ketahanan tanaman terhadap cendawan *R. solani* dan *P. oryzae*.

Materi dan Metode

Analisis PCR digunakan DNA dari empat galur padi transgenik generasi ketiga (*T2*) yang mengandung gen *chil* dan kontrol, serta primer spesifik kitinase berupa primer *chi* dan primer *goss-5*. Primer *chi* terdiri atas *forward* 5'-TCGCTCTTCGACACCAGATGCT-3' dan *reverse* 5'-AATCCAGGTTATCGCCATAG-3' (Huang *et al.*, 1991), sedangkan primer *goss-5* terdiri atas *forward* 5'-CCGACCTCGAGGACATCGGCAACAG-3' dan *reverse* 5'-GCCGAGAGCAGCAGGAAGCTTGACAGG-3' (Meyer *et al.*, 1992).

Jumlah sampel tanaman untuk setiap galur adalah 30, yang diambil secara acak. DNA untuk uji PCR diisolasi dari daun tiap sampel dengan teknik isolasi sebagai berikut. Daun sepanjang lebih kurang 5 cm dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifuga 1.5 ml, kemudian dimasukkan ke dalam nitrogen cair. Selanjutnya, daun digerus dengan pestel dan ditambahkan bufer isolasi sebanyak 750 µl yang terdiri atas bufer lisis, sarkosil 5%, dan bufer ekstraksi. Bufer lisis terdiri atas Tris-HCl pH 7,5 0,2 M, EDTA 0,05 M, NaCl 2 M, dan CTAB 2%, sedangkan bufer ekstraksi terdiri atas sorbitol 0.35 M, Tris-HCl pH 7,5 0,1 M, dan EDTA 5 mM. Inkubasi dilakukan pada suhu 65°C selama 1 jam dengan membolak-balikkan tabung. Ditambahkan 750 µl kloroform : isoamilalkohol (24:1), kemudian dilakukan sentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C. Lapisan atas diambil lalu dipindahkan ke tabung mikrosentrifuga baru dan ditambahkan 400 µl isopropanol dingin. Sentrifugasi dilakukan lagi selama 6 menit dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C. Endapan dicuci dengan etanol 70% kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C selama 3 menit. Selanjutnya, etanol dibuang dan pelet dikeringkan menggunakan vakum. Pelet kemudian dilarutkan dalam 50 µl bufer TE (Tris-HCl pH 8,0 10 mM dan EDTA pH 8,0 1 mM). Larutan DNA yang diperoleh disimpan pada -20°C.

Volume yang digunakan untuk satu kali reaksi adalah 10 µl dengan komposisi bahan: bufer PCR 1x yang mengandung Mg⁺, dNTP 0,05 mM, Taq DNA polimerase 0,05 u, primer *goss-5 reverse* dan *forward* masing-masing 2,5 ng, primer *chi reverse* dan *forward* masing-masing 2,5 ng, 1 µL DNA hasil isolasi dan dH₂O hingga memenuhi volume reaksi 10 µl. Untuk kontrol negatif digunakan DNA tanaman yang tidak mengandung gen *chil* dan reaksi tanpa DNA tanaman, sedangkan untuk kontrol positif digunakan tanaman transgenik *T₀* yang mengandung gen *chil* dan fragmen gen *chil*.

Kondisi PCR yang digunakan berupa satu tahap denaturasi awal (95°C, 1 menit); 40 siklus amplifikasi (denaturasi 95°C, 1 menit; *annealing* 54°C, 1 menit; sintesis 72°C, 1 menit), dan penyimpanan (4°C, ∞). Hasil PCR divisualisasikan pada elektroforesis gel agarosa 1,2% yang dijalankan selama 75 menit dengan tegangan 70 volt dalam bufer TBE 0,5x (5X TBE: *tris base* 54 g, asam borat 27,5 g, dan EDTA pH 8,0 0,5 M). Hasil elektroforesis diamati pada gel DOC UV.

Pengujian baru dapat dilakukan pada galur 1 menggunakan 4 sub-galur tanaman yang diambil secara acak. Bahan-bahan yang digunakan terdiri atas DNA tanaman hasil isolasi, fragmen gen *chil* hasil PCR sebagai *probe*, enzim restriksi *HindIII*, *AlkPhos Direct Labelling Reagent - kit* (Amersham).

Sebanyak 5 µg DNA genom padi dari galur 1 (dari 4 tanaman /subgalur) dipotong menggunakan enzim restriksi *HindIII* dengan waktu inkubasi semalam, kemudian dielektroforesis pada 0,7% agarosa selama semalam. Selanjutnya, DNA dipindahkan dari gel ke membran dengan sistem kapiler. Pelabelan, hibridisasi, dan deteksi dilakukan mengikuti prosedur *AlkPhos kit* (Amersham). Isolasi DNA tanaman dilakukan dengan cara sebagai berikut. Daun seberat lebih kurang 0,5 g digerus dengan nitrogen cair

kemudian dimasukkan ke dalam tabung sentrifuga 50 ml yang telah berisi 7 ml bufer S (110 mM Tris-HCL pH 8,0; 55 mM EDTA pH 8,0; 1,54 M NaCl; 1,1% CTAB) yang telah dipanaskan pada suhu 65°C lalu divorteks. Kemudian, ditambahkan 7 ml 20% SDS dan dicampur perlahan lalu diinkubasi selama 1 jam pada 65°C sambil setiap 15 menit dihomogenkan. Kemudian, ditambahkan 7 ml kloroform, ditempatkan dalam rotator selama 15 menit pada suhu ruang hingga terbentuk emulsi. Dilakukan sentrifugasi selama 15 menit pada 4°C dengan kecepatan 6000 rpm. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung baru dengan menambahkan isopropanol sebanyak 0,6x volume larutan lalu tabung dibolak-balik hingga terjadi presipitasi DNA. Kemudian, dilakukan sentrifugasi selama 20 menit pada 4°C dengan kecepatan 3000 rpm. Pelet selanjutnya dilarutkan dalam 1ml TE pH 8,0. Untuk mendegradasi RNA, pada setiap tabung sampel ditambahkan 4 µl 10 mg/ml RNaseA (dalam 10 mM Tris-Cl, 15 mM NaCl yang dipanaskan pada 100°C selama 15 menit). DNA hasil isolasi disimpan pada -20°C.

Bahan yang digunakan untuk uji ketahanan meliputi empat galur tanaman padi transgenik cv Rojolele yang mengandung gen kitinase generasi ketiga (T_2) galur 1,7, 9, dan 20, isolat *R. solani* Anastomosis grup (Ag)-1 dan *P. oryzae* (no.173).

Untuk uji ketahanan terhadap *R. solani* digunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan lima ulangan. Analisis data dilakukan menggunakan sidik ragam dengan tingkat kepercayaan 95%. Inokulasi isolat dilakukan pada fase vegetatif (\pm 120 hari) dengan cara mengikatkan biakan patogen pada pelepah daun. Parameter yang diamati adalah tingkat kerusakan tanaman (skala) yang ditentukan dengan rumus standar evaluasi *International Rice Testing Program* (IRTP, 1988):

$$\frac{4N_4 + 3N_3 + 2N_2 + 1N_1 + 0N_0}{4N} \times 100\%$$

Keterangan:

- N_4 = Jumlah anakan dengan skor 7
- N_3 = Jumlah anakan dengan skor 5
- N_2 = Jumlah anakan dengan skor 3
- N_1 = Jumlah anakan dengan skor 1
- N_0 = Jumlah anakan dengan skor 0
- N = Jumlah total ($N_4 + N_3 + N_2 + N_1 + N_0$)

Skala kerusakan :

- 0 = tidak ada infeksi
- 1 = kerusakan pada pelepah ke I (paling bawah)
- 3 = kerusakan pada pelepah ke I + II
- 5 = kerusakan pada pelepah ke I + II + III
- 7 = semua pelepah rusak

Sementara itu, untuk uji ketahanan terhadap *P. oryzae* digunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan tiga ulangan yang terdiri atas 15 tanaman per ulangan. Analisis data dilakukan menggunakan sidik ragam dengan tingkat kepercayaan 95%. Inokulasi isolat dilakukan pada tanaman berumur 18 hari (fase bibit) dengan cara menyemprotkan suspensi konidia (2×10^5 konidium/ml) dengan volume semprot 200ml/ulangan. Parameter yang diamati adalah jumlah bercak yang terjadi pada tiap daun dengan penentuan skala kerusakan menurut standar evaluasi IRTP 1988. Hasil skoring skala kerusakan menentukan nilai intensitas serangan yang dihitung dengan rumus:

$$I = \sum \frac{(n \times v)}{N \times V} \times 100\%$$

Keterangan :

- I = Intensitas serangan
- n = Jumlah tanaman yang terserang pada skala yang sama
- v = Nilai skala yang bersangkutan
- N = Jumlah tanaman yang diamati
- V = Nilai skoring pada skala tertinggi (Anonim, 1985)

Nilai skala :

- 0% - 25% = Tanaman tahan (T) terhadap serangan
- 26% - 100% = Tanaman rentan (R) terhadap serangan

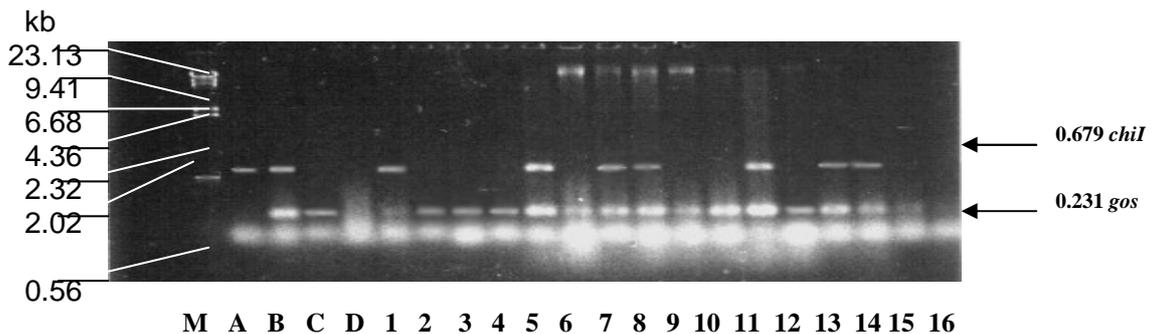
Hasil dan Pembahasan

Dengan diperolehnya pita produk amplifikasi berukuran 679 pb dan 231 pb sebagai hasil amplifikasi menggunakan primer *goss-5* (Gambar 1) dapat dikatakan bahwa gen *chil* diwariskan pada keempat galur padi transgenik yang diuji (galur 1, 7, 9, dan 20). Jumlah tanaman hasil analisis PCR dari setiap galur padi transgenik dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Jumlah tanaman hasil PCR dari galur padi transgenik generasi ketiga (T_2)
Table 1. The number of third generation (T_2) transgenic rice lines showing PCR result of analysis

Galur	Jumlah tanaman uji	<i>goss-5</i> positif	<i>chil</i> positif
1	30	30	18
7	30	30	20
9	30	30	18
20	30	30	15

Galur-galur yang menunjukkan PCR positif pada gen *chil* selanjutnya dianalisis dengan uji khi-kuadrat (χ^2) untuk mengetahui pola segregasi gen tersebut (Tabel 3).



M = λ Hind III; A = fragmen *chil*; B = kontrol tanaman positif; C = kontrol tanaman negatif; D = air, 1-4 = sampel tanaman galur 20; 5-8 = sampel tanaman galur 1; 9-12 = sampel tanaman galur 7; dan 13-16 = sampel tanaman galur 9.

Gambar 1. Elektrofogram hasil PCR perwakilan keempat galur padi transgenik yang diuji

Figure 1. Electrophoregram of PCR products of representative four transgenic rice lines tested

Tabel 2. Hasil analisis uji khi-kuadrat tanaman padi transgenik generasi ketiga (T_2)
 Table 2. Chi-square analysis of third generation (T_2) transgenic rice lines

Galur	Kelas	Jumlah yang diamati (O)	Jumlah yang diharapkan (E)	$(O - E)^2$	$\frac{(O - E)^2}{E} = \chi^2$	χ^2 tabel (α 0.05)
1	Positif <i>chil</i>	18	22.5	20.25	0.9	3.84
	Negatif <i>chil</i>	12	7.5	20.25	$\frac{2.7}{20.25}$	
7	Positif <i>chil</i>	20	22.5	6.25	0.28	
	Negatif <i>chil</i>	10	7.5	6.25	$\frac{0.83}{6.25}$	
9	Positif <i>chil</i>	18	22.5	20.25	0.9	
	Negatif <i>chil</i>	12	7.5	20.25	$\frac{2.7}{20.25}$	
20	Positif <i>chil</i>	15	22.5	56.25	2.5	
	Negatif <i>chil</i>	15	7.5	56.25	$\frac{7.5}{7.5}$	

Hipotesis :

H_0 : Data yang diamati sesuai dengan nisbah 3:1; H_1 : Data yang diamati tidak sesuai dengan nisbah 3:1

Jika χ^2 hitung < χ^2 tabel (db = 1, α 0.05 = 3.84), maka H_0 diterima.

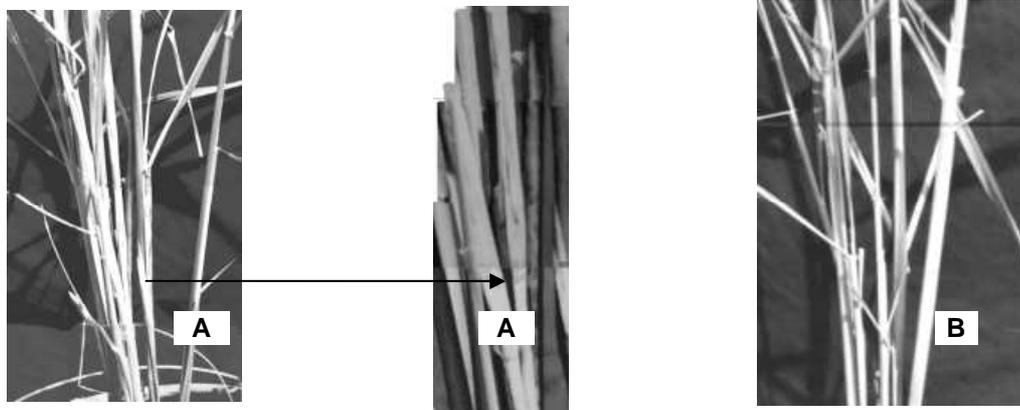
Analisis segregasi terhadap galur yang PCR positif mengandung gen *chil* (galur 1, 7, 9 dan 20) digunakan untuk mengetahui sisi integrasi pada lokus tunggal dengan rasio segregasi 3:1 sesuai dengan pola Mendelian. Berdasarkan atas tabel 3 terlihat bahwa galur 1, 7, dan 9 mempunyai rasio segregasi 3:1 sehingga diduga bahwa gen *chil* terintegrasi pada lokus tunggal. Sementara itu, galur 20 tidak mengikuti pola segregasi Mendelian untuk lokus tunggal dan diduga transgen terintegrasi secara ekstrakromosomal. Pewarisan ekstrakromosomal merupakan pewarisan yang dikontrol oleh gen yang ada di luar inti (nukleus). Menurut Hartana (1992) beberapa kejadian atau bukti yang dapat digunakan sebagai petunjuk bahwa suatu sifat diwariskan secara ekstrakromosomal adalah nisbah segregasi tidak Mendelian, suatu sifat ditransmisikan secara maternal, dan gen-gen tidak dapat dipetakan pada kromosom/kelompok keterpautan tertentu.

Perakitan tanaman transgenik pada dasarnya tidak mengharapkan jumlah salinan gen yang banyak. Transgenik yang diharapkan cukup membawa satu salinan gen. Jumlah salinan gen yang banyak dapat menyebabkan terjadinya pembungkaman gen pascatranskripsi karena terjadinya degradasi transkrip yang berlebihan (Kumpatla *et al.* 1998). Hasil analisis menunjukkan tidak adanya perbedaan jumlah dan pola transgen yang diperoleh dari sub-sub galur 1. Jumlah salinan gen pada semua subgalur (1.25, 1.3, 1.4 dan 1.26) sebanyak enam buah. Diduga jumlah salinan gen ini tidak akan menyebabkan pembungkaman gen. Christou (2001) melaporkan bahwa jumlah salinan gen antara 1 dan 10 tidak menyebabkan pembungkaman gen pada tanaman transgenik sereal. Jumlah dan pola transgen yang sama antara subgalur menguatkan dugaan bahwa tanaman-tanaman tersebut berasal dari kegiatan transformasi dan kalus yang sama pada saat awal perakitan. Salinan gen yang ada pada galur 1 ini diduga juga terintegrasi dalam genom pada lokus yang sama (tunggal) berdasarkan atas konfirmasi dengan pola pewarisan gen yang mengikuti segregasi Mendel. Hasil analisis disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Hasil analisis southern blot dari galur 1
Figure 2. Southern blotting analysis of line 1

Hasil uji ketahanan terhadap penyakit hawar pelepah daun tanaman padi transgenik dan kontrol disajikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Gejala serangan hawar pelepah daun pada kontrol (A) dan transgenik (B)
Figure 3. Symptoms of sheath blight at control (A) and transgenic plant (B)

Gejala yang diamati berupa bercak pada pelepah daun dan batang. Bercak yang muncul berukuran besar, berbentuk elips, dengan tepi tidak teratur yang berwarna coklat kemerahan dengan bagian pusat berwarna seperti jerami/kuning kehijauan (Semangun, 1990). Pada tanaman kontrol cv Rojolele, bercak terlihat mulai dari pelepah daun bagian bawah dan berkembang ke pelepah daun bagian atas. Dengan demikian, penyakit ini dapat menyebar secara vertikal mulai pangkal tanaman hingga ke bagian atas (daun bendera dan malai), sedangkan secara horizontal penyebaran miselia melalui sentuhan dari batang ke batang atau dari rumpun ke rumpun (Ou. 1976; Amir dan Kardin. 1991). Pada varietas rentan, bercak berkembang sampai daun bendera dan pada serangan berat seluruh daun menjadi hawar. Hasil pengamatan pada keempat galur tanaman padi transgenik yang diuji menunjukkan ada sedikit bercak pada bagian bawah tanaman tetapi miselia tidak berkembang.

Analisis ragam terhadap intensitas serangan menunjukkan bahwa ada perbedaan nyata antara keempat galur transgenik bila dibandingkan dengan tanaman kontrol mulai 10, 15, dan 20 hsi. Intensitas serangan keempat galur transgenik dan kontrol dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 3. Intensitas serangan (%) *R. solani* terhadap keempat galur transgenik dan kontrol pada 10, 15, dan 20 hsi.

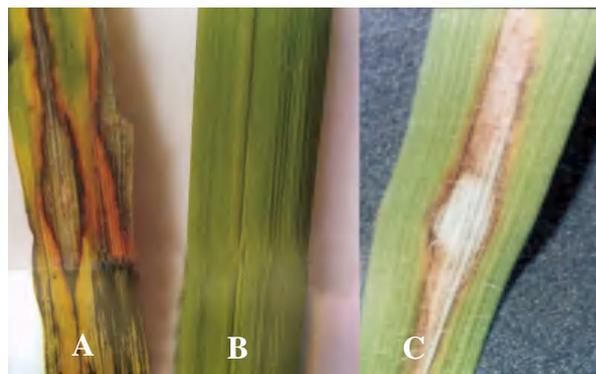
Table 3. Intensity of *R. solani* infection (%) on the four transgenic lines and control at 10, 15, and 20 dai.

Galur Rojolele transgenik	Pengamatan (hsi)		
	10 hsi	15 hsi	20 hsi
Galur			
1	10 a	17,917 a	19,101 a
7	18,333 a	26,131 a	29,881 a
9	17,033 a	22,5 a	27,333 a
20	11 a	12,988 a	17,5 a
Kontrol	47,083 b	57,166 b	62,25 b

Keterangan: Rata-rata yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan nyata menurut uji jarak berganda Duncan pada taraf 5%

Berdasarkan atas tabel tersebut terlihat bahwa nilai rata-rata intensitas serangan pada tanaman transgenik (galur 1, 7, 9, dan 20) umumnya lebih kecil bila dibandingkan dengan tanaman kontrol. Tingkat serangan berkisar antara 10% dan 29,881% sejak 10 hsi hingga 20 hsi, sedangkan pada tanaman kontrol berkisar antara 47,083 dan 62,25%. Diduga tingkat aktivitas enzim kitinase yang dihasilkan dari semua tanaman transgenik yang diuji cukup tahan terhadap serangan *R. solani*. Aktivitas enzim kitinase dalam tanaman diduga mampu mendegradasi senyawa kitin dalam struktur dinding sel miselia cendawan patogen sehingga patogen ini menjadi lemah dan mati serta tidak mampu menginfeksi tanaman (Ikeda *et al.*, 1996). Pada Tabel 4 terlihat pula nilai rata-rata intensitas serangan pada galur 1 dan 20 lebih kecil bila dibandingkan dengan nilai rata-rata intensitas serangan pada galur 7 dan 9. Diduga aktivitas enzim kitinase pada galur 1 dan 20 lebih tinggi sehingga tanaman lebih tahan terhadap serangan patogen *R. solani*. Hasil ini berkorelasi dengan tingkat aktivitas enzim yang dilakukan pada generasi pertama (Mulyaningsih, 2001) yang memperlihatkan bahwa aktivitas enzim kitinase pada galur 1 dan 20 lebih tinggi bila dibandingkan dengan aktivitasnya pada galur 7 dan 9.

Hasil uji ketahanan padi transgenik dan kontrol terhadap serangan penyakit blas disajikan pada Gambar 4. Gejala serangan blas pada daun berupa bercak berbentuk elips dengan kedua ujung yang kurang lebih runcing, berwarna coklat pada bagian tepi dan putih keabuan pada bagian tengah. Baik pada kultivar rentan (Kencana Bali) maupun Rojolele transgenik terlihat adanya gejala blas. Gejala tersebut berupa bercak yang berkembang makin luas dan menyatu sehingga helai daun menjadi kering dan mati. Hal ini terjadi karena didukung oleh kondisi lingkungan yang dibuat agar udara menjadi lembab (Amir dan Kardin, 1991). Sebaliknya, pada tanaman kontrol tahan (cv Asahan) tidak terlihat gejala serangan penyakit blas.



Gambar 4. Gejala serangan blas pada daun kontrol rentan (A); tahan (B); dan transgenik (C)

Figure 4. Symptoms of leaf blast at susceptible control (A); resistant (B); and transgenic plant (C)

Hasil analisis ragam intensitas serangan menunjukkan bahwa terdapat perbedaan nyata antara keempat galur transgenik bila dibandingkan dengan tanaman kontrol tahan (cv Asahan) pada pengamatan 3, 6, 9, 12, dan 15 hsi. Skala intensitas serangan menunjukkan bahwa semua galur tanaman padi transgenik (1, 7, 9, dan 20) rentan terhadap penyakit blas dengan tingkat kerentanan berbeda bila dibandingkan dengan kontrol cv Kencana Bali (Tabel 5).

Tabel 4. Nilai skala intensitas serangan (%) *P. oryzae* terhadap keempat galur padi transgenik dan kontrol

Table 4. Scale values of *P. oryzae* intensity of infection (%) on the four transgenic rice lines and control

Tanaman	Pengamatan (hsi)				
	3	6	9	12	15
Galur 1	6,7ab (T)	32,3b (R)	56b (R)	78,3b (R)	92,3b (R)
Galur 7	13,7ab (T)	30,7b (R)	60,7b (R)	83,3b (R)	95,7b (R)
Galur 9	32,7b (R)	43,3b (R)	74b (R)	92bc (R)	97,7b (R)
Galur 20	24,7ab (T)	41b (R)	69,7b (R)	84,7b (R)	98,7b (R)
Var. Rojolele	37b (R)	70,3bc (R)	81b (R)	93b (R)	97,7b (R)
Kencana Bali	74c (R)	83,3c (R)	99,3c (R)	100c (R)	100c (R)
Asahan	0a (T)	0a (T)	0a (T)	0a (T)	0a (T)

Keterangan: Rata-rata yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut uji jarak berganda Duncan pada taraf 5%. R = rentan; T = tahan; hsi = hari setelah inokulasi

Berdasarkan atas tabel tersebut terlihat bahwa semua galur padi transgenik mulai rentan sejak 6 hsi, sedangkan galur 9 tingkat kerentanannya sudah dapat dilihat sejak 3 hsi. Hal ini menunjukkan bahwa tingkat virulensi cendawan *P. oryzae* ras 173 cukup tinggi dalam menginfeksi tanaman. Dengan demikian, meskipun upaya peningkatan aktivitas enzim kitinase telah diupayakan dengan maksud meningkatkan ketahanan terhadap patogen cendawan, ternyata tidak semua jenis patogen dapat dikendalikan serangannya. Hal serupa terjadi pula pada transgenik tembakau yang mengandung gen kitinase. Gen yang ditargetkan pada vakuola dengan ekspresi tinggi tersebut ternyata tidak cukup tahan terhadap serangan cendawan (Neuhaus *et al.*, 1991 *dalam* Karabi *et al.*, 2001; Nielsen *et al.*, 1993 *dalam* Karabi *et al.*, 2001).

Kesimpulan

Berdasarkan atas hasil PCR, keempat galur padi transgenik (1, 7, 9, dan 20) masih membawa gen *chil* pada generasi ketiga (T_2). Galur 1, 7, dan 9 bersegregasi mengikuti pola Mendelian untuk lokus tunggal (3:1), sedangkan galur 20 tidak mengikuti pola tersebut. Dari 4 subgalur nomor 1 yang diuji, jumlah salinan gen *chil* ada enam. Keempat galur tersebut tahan terhadap serangan *R. solani* AG-1 fase vegetatif tetapi rentan terhadap *P. oryzae* pada fase bibit.

Ucapan Terima Kasih

Disampaikan terima kasih kepada Bapak Dr. Mukelar Amir, Ibu Ir. Anggi, Pak Ade dari Balitpa Muara atas bantuan, saran, dan masukannya. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Dwi Astuti atas bantuan yang diberikan di laboratorium selama kegiatan penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Amir, M. dan M. K. Kardin. 1991. Pengendalian Penyakit Jamur *dalam* Buku 3. Padi. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan, Bogor. Hal 826.
- Baharsjah, S., F. Kasryno, dan D. H. Darmawani. 1988. Kedudukan Padi dalam Perekonomian Indonesia. Badan Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan. Bogor. Hal 12.
- Christou, P. 2001. Transgene integration, organization and expression in cereals. In: Khush G.S., D.S.Brar and B. Hardy (eds) 2001. Proceeding of the fourth Intl. Rice gene symposium. 22-27 October 2000. Los Banos Philippines. New Delhi (India): Science publishers. Inc and Los Banos (Philippines). IRRI. 488p.
- Hartana, A. 1992. Genetika Tumbuhan. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Ilmu Hayat Institut Pertanian Bogor. Hal 113.
- Huang, J. K., L. Wen, M. Swegle, H. Tran, H. Thin, H. M. Naylor, S.. Muthukrishnan and G. R. Reeck. 1991. Nucleotide sequence of rice genimic clone that encodes a class I endochitinase. *Plan mol. Biol.* 166:479-480.
- Ikeda, S., H. Toyoda, Y. Matsuda, M. Kurokawa, T. Tamai, K. Yoshida, C. Kami, T. Ikemoto, M. Enomoto, K. Shiraishi, S. Miyamoto, M. Hanaoka, and S. Ouchi. 1996. Cloning of chitinase gene *chi* SHI cloned from gram-positive bacterium *Kurthia zopfii* and control of powdery mildew of barley. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 62:11-16.
- IRTP. 1988. Standard Evaluation System for Rice. International Rice Testing Program, Los Banos, Philippines.
- Kardin, M. K., H. Purwanti, A. Nasution dan Sutoyo. 1997. Penyakit hawar pelepah daun padi (*Rhizoctonia solani*): permasalahan dan prospek pengendaliannya di Indonesia. *Bul. Agro. Bio* 1(2): 9-4.
- Karabi, D., J. Tu, N. Oliva, I. Ona, R. Velazhahan, T. W. Mew, S. Muthukrishnan, and S. K. Datta. 2001. Enhanced resistance to sheath blight by constitutive expression of infection-related rice chitinase in transgenic elite indica rice cultivars. *Plant Science* 160: 405-414.

- Kumpatla. S.P., M.B. Chandrasekharan, L.M. Iyer, G. Li, and T.C. Hall. 1998. Genome intruder scanning and modulation system and transgene silencing. Trends in Plant Science 3(3): 97-104.
- Meyer, A., G. B. Zondag, and L. A. M. Hengens. 1992. A simple screening method for transgenic rice tissue based on PCR. Rice Genetic Newsletter 8: 161-165.
- Mulyaningsih, E. S. 2001. Introduksi Gen Chitinase pada Tanaman Padi (*Oryza sativa* L.) melalui *Agrobacterium tumefaciens*. Tesis. Institut Pertanian Bogor.
- Ou, S. H. 1972. Rice Disease. Commonwealth Mycological Institute. Kew Surrey, England.
- Ou, S. H. 1976. Rice Disease. Commonwealth Mycological Institute. Kew Surrey, England.
- Ou, S. H. 1985. Rice Disease. Commonwealth Mycological Institute. Kew Surrey, England.
- Semangun, H. 1990. Penyakit-penyakit Tanaman Pangan di Indonesia. Gajah Mada Press, Yogyakarta. Hal 239-241.