

Transformasi Ubi Jalar dengan Gen *pinII* dan Gen CP-SPFMV

A. Dinar Ambarwati, Atmitri Sisharmini, Tri J. Santoso, M. Herman, dan Minantyorini

Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian

ABSTRAK

Perakitan varietas ubi jalar transgenik tahan hama atau penyakit dapat dilakukan dengan rekayasa genetika melalui teknologi transformasi. Pada tahun 2001 dilakukan penelitian transformasi ubi jalar dengan gen *pinII* atau CP-SPFMV untuk mendapatkan ketahanan terhadap hama boleng atau penyakit virus. Transformasi dilakukan dengan mengintroduksi gen *pinII* atau CP-SPFMV dengan teknik transformasi melalui penembakan partikel dan *Agrobacterium tumefaciens*. Transformasi melalui penembakan partikel menggunakan plasmid *pTWa* (*pinII*, *bar*), sedangkan melalui *A. tumefaciens* menggunakan strain LBA4404 yang berisi *pGA643 pin* (*pinII*, *nptII*) atau plasmid biner *pMON10574-1* dan *pMON10575-1* yang berisi gen CP-SPFMV, *gus*, dan *nptII*. Eksplan daun dan petiol ubi jalar varietas Jewel digunakan sebagai jaringan target. Perlakuan (pre-treatment) eksplan sebelum transformasi dengan merendam eksplan dalam media A3 cair (1/10 MS basal salt, 212,2 mg/l asam galakturonat, 3,9 g/l MES, 30 g/l sukrosa) dapat meningkatkan efisiensi transformasi 20-56%. Transformasi melalui penembakan partikel menghasilkan 1 tunas transforman yang diduga mengandung gen *pinII* sedangkan melalui *A. tumefaciens* telah menghasilkan 13 tanaman putatif transgenik yang ditransformasi dengan gen *pinII* dan 6 tanaman dengan gen CP-SPFMV.

Kata kunci: Transformasi, ubi jalar, gen *pinII*, gen CP-SPFMV

ABSTRACT

The production of transgenic sweet potato resistant to pest and virus diseases can be done by genetic engineering through transformation techniques. In the year 2001 the experiment on transformation of sweet potato resistant to weevil or virus disease was conducted. Transformation was performed by introducing *proteinase inhibitor* (*pinII*) gene or *coat protein-SPFMV* gene with transformation techniques of particle bombardment and *Agrobacterium tumefaciens*. Transformation through particle bombardment used plasmid *pTWa* (*pinII*, *bar*), whereas through *A. tumefaciens* used strain LBA4404 containing *pGA643 pin* (*pinII*, *nptII*) or binary plasmid *pMON10574-1* and *pMON10575-1* containing CP-SPFMV, *gus*, and *nptII* gene. Explants from petiole and leaf pieces of Sweet potato cv. Jewel were used as target tissue. Pre-treatment of explant before transformation by soaking in A3 liquid media (1/10 MS basal salt, 212.2 mg/l galacturonic acid, 3.9 g/l MES, 30 g/l sucrose) can increase transformation efficiency as much as 20-56%. So far, transformation through particle bombardment produced 1 shoot transformant that is suspected to contain *pinII* gene, whereas through *A. tumefaciens* produced 13 putative transgenic plants transformed with *pinII* gene and 6 putative transgenic plants with CP-SPFMV gene.

Key words: Transformation, sweet potato, *pinII* gene, CP-SPFMV gene

PENDAHULUAN

Kendala utama produksi ubi jalar adalah serangan hama boleng dan penya-kit virus. Sampai saat ini, pengembangan varietas tahan terhadap hama maupun virus ubi jalar merupakan alternatif yang tepat untuk pengendalian. Perakitan varietas tahan hama atau penyakit dapat dilakukan dengan rekayasa genetika melalui teknologi transformasi.

Secara garis besar teknik transformasi dapat dibedakan atas transformasi melalui *Agrobacterium* dan transformasi secara langsung misalnya dengan mikro-injeksi, elektroporasi, protoplas maupun dengan penembakan partikel (Prakash dan Varadarajan, 1992; Songstad *et al.*, 1995; Oliveira *et al.*, 1996).

Sebagian besar penelitian transformasi untuk menghasilkan tanaman yang tahan terhadap serangga, difokuskan pada protein yang mengandung kode gen tunggal, salah satunya adalah *proteinase inhibitor* (*pinII*) (Ryan, 1990). Sedangkan transformasi untuk menghasilkan tanaman yang tahan terhadap virus adalah dengan mengintroduksi gen *coat protein*. Pada ubi jalar penyisipan gen *proteinase inhibitor* (*pinII*) atau gen CP-SPFMV ke dalam genom tanaman melalui penembakan partikel atau *Agrobacterium tumefaciens* adalah cara yang bisa ditempuh untuk memperoleh tanaman ubi jalar tahan hama boleng atau penyakit virus *SPFMV*.

Pengujian efisiensi transformasi yang segera dapat dilakukan adalah menggunakan gen penanda (gen *gusA*) penyandi enzim β -glucuronidase dan gen penye-leksi tanaman berupa gen ketahanan terhadap antibiotik. Seleksi pada media dengan antibiotik tertentu hanya meloloskan kalus transforman yang benar-benar tahan untuk beregenerasi membentuk tanaman (Otani *et al.*, 1998).

Beberapa pendekatan teknik transformasi melalui *A. tumefaciens* telah menghasilkan tanaman ubi jalar transgenik varietas Jewel yang mengandung gen *cowpea trypsin inhibitor* (CTI) (Newell *et al.*, 1995). Otani *et al.* (1998) memperoleh tanaman ubi jalar Kokei 14 yang mengekspresikan gen *gus* setelah melalui peng-ujian molekuler. Transformasi secara langsung melalui elektroporasi dan penem-bakan partikel dengan gen CP-SPFMV telah menghasilkan tanaman yang mengandung gen CP dari SPFMV.

Penelitian transformasi ubi jalar pada tahun 2000 telah menghasilkan beberapa tanaman putativ transgenik yang ditransformasi dengan gen *pinII* atau gen CP-SPFMV melalui *A. tumefaciens*, tetapi jumlahnya belum memadai dan baru ber-hasil pada varietas Jewel, sedangkan melalui penembakan partikel belum diper-oleh tanaman putatif transgenik.

Kegiatan transformasi dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan trans-forman optimal yang mengandung gen *pinII* dan CP-SPFMV baik melalui penem-bakan partikel maupun *A. tumefaciens* untuk bisa dilanjutkan dengan pengujian integrasi gen secara molekuler maupun pengujian ekspresinya melalui bioasai.

BAHAN DAN METODE

Transformasi dilakukan pada varietas Jewel yang pada penelitian sebelumnya telah diregenerasikan secara embriogenesis atau organogenesis.

Transformasi dengan Gen *pinII* atau CP-SPFMV melalui *A. tumefaciens*

Transformasi untuk ketahanan terhadap hama menggunakan *Agrobacterium* strain LBA4404 yang mengandung *pGA643* *pin* dan gen ketahanan terhadap anti-biotik kanamisin. Sedangkan transformasi untuk ketahanan terhadap virus menggunakan *pMON10574-1* dan *pMON10575-2* yang mengandung gen *nptII*, *uidA*, dan CP-SPFMV dari Dr. Jeff M. Lowe (Monsanto, USA). *Agrobacterium* yang mengandung plasmid ditumbuhkan pada media LB padat yang mengandung 50 mg/l kana-misin atau streptomisin 300 mg/l selama 2 hari pada suhu 27°C. Satu ose koloni bakteri ditumbuhkan pada media LB cair yang mengandung kanamisin atau streptomisin selama 24 jam pada suhu 27°C sambil digoyang. Satu ml kultur bakteri tersebut ditumbuhkan pada 20 ml media A3K cair (1/10 MS basal salt + 212,2 mg/l asam galakturonat + 3,9 g/l MES + 200 µM asetosiringon) selama 3 jam dan kultur siap digunakan untuk transformasi. Prosedur transformasi yang digunakan menurut metode Newell *et al.* (1995) yang dimodifikasi. Eksplan daun atau petiole ditumbuhkan pada media induksi kalus selama 3-4 hari, kemudian direndam dalam media A3K cair selama 1 jam dan dalam suspensi bakteri selama 30 menit. Selanjutnya ditransfer ke media ko-kultivasi dan diinkubasi pada suhu 28°C dalam kondisi gelap. Setelah tahap ko-kultivasi eksplan dicuci dengan akuades steril dengan cefotaksim 250 mg/l dan sebagian diuji tingkat keberhasilan transformasinya dengan bufer *gus* (Jefferson *et al.*, 1987). Selanjutnya eksplan yang lain ditransfer ke media seleksi (pendewasaan embrio maupun regenerasi) dengan penambahan 500 mg/l karbenisilin atau 250 mg/l sefotaksim dan 50-100 mg/l kanamisin. Kultur diinkubasi dalam 16 jam fotoperiodik hingga terbentuk planlet.

Transformasi dengan Gen *pinII* melalui Penembakan Partikel

Metode transformasi melalui penembakan partikel menggunakan prosedur Klein *et al.* (1988) dengan alat *gen gun* (biolistic PDS 1000/He) dari Biorad. Kondisi yang digunakan untuk penembakan adalah berdasarkan hasil optimasi penelitian tahun 1999/2000, yaitu tekanan gas Helium 1100 psi, jarak tembak 7-9 cm dengan jumlah tembakan 2 kali, umur jaringan target 5-7 hari, dan tanpa osmotikum. Pada tahun 2001 dilakukan penyeleksian kalus hasil transformasi secara bertingkat dengan kadar basta 0,5-1mg/l. Transformasi dilakukan dengan *pTWa* yang mengandung gen *pinII* dan gen penanda seleksi *bar* tanpa ko-transformasi. Eksplan hasil transformasi selanjutnya

ditumbuhkan pada media pendewasaan embrio dan regenerasi dengan agen penyeleksi yang sesuai.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Transformasi Ubi Jalar dengan Gen *pinII*

Transformasi ubi jalar dengan gen *pinII* dilakukan dengan menggunakan dua teknik transformasi, yaitu melalui penembakan partikel dan *A. tumefaciens*. Transformasi melalui penembakan partikel pada penelitian tahun sebelumnya menggunakan sistem ko-transformasi dengan mengkombinasikan dua macam plasmid, yaitu *pTWa* yang mengandung gen *pinII* dan gen penanda seleksi *bar* dengan *pRQ6* yang mengandung gen pelapor *gus* dan gen penanda *hpt* (ketahanan anti-biotik higromisin). Untuk penelitian tahun ini transformasi dilakukan hanya menggunakan satu macam plasmid yang berisi gen target, yaitu *pTWa*. Proses seleksi dilakukan dengan dua kali subkultur pada media seleksi basta 0,5 mg/l. Hasil menunjukkan bahwa transforman yang terseleksi menjadi semakin berkurang, bahkan setelah kurang lebih 3 bulan di media seleksi hanya 1 kalus dari eksplan petiole yang bisa bertahan di media tersebut. Dari 1 kalus tersebut sudah muncul embrio somatik dan baru berhasil diregenerasikan 1 tunas transforman (Tabel 1). Embrio dan tunas yang dihasilkan masih dalam tahap pendewasaan di media regenerasi tanpa seleksi (Gambar 1).

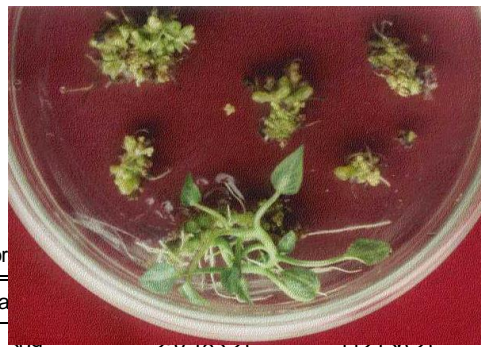
Rendahnya transforman yang terseleksi disebabkan transformasi dengan teknik penembakan partikel bersifat random sehingga tidak semua sel atau jaringan tertransformasi dan mungkin konsentrasi basta yang digunakan terlalu tinggi, sehingga ikut mematikan sel-sel atau jaringan yang tertransformasi. Oleh karena itu, konsentrasi basta perlu diturunkan lagi menjadi kurang dari 0,5 mg/l sehingga lebih efektif untuk menyeleksi sel atau jaringan transforman. Pemilihan jenis dan konsentrasi seleksi yang tepat sangat penting dalam proses transformasi karena akan memberikan seleksi yang ketat untuk sel dan jaringan transforman (Chibbar dan Kartha, 1994). Selain itu, agen penyeleksi dapat juga menghambat pertumbuhan sel-sel atau jaringan transforman, sehingga pertumbuhan atau regenerasinya memerlukan waktu yang lebih lama dibandingkan dengan kontrol.

Sistem transformasi lain yang digunakan dalam penelitian ini adalah melalui vektor *A. tumefaciens*. Perlakuan yang digunakan sesuai dengan hasil optimasi penelitian tahun sebelumnya, yaitu dengan penambahan asetosiringone 200 µM pada larutan A3 (pre-treatment) dan pada media kultivasi. Jalur regenerasi yang digunakan berdasarkan pada metode, sedangkan metode transformasi mengikuti Newell *et al.* (1995). Seleksi transforman menggunakan antibiotik kanamisin 50 mg/l dengan dua kali periode subkultur. Hasil menunjukkan bahwa transforman yang terseleksi semakin berkurang bahkan eksplan yang terseleksi tidak semuanya bisa beregenerasi (Tabel 2). Karena agen penyeleksi di samping menghambat sel-

Tabel 1. Transformasi ubi jalar dengan gen *pinII* (*pTWa*) melalui penembakan partikel

Eksplan	Jumlah eksplan	Kalus terseleksi I	Kalus terseleksi II	Regenerasi
Daun	164	143 (87,2)	91(55,5)	-
Petiol	325	241(74,2)	128(39,4)	1(0,3)

Seleksi = basta 0,5 mg/l; *pTWa* = *pinII*; *bar*; angka dalam kurung menyatakan persentase



Gambar 1. Embrio dan tunas transforman di media regenerasi tahap

Tabel 2. Transformasi ubi jalar dengan gen *pinII* (*pTWa*) melalui penembakan partikel

Eksplan	Jumlah	Seleksi dengan <i>A. tumefaciens</i>	
		Tunas	Planlet
Daun	509	237 (46,5)	112 (22,0)
Petiol	549	400 (72,9)	282 (51,4)

Seleksi = kanamisin 50 mg/l; *pTWa* = *pinII*; *bar*; angka dalam kurung menyatakan persentase

sel atau jaringan yang tidak tertransformasi juga dapat memperlambat pertumbuhan sel-sel atau jaringan transforman.

Dari eksplan daun dan petiole yang digunakan ternyata petiole menghasilkan tunas transforman yang lebih banyak dibandingkan dengan eksplan dari daun. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Prakash dan Varadarajan (1992) bahwa petiole merupakan bagian tanaman ubi jalar yang cocok atau sesuai digunakan untuk transformasi melalui *A. tumefaciens*.

Dari 30 planlet yang dihasilkan pada transformasi ini, hanya 13 tanaman yang berhasil diaklimatisasi. Selanjutnya tanaman diuji secara molekuler untuk mengkonfirmasi keberadaan gen *pinII* dalam genom tanaman ubi jalar.

Transformasi Ubi Jalar dengan Gen CP-SPFMV

Transformasi dengan gen CP-SPFMV ini dilakukan dengan teknik *A. tumefaciens*. Hasil transformasi dengan gen ini efisiensinya masih sangat rendah, hal ini bisa dilihat dari hasil uji *gus* pada eksplan ubi jalar setelah transformasi dengan gen CP-SPFMV, yaitu sekitar 8,7%. Oleh karena itu, perlu dilakukan optimasi lagi agar efisiensi transformasi yang dicapai lebih baik. Perlakuan yang digunakan pada transformasi ini adalah merendam eksplan sebelum transformasi dalam larutan A3 cair dengan atau tanpa penambahan asetosiringone selama 1 jam. Tujuannya adalah untuk mengkondisikan eksplan supaya siap untuk ditransformasi sehingga akan meningkatkan efisiensi transformasi. Untuk mengetahui tingkat efisiensi transformasi maka dilakukan pengujian aktivitas gen *gus* yang bertujuan untuk melihat secara awal apakah gen yang diintroduksi bisa terekspresi, yang ditunjukkan dengan timbulnya warna biru bila gen tersebut diekspresikan dalam jaringan target. Hasil transformasi setelah diuji dengan gen *gus* menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang nyata antara perlakuan dengan atau tanpa penambahan asetosiringone maupun antara 2 konstruksi plasmid yang digunakan untuk transformasi (Tabel 3). Apabila dibandingkan dengan hasil penelitian tahun sebelumnya efisiensi transformasi yang dicapai lebih tinggi, yaitu berkisar antara 20-56%. Dengan terekspresinya gen *gus* ini diharapkan gen target juga ikut terekspresi, karena gen CP-SPFMV ini terdapat pada T-DNA dalam satu konstruksi plasmid dengan gen *gus* dan *nptII*. Dari 2 macam eksplan yang digunakan, hanya eksplan petiole yang dapat beregenerasi dan telah dihasilkan 6 tanaman yang telah berhasil diaklimatisasi (Tabel 4).

Hasil menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan antara tanaman transforman dan tanaman kontrol setelah diaklimatisasi pada media tumbuh air. Selanjutnya tanaman diuji secara molekuler untuk mengkonfirmasi ada tidaknya gen CP-SPFMV dalam genom tanaman ubi jalar.

KESIMPULAN

Transformasi dengan gen *pinII* melalui penembakan partikel telah menghasilkan satu tunas transforman dan melalui *A. tumefaciens* menghasilkan 13 tanaman yang telah berhasil diaklimatisasi di rumah kaca. Sedangkan transformasi dengan gen CP-SPFMV menghasilkan 6 tanaman. Transformasi ubi jalar melalui *A. tumefaciens* ternyata lebih efektif dalam menghasilkan jumlah transforman yang lebih banyak, sehingga penelitian tahun depan lebih difokuskan pada teknik transformasi ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Chibbar, R.N. and K.K. Kartha. 1994.** Transformation of plant cells by bombardment with microprojectiles. *In* Gresshoff, P.P. (Ed). Biotechnological Application of Plant Culture. CRC Press Inc. 37 p.
- Jefferson, R.A., T.A. Kavanagh, and M.W. Bevan. 1987.** Gus fusions: Glucuronidase as a versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6:3901-3907.
- Klein, T.M., M. Fromm, A. Weissinger, D. Tomes, S. Schaaf, M. Sletten, and J. Sanford. 1988.** Transformation of maize cells using high velocity microprojectile. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:4305-4309.
- Newell, C.A., J.M. Lowe, A. Merryweather, L.M. Rooke, and W.D.O.**

Tabel 3. Hasil uji aktivitas gen *gus* pada transformasi ubi jalar dengan gen CP-SPFMV 3 hari setelah ko-kultivasi dengan eksplan petiol

Plasmid	Perlakuan	Jumlah eksplan	Jumlah eksplan dengan <i>gus</i> positif
pMON10574	+ Asetosiringone	26	5 (20)
	- Asetosiringone	25	6 (24)
pMON10575	+ Asetosiringone	27	9 (33,3)
	- Asetosiringone	25	14 (56)

Asetosiringone 200 μ M, angka dalam kurung menyatakan persentase

Tabel 4. Transformasi ubi jalar dengan gen CP-SPFMV (pMON10574) melalui *A. tumefaciens*

Eksplan	Jumlah eksplan	Kalus terseleksi 1	Kalus terseleksi 2	Tunas	Tanaman
Daun	88	76 (86,4)	30 (34,1)	-	-
Petiol	217	170 (78,3)	112 (51,6)	15 (6,9)	6 (1,8)

Seleksi = kanamisin 50 mg/l; pMON10574 = gen CP-SPFMV; *gus*; dan *npII*; angka dalam kurung menyatakan persentase

- Hamilton. 1995.** Transformation of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] with *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of plants expressing cowpea trypsin inhibitor and snowdrop lectin. *Plant Science* 107:215-227.
- Oliveira, M.M., C.M. Miquel, and M.H. Raquel. 1996.** Transformation studies in woody fruit species. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* (2):76-93.
- Otani, M., T. Shimada, T. Kimura, and A. Saito. 1998.** Transgenic plant production from embryogenic callus of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Biotechnology* 15(1):11-16.
- Prakash, C.S. and U. Varadarajan. 1992.** Genetic transformation of sweet potato by particle bombardment. *Plant Cell Rep.* 11:53-57.
- Ryan, C.A. 1990.** Protease inhibitors in plants: Genes for improving defences against insects and pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* 28:425-449.
- Songstad, D.D., D.A. Somers, and R.J. Grusbach. 1995.** Advances in alternative DNA delivery techniques. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 40:1-15.