

Status Perkembangan Perbaikan Sifat Genetik Padi Menggunakan Transformasi *Agrobacterium*

Syamsidah Rahmawati

Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI, Jl. Raya Bogor KM 46, Cibinong 16911

ABSTRACT

Development Status of Rice Genetic Improvement using *Agrobacterium* Transformation. Syamsidah Rahmawati.

Genetic transformation of rice becomes an important research area in recent years. Rice is staple food for almost half of world population and has been extensively used as a plant model system for monocotyledonous plant. Compare to direct DNA transfer techniques (PEG, electroporation, and DNA bombardment), *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation was considered to be more advantageous because it is easy to handle, integration and segregation pattern are more predictable, and the likelihood to get transgenic plant with low copy number is high, thus decreasing gene silencing phenomena. Various important genes have been introduced into rice genome via *Agrobacterium* transformation. A number of important factors affecting the *Agrobacterium* transformation and the application of this technique in the next future will be discussed.

Key words: Rice, genetic improvement, *Agrobacterium* transformation.

PENDAHULUAN

Padi merupakan komoditi penting karena merupakan makanan pokok hampir setengah penduduk dunia di mana sebagian besar berasal dari negara berkembang termasuk Indonesia. Penyediaan beras bagi penduduk dunia yang tumbuh pesat merupakan tantangan berat. Ketersediaan pangan harus dipenuhi dalam kondisi di mana lahan subur berkurang setiap tahun, ketersediaan air terbatas, dan ada serangan hama penyakit. Untuk mengantisipasi ketersediaan dan menjaga ketahanan pangan secara berkesinambungan perlu dikembangkan varietas tanaman yang mempunyai kemampuan adaptasi yang baik dengan daya hasil tinggi, kualitas biji dan kandungan nutrisi baik, serta tahan terhadap cekaman hama penyakit.

Upaya perbaikan sifat-sifat penting tanaman telah dimulai sejak manusia mengenal cara bercocok tanam dengan melakukan persilangan dan seleksi benih. Penemuan gen, yaitu penentu sifat yang diwariskan pada turunan berikutnya oleh Gregor Mendel pada tahun 1866 dilanjutkan dengan berbagai penemuan berikutnya di mana gen dapat diisolasi, ditransfer, dan

diekspresikan dalam sel lain telah membuka peluang yang besar dalam upaya perbaikan sifat genetik tanaman. Penerapan teknologi transfer gen ini memungkinkan penyisipan hanya gen-gen penting saja, sehingga sifat lain diharapkan tidak berubah.

Pada tanaman padi, secara garis besar ada dua teknik transfer gen yang telah berhasil diterapkan, yaitu transfer gen secara langsung (misalnya dengan senyawa kimia polyethylene glycol (PEG), alat elektroporator, atau penembak DNA), atau secara tidak langsung dengan menggunakan bantuan bakteri tanah *Agrobacterium tumefaciens* (Slamet-Loedin 1994). Masing-masing teknik memiliki kelemahan dan keunggulan. Namun, adanya kecenderungan teknik transfer DNA secara langsung menyisipkan DNA dengan jumlah salinan yang banyak menyebabkan teknik transformasi *Agrobacterium* menjadi alternatif pilihan. Semakin banyak jumlah salinan gen yang disisipkan maka ekspresi gen kurang stabil akibat dari adanya pembungkaman gen dan proses penyusunan kembali (*rearrangement*) semakin tinggi yang mengakibatkan ekspresi gen kurang stabil (Dai *et al.* 2001).

Teknik transformasi *Agrobacterium* memiliki keunggulan, antara lain (1) efisiensi transformasi dengan salinan gen tunggal lebih tinggi dan (2) dapat dilakukan dengan peralatan laboratorium yang sederhana. Gen dengan salinan tunggal lebih mudah dianalisa dan biasanya bersegregasi mengikuti pola pewarisan Mendel. Namun, keberhasilan transformasi *Agrobacterium* masih terbatas pada genotipe tanaman tertentu.

Secara alami *A. tumefaciens* hanya menginfeksi tanaman dari kelompok dikotil (biji berkeping dua), sehingga keberhasilan transformasi *Agrobacterium* pada awalnya hanya terbatas pada kelompok tanaman dikotil. Penelitian secara intensif dan mendasar telah membuahakan pemahaman yang baik mengenai biologi dan mekanisme transfer gen *A. tumefaciens*.

Keberhasilan transformasi gen pada tanaman padi (monokotil) menggunakan *Agrobacterium* pertama kali dilaporkan oleh Hiei *et al.* (1994;1997). Manipulasi berbagai faktor penting menentukan keberhasilan transformasi. Saat ini berbagai kultivar tanaman padi telah berhasil ditransformasi menggunakan *Agrobacterium* (Toki 1997; Yara *et al.* 2001; Saharan *et al.* 2004).

Di Indonesia, penelitian mengenai manipulasi genetik padi telah dimulai sejak tahun 1995. Pada awalnya teknik transfer gen yang digunakan adalah penembakan DNA. Baru pada tahun 1996 mulai dirintis pengembangan sistem transformasi *Agrobacterium* untuk padi jenis *indica* dan *javanica* yang banyak ditanam di Indonesia (Slamet-Loedin *et al.* 1997a), namun hingga saat ini hanya padi kultivar Rojolele yang sudah berhasil ditransformasi. Beberapa gen terutama untuk ketahanan terhadap hama penggerek batang kuning, penyakit yang disebabkan oleh jamur, dan toleran kekeringan telah berhasil disisipkan dan sedang dievaluasi ekspresi dan fungsinya. Transformasi genetika sangat penting dan merupakan alternatif pilihan dalam mengatasi masalah-masalah yang tidak dapat diatasi dengan teknik pemuliaan tanaman.

Di dalam tulisan ini akan dibahas mengenai penerapan teknik transformasi *Agrobacterium* untuk memperbaiki sifat genetik tanaman padi, aspek penting yang mempengaruhi keberhasilan transformasi, gen yang telah berhasil diintroduksi pada tanaman padi, dan prospek pemanfaatan teknik ini di masa yang akan datang.

BIOLOGI DAN MEKANISME TRANSFORMASI *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

A. tumefaciens merupakan bakteri tanah gram positif yang bersifat fitopatogen pada tanaman dikotil. Bakteri ini, secara alami mempunyai kemampuan untuk mentransfer potongan DNA-nya yang kemudian dikenal dengan T-DNA (*transfer* DNA) ke dalam genom tanaman dan menyebabkan terbentuknya tumor (*crown gall*). Tumor ini merupakan mesin penghasil makanan atau sebagai sumber karbon bagi *Agrobacterium*.

Ada tiga komponen genetik penting terlibat dalam proses pembentukan tumor. Pertama, gen virulen kromosom (*chromosomal virulence* disingkat *chv*), yang terdapat pada kromosom *Agrobacterium* dan berfungsi dalam pelekatan bakteri dengan sel tanaman. Kedua, sekelompok gen virulen (*vir*) yang terdapat dalam plasmid Ti yang berukuran besar (200 kb) yang berperan dalam menginduksi transfer dan integrasi T-DNA. Dan komponen ketiga adalah daerah T-DNA yang juga terletak pada plasmid Ti. Daerah T-DNA, dibatasi oleh LB (*left border*) dan RB (*right border*), mengandung gen penting bagi *Agrobacterium*. Di dalam T-DNA terdapat gen *iaaH*, *iaaM*, dan *ipt* yang menyandikan enzim-enzim penting dalam biosintesis auksin dan sitokinin, yaitu zat penting untuk pembelahan sel, sehingga terjadi pembelahan sel yang tidak terkontrol dan menyebabkan terbentuknya tumor. Di

samping itu, T-DNA juga mengandung gen yang berperan dalam sintesis dan sekresi opin yang penting untuk dikonsumsi oleh *Agrobacterium*.

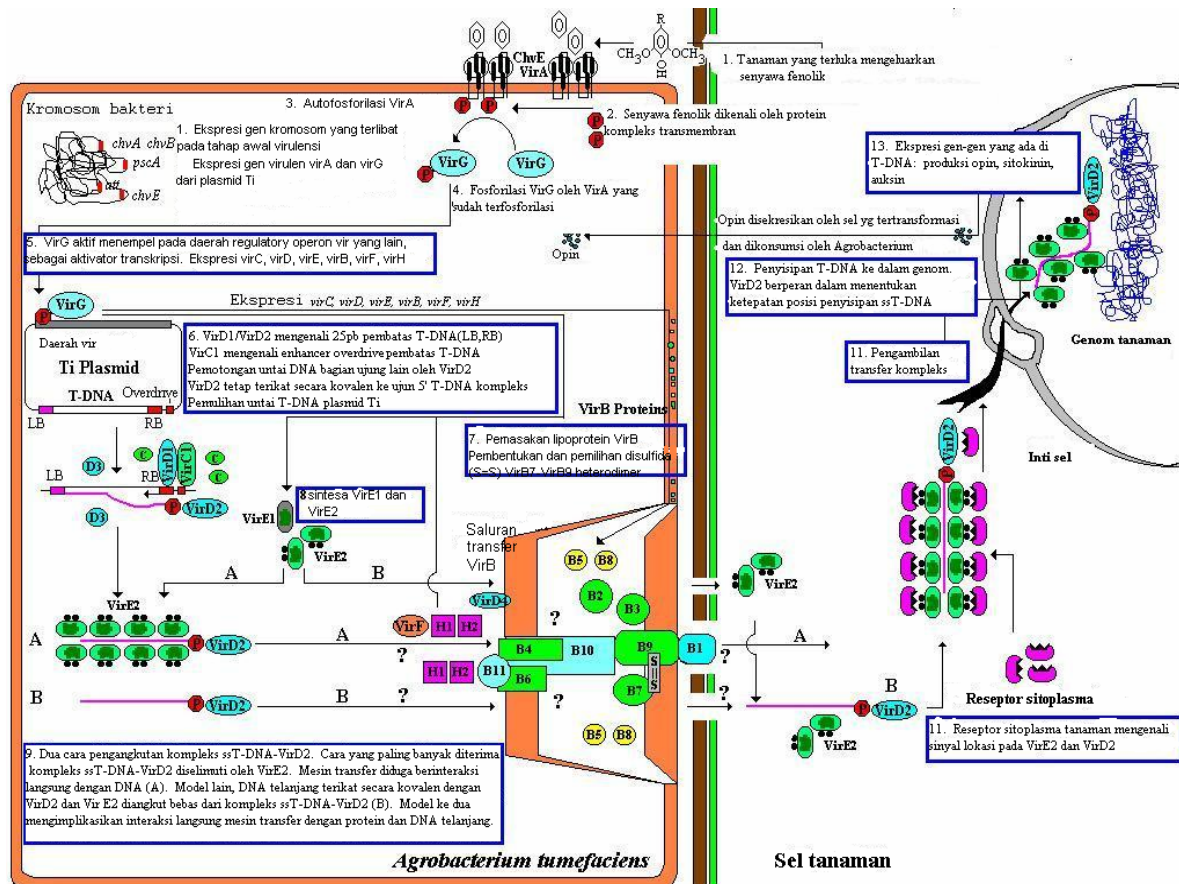
Bakteri masuk ke dalam jaringan tanaman melalui luka. Jaringan tanaman dikotil yang terluka menghasilkan senyawa fenolik (asetosiringon) dan monosakarida (glukosa, galaktosa) yang menginduksi transkripsi sederetan gen *vir* dan berakhir dengan penyisipan gen-gen yang ada pada daerah T-DNA. Mekanisme integrasi T-DNA ke dalam genom tanaman secara mendetail dapat dilihat dalam tulisan Tinland (1996), Sheng dan Citovsky (1996), atau de la Riva *et al.* (1998). Mekanisme transfer gen oleh bakteri *A. tumefaciens* dirangkum pada Gambar 1.

Kemampuan *Agrobacterium* ini kemudian dimanfaatkan untuk menyisipkan gen bermanfaat ke dalam tanaman. Selanjutnya gen-gen yang berperan dalam sintesis hormon dan opin dihilangkan dan diganti dengan gen bermanfaat untuk perbaikan sifat tanaman. Berdasarkan hasil penelitian Hoekema *et al.* (1984) diketahui bahwa T-DNA dapat ditransfer meskipun terletak pada plasmid yang berbeda. Penemuan inilah yang mendasari penggunaan sistem plasmid ganda (*binary vector*). Dibandingkan dengan sistem yang lama (*cointegrate*), sistem vektor biner adalah yang paling banyak digunakan saat ini karena plasmid yang mengandung T-DNA menjadi lebih kecil dan lebih mudah dimanipulasi secara *in vitro*. Dalam sistem ini digunakan dua vektor (Gambar 2), satu mengandung kelompok gen *vir* (plasmid Ti) dan vektor lain mengandung T-DNA dengan gen yang disisipkan (Walkerpeach dan Velten 1994). Selanjutnya, penambahan gen *virG* pada plasmid biner dilaporkan dapat meningkatkan efisiensi transformasi. Plasmid biner yang mendapat tambahan gen *vir* ini disebut sebagai plasmid super biner (*super binary vector*) (Torisky *et al.* 1997).

FAKTOR PENTING YANG MEMPENGARUHI KEBERHASILAN TRANSFORMASI *AGROBACTERIUM*

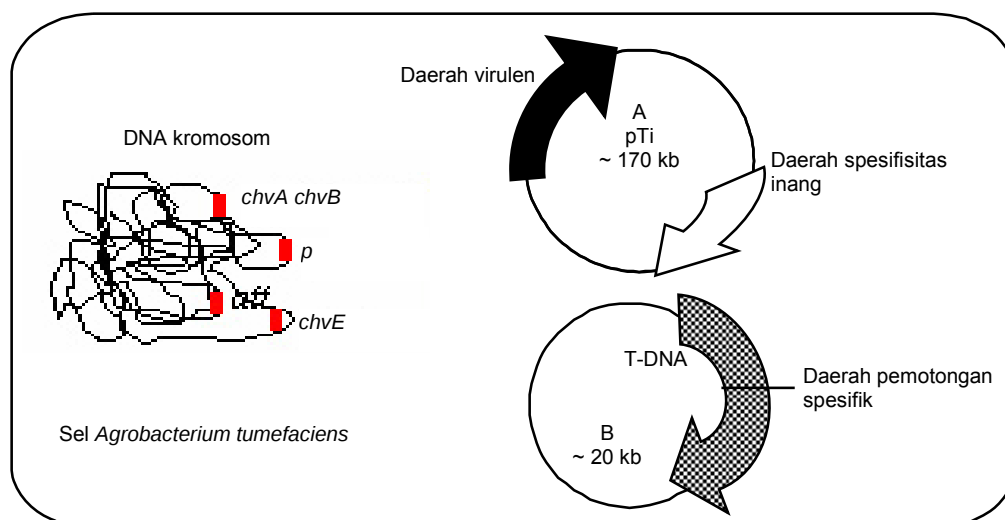
Genotipe dan Jaringan Tanaman/Eksplan

Azhakanandam *et al.* (2000) melaporkan bahwa keberhasilan transformasi *Agrobacterium* sangat bergantung pada genotipe tanaman padi yang digunakan sebagai materi penelitian tidak peduli apakah dari kelompok *japonica*, *indica* atau *javanica*. Beberapa genotipe padi sangat sulit ditransformasi dengan *Agrobacterium*. Hal ini merupakan salah satu keterbatasan penggunaan transformasi *Agrobacterium*. Genotipe yang sangat responsif terhadap kultur jaringan cenderung memberikan respon yang baik terhadap transformasi.



Gambar 1. Mekanisme transfer gen ke dalam tanaman oleh *A. tumefaciens*. Tahapan penting yang terjadi selama proses transfer gen dijelaskan secara ringkas pada kotak 1-13. Beberapa tahapan masih belum diketahui secara pasti (diberi tanda ?) atau baru merupakan hipotesis.

Sumber: de la Riva *et al.* (1998).



Gambar 2. Sistem vektor biner. Plasmid A dan B komplemen satu sama lain apabila keduanya berada pada satu sel *A. tumefaciens*. T-DNA yang terdapat pada plasmid B akan ditransfer ke dalam sel tanaman oleh protein yang disandi plasmid A.

Di samping pemilihan genotipe tanaman, pemilihan jaringan juga menentukan keberhasilan transformasi. Jaringan yang baik digunakan sebagai bahan transformasi adalah jaringan yang memberikan respon yang baik terhadap kultur jaringan. Dari berbagai jaringan (ujung tunas, akar, skutellum, embrio yang belum masak, kalus yang diinduksi dari akar dan skutellum, serta kultur suspensi sel yang diinduksi dari skutellum) yang telah dicoba, kalus dari jaringan skutellum benih masak menghasilkan jumlah transforman paling tinggi (23%) (Hiei *et al.* 1994) sehingga paling banyak digunakan hingga saat ini. Ukuran skutellum dapat mempengaruhi efisiensi transformasi dengan meningkatkan kemampuan pembentukan kalus embriogenik secara nyata (Slamet-Loedin *et al.* 1997b). Pemilihan genotipe yang sistem regenerasinya sudah diketahui dengan baik merupakan tahap awal yang menentukan keberhasilan transformasi.

Strain *Agrobacterium* dan Plasmid/Vektor

Pemilihan strain *Agrobacterium* dan vektor sangat mempengaruhi efisiensi transformasi. Salah satu kelemahan transformasi *Agrobacterium* adalah terbatasnya tanaman inang yang dapat diinfeksi. Penggunaan *A. tumefaciens* yang super virulen seperti, EHA 101, EHA 105, AGL1 dikombinasikan dengan vektor biner atau *A. tumefaciens* strain biasa (LBA 4404) dikombinasikan dengan vektor super biner ditujukan untuk memperluas inang tanaman yang dapat diinfeksi. Azhakanandam *et al.* (2000) melaporkan bahwa *A. tumefaciens* strain LBA4404 yang membawa vektor super-biner (pTOK233 dengan ekstra gen *virB*, C, dan G) sangat efektif mentransformasi padi baik kelompok japonica, indica, dan javanica dibandingkan dengan vektor biner pTOK233 tanpa penambahan ekstra gen *vir*.

Asetosiringon dan pH

Senyawa fenolik asetosiringon merupakan sinyal transkripsi gen *vir* yang berperan dalam mekanisme transfer gen. Penambahan asetosiringon sangat penting untuk transformasi tanaman padi karena tanaman padi tidak menghasilkan asetosiringon. Tanpa penambahan asetosiringon transformasi tidak akan berhasil meskipun menggunakan strain yang super virulen atau vektor super biner (Rashid *et al.* 1996). Konsentrasi optimum dan umum digunakan dalam transformasi *Agrobacterium* adalah 100 M. Namun, untuk transformasi padi rekalsitran (misalnya padi dari kelompok Indica HKR-46 dan -126) penambahan asetosiringon konsentrasi tinggi (400 M) pada media pertumbuhan *Agrobacterium* dan ko-kultivasi perlu dilakukan untuk meningkatkan keberhasilan transformasi (Saharan *et*

al. 2004). Selain itu, kondisi pH juga mempengaruhi ekspresi gen *vir*. Meskipun gen *vir* dapat diekspresikan pada pH 5,0-5,8, kondisi pH 5,2 adalah yang paling baik dan umum digunakan.

Kondisi Infeksi dan Ko-kultur

Berbagai modifikasi dilakukan pada saat pra-infeksi, infeksi, dan ko-kultivasi untuk meningkatkan efisiensi transformasi. Sebelum inokulasi, *Agrobacterium* ditumbuhkan pada media YEP atau media AB yang mengandung asetosiringon. Konsentrasi bakteri yang digunakan bervariasi antara 0,5-2 pada OD₆₀₀ (Azhakanandam *et al.* 2000; Dai *et al.* 2001; Saharan *et al.* 2004). Bakteri yang digunakan untuk menginfeksi sel tanaman sebaiknya bakteri yang sedang tumbuh aktif (fase logaritmik). Bakteri yang sudah ditumbuhkan selama satu malam disubkultur dan ditumbuhkan kembali selama 2-3 jam hingga mencapai kerapatan sel yang diinginkan (OD₆₀₀ = 0,4-0,5). Pada konsentrasi yang lebih tinggi, populasi bakteri lebih padat pada kalus sehingga menyulitkan saat pencucian kalus.

Selain faktor kerapatan sel, perendaman kalus dalam suspensi *Agrobacterium* selama 25 menit ditambah perlakuan vakum selama 5 menit dapat meningkatkan efisiensi transformasi (Mafthuchah *et al.* 2002).

Antibiotik untuk Eliminasi *Agrobacterium*

Setelah ko-kultivasi biasanya *Agrobacterium* di-eradikasi dengan merendam kalus dalam larutan antibiotik. Selanjutnya kalus ditanam pada media seleksi yang selain mengandung agen penyeleksi juga mengandung antibiotik. Bahkan terkadang penggunaan antibiotik dilanjutkan pada media regenerasi (Yara *et al.* 2001) untuk menghindari berkembangnya *Agrobacterium*. Kejadian di mana bakteri tidak terdeteksi selama di media seleksi yang mengandung antibiotik, namun muncul kembali setelah dipindahkan pada media regenerasi yang tidak mengandung antibiotik kadang terjadi.

Masing-masing strain *Agrobacterium* mempunyai sensitivitas yang berbeda-beda terhadap antibiotik (Alsheikh *et al.* 2002), sehingga perlu pengujian awal untuk menentukan jenis dan konsentrasi antibiotik yang sesuai untuk membunuh *Agrobacterium* yang digunakan. Antibiotik yang umum digunakan untuk mengeliminasi *Agrobacterium* adalah carbenicilin dan cefotaxim. Keduanya termasuk kelompok β -laktam yang menghambat pembentukan dinding sel bakteri. Namun, carbenicilin sensitif terhadap enzim β -laktamase yang dihasilkan oleh bakteri sehingga kurang efektif dalam mengeliminasi *Agrobacterium* pasca ko-kultivasi. Sebaliknya, cefotaxime bersifat lebih resisten

terhadap β -lactamase, namun dapat menghambat pertumbuhan kalus, regenerasi tanaman dan mempengaruhi efisiensi transformasi (Ling *et al.* 1998). Tang *et al.* (2000) membandingkan efektifitas dari 4 jenis antibiotik (ampicilin, carbenicilin, cefotaxime, dan timentin) pada berbagai konsentrasi (100–1000 mg/l) terhadap *A. tumefaciens* strain C58C1 ATHV Rif^R (derivatif dari EHA 101). Timentin merupakan kombinasi antibiotik ticarcilin (golongan β -lactam) dengan inhibitor β -laktamase asam klavulanat. Hasil pengujian tersebut menunjukkan bahwa timentin (500 mg/l) paling efektif mengeliminasi *A. tumefaciens* strain C58C1 dan tidak berpengaruh negatif terhadap regenerasi tanaman. Kelebihan timentin lainnya adalah lebih toleran terhadap cahaya. Namun sayang, jenis antibiotik ini sulit ditemukan di Indonesia. Alternatif lain adalah dengan pengeringan sel atau jaringan tanaman secara perlahan pasca infeksi. Cheng *et al.* (2003) melaporkan bahwa pengeringan dapat menekan pertumbuhan *Agrobacterium* dan meningkatkan efisiensi transformasi.

Media Induksi, Ko-kultivasi, dan Regenerasi

Media dasar yang umum digunakan untuk induksi kalus, ko-kultivasi, dan seleksi adalah N6 sedangkan untuk media regenerasi adalah media MS (Hiei *et al.* 1994; Rashid *et al.* 1996; Toki 1997; Yara *et al.* 2001; Cao *et al.* 2004). Penambahan *casamino acids* dan prolin dilaporkan dapat meningkatkan kemampuan regenerasi tanaman dan dapat menghasilkan tanaman transgenik dalam waktu 2 bulan sejak induksi kalus (Toki 1997). Kemampuan regenerasi yang sama (12–31%) juga diperoleh pada tiga subspecies padi japónica, indica, dan javanica menggunakan media dasar LS untuk induksi kalus, ko-kultivasi, dan seleksi (Azhakanandam *et al.* 2000; Slamet-Loedin *et al.* 1997a). Kemampuan regenerasi pasca transformasi pada beberapa kultivar padi sangat menurun akibat adanya kecenderungan nekrosis. Dey *et al.* (2003) melaporkan bahwa penambahan *antinecrotic* (40 mg/l L-cystein, 5 mg/l perak nitrat, dan 15 mg/l *ascorbic acid*) dapat mengurangi necrosis pasca infeksi *Agrobacterium* dan meningkatkan kemampuan regenerasi tanaman. Penambahan bahan pematat phytigel 0,2% pada media induksi kalus dan 0,5% pada media regenerasi meningkatkan jumlah kalus embriogenik dan kemampuan regenerasi berbagai kultivar tanaman padi baik dari kelompok javanica, japonica, dan indica (Slamet-Loedin *et al.* 1997b). Penggunaan phytigel lebih ekonomis dibandingkan dengan agarose tipe I (Sigma) yang umum digunakan pada kultur jaringan tanaman padi karena selain harganya jauh lebih murah pemakaiannya juga lebih sedikit.

Bahan Penyeleksi

Higromisin (*hpt*) dan fosfinotrisin (*bar*) merupakan dua agen penyeleksi yang digunakan secara luas pada tanaman padi (Hiei *et al.* 1994; Rashid *et al.* 1996; Toki 1997; Yara *et al.* 2001; Vain *et al.* 2003; Saharan *et al.* 2004; Jin *et al.* 2004). Konsentrasi yang umum digunakan adalah 50 mg/l higromisin atau 5 mg/l fosfinotrisin. Namun pada konsentrasi ini terkadang masih memungkinkan adanya tanaman yang *escape*, yaitu tanaman tahan higromisin atau fosfinotrisin tapi tidak mengandung gen target. Berdasarkan pengalaman di laboratorium, peningkatan konsentrasi agen penyeleksi secara bertahap dapat menekan munculnya tanaman *escape*. Kanamisin (*nptII*) atau G418 juga dapat digunakan sebagai agen penyeleksi pada padi, namun penggunaannya sangat terbatas karena dilaporkan dapat menghambat pertumbuhan sel (Azhakanandam *et al.* 2000).

Ekspresi dan Stabilitas Gen

Gen yang disisipkan ke dalam genom tanaman harus dapat diekspresikan sehingga menghasilkan protein yang diinginkan serta harus stabil diwariskan ke generasi berikutnya. Gen-gen yang diekspresikan pada tanaman, pada awalnya, adalah gen-gen asli dari sumbernya (bakteri, jamur, hewan, tanaman), namun kebanyakan ekspresi dari gen tersebut di dalam tanaman sangat rendah. Hal ini antara lain disebabkan oleh penggunaan kodon yang tidak sesuai. Oleh karena itu, modifikasi, penggunaan kodon yang sesuai dengan tanaman target telah umum dilakukan untuk meningkatkan ekspresi gen di dalam tanaman. Selain itu, penambahan *enhancer* dikombinasikan dengan penggunaan promotor kuat atau promotor spesifik dapat meningkatkan ekspresi gen pada tanaman.

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa apabila gen telah terintegrasi pada genom tanaman, maka gen tersebut akan stabil diwariskan ke generasi berikutnya. Hiei dan Komari (1996) melaporkan bahwa transgen stabil diwariskan hingga generasi ke-4. Hal yang sama juga dilaporkan oleh Wu *et al.* (2002) di mana transgen stabil diwariskan hingga generasi ke-6. Namun, Rashid *et al.* (1996) melaporkan tentang adanya kemungkinan terjadinya pembungkaman gen. Pembungkaman gen adalah salah satu fenomena yang menyebabkan terjadinya kegagalan dalam mengekspresikan gen. Hingga saat ini, mekanisme yang menyebabkan terjadinya ketidakstabilan integrasi dan ekspresi gen masih belum jelas dimengerti. Cao *et al.* (2004) menyarankan penggunaan promotor yang berbeda untuk masing-masing kaset ekspresi, untuk menghindari terjadinya pembungkaman gen pada tahap transkripsi (*transcriptional silencing*).

GEN YANG TELAH BERHASIL DIINTRODUKSI KE DALAM GENOM TANAMAN PADI MENGGUNAKAN TRANSFORMASI *AGROBACTERIUM*

Saat ini berbagai gen bermanfaat telah berhasil disisipkan ke dalam berbagai kultivar tanaman padi baik sebagai gen tunggal maupun gen ganda dengan menggunakan transformasi *Agrobacterium*. Pada awalnya introduksi hanya terbatas pada gen-gen penyandi sifat ketahanan terhadap hama atau penyakit, yang dianggap sangat menguntungkan pengusaha tani. Namun beberapa tahun terakhir ini telah dikembangkan tanaman padi yang memiliki sifat yang menguntungkan bagi konsumen. *Golden rice*, yaitu beras yang berwarna kuning keemasan karena mengekspresikan pro-vitamin A β -karoten (Ye *et al.* 2000) dan beras kaya akan kandungan zat besi (Goto *et al.* 1999) adalah dua contoh populer upaya perbaikan nutrisi padi.

Saat ini, pencarian gen-gen yang berperan dalam menentukan sifat tahan kekeringan (kekurangan air), dan introduksi gen tersebut ke dalam genom padi, serta evaluasi ketahanan tanaman transgenik, sedang giat dilakukan. Hal ini dilakukan untuk mengantisipasi keadaan di mana ketersediaan lahan subur yang semakin berkurang. Selain itu, juga ada upaya pemanfaatan sel tanaman padi untuk produksi bahan obat,

meskipun mendapat banyak tantangan dari berbagai kalangan. Berbagai gen yang telah berhasil diintroduksi ke dalam genom tanaman padi disajikan pada Tabel 1.

PROSPEK

Tanaman padi transgenik yang mengandung berbagai gen penting seperti gen tahan penggerek batang, penyakit blas, hawar daun, kekeringan, salinitas, dan herbisida. Di samping itu juga dihasilkan tanaman padi dengan daya hasil tinggi, dan kandungan zat besi dan vitamin A tinggi menggunakan transformasi *Agrobacterium*. Saat ini, transformasi *Agrobacterium* sudah dimanfaatkan lebih luas pada berbagai kultivar tanaman padi kelompok japonica, indica maupun javanica.

Meskipun demikian tidak semua genotipe padi berhasil ditransformasi menggunakan teknik transformasi *Agrobacterium* yang dikembangkan saat ini. Beberapa kultivar padi komersial, seperti IR64 dan IR72 sangat rekalsitrasi terhadap transformasi *Agrobacterium*. Ditambah lagi tidak semua kultivar dapat disilangkan satu sama lain. Namun, dengan adanya upaya pengembangan vektor super biner baru (Toki 1997; Cao *et al.* 2004) yang lebih efektif ataupun pengembangan sistem vektor biner rangkap (Vain *et al.* 2003) dikombinasikan dengan penggunaan strain *Agrobac-*

Tabel 1. Beberapa gen yang telah diintroduksi ke dalam tanaman menggunakan transformasi *Agrobacterium*.

Gen	Asal	Promoter	Sifat sasaran	Varitas padi	Pustaka
<i>cryIAb, cryIAc</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Ubi, CaMV 35S, Brassica Bp10	Tahan PBK dan PBP	Nipponbare (Japonica)	Cheng <i>et al.</i> (1998)
ferritin	Kedelai	GluB-1	Padi mengandung zat besi dan zink	Indica (IR68144)	Goto <i>et al.</i> (1999); Vasconcelos <i>et al.</i> (2003)
<i>psy, lyc, crt1</i>	Bunga daffodil Bakteri <i>Erwinia uredovora</i>	Gt1, 35S CaMV 35S CaMV	Padi mengandung pro-vitamin A	Japonica (TP 309)	Ye <i>et al.</i> (2000)
rhLF (lactoferrin)	Manusia	Ubiquitin jagung	Padi mengandung lactoferin	Javanica (Rojolele)	Rachmawati <i>et al.</i> (2004)
<i>ech42, nag70, glue48</i>	<i>Trichoderma atroviride</i>	Act1	Tahan <i>Rhizoctonia solani</i> dan <i>Magnaporthe grisea</i>	Ishikari-shiroge (Japonica)	Mei <i>et al.</i> (2004)
<i>cryIB-cryIAa</i> hybrid	Bt	Ubiquitin jagung	Tahan PBK	Javanica (Rojolele)	Rahmawati dan Slamet-Loedin (2004)
VHb dan EPSPS	Bakteri <i>Vitreoscilla</i> dan <i>Salmonella typhimurium</i>	Pistil spesifik dari kentang dan CaMV35S	Hasil tinggi dan tahan herbisida	Japonica (Xiushui-11, Qiufeng, Youfeng, dan Hanfeng)	Cao <i>et al.</i> (2004)
chitinase	Padi	CaMV	Tahan jamur penyebab blas <i>Magnaporthe grisea</i> dan <i>Rhizoctonia solani</i>	Indica (vaidehi, tulsi)	Nishizawa <i>et al.</i> (1999)
Hva1	Barley	Promoter terinduksi ABA, Promoter konstitutive actin1 padi	Osmoprotektan	Indica (Basmati)	Rohila <i>et al.</i> (2002)
<i>otsA-otsB,</i>	Bakteri <i>E. coli</i>	Promoter terinduksi ABA dan stres, <i>rbcS</i>	Tahan salinitas dan kekeringan	Indica (PB-1)	Garg <i>et al.</i> (2002)

terium yang sesuai, maka penggunaan transformasi *Agrobacterium* akan lebih luas lagi di masa mendatang.

Keberhasilan penggunaan sistem vektor biner rangkap akan sangat bermanfaat dalam upaya introduksi multi gen di mana ukuran DNA yang disisipkan dapat lebih banyak dan besar. Seperti sudah diketahui bahwa beberapa sifat, seperti tahan kekeringan dan daya hasil tinggi, ditentukan oleh banyak gen. Kebanyakan dari gen-gen yang berperan dalam menentukan sifat toleran kekeringan dan daya hasil tinggi belum berhasil diidentifikasi hingga saat ini. Penemuan gen-gen penentu sifat-sifat penting tersebut disertai dengan penguasaan teknik transformasi yang tepat diharapkan dapat memenuhi kebutuhan pangan yang akan terus meningkat.

Salah satu pendekatan yang lazim digunakan saat ini untuk menemukan, mengisolasi, dan identifikasi gen-gen yang menentukan sifat penting pada tanaman adalah dengan membuat tanaman mutan. Tanaman mutan dihasilkan dengan menginsersikan elemen transposon (di antaranya *Ac/Ds*) menggunakan transformasi *Agrobacterium*. Dalam proses menghasilkan tanaman mutan tersebut, penerapan teknik transformasi *Agrobacterium* lebih menguntungkan karena dapat menghasilkan tanaman yang mengandung salinan gen tunggal dengan efisiensi tinggi. Analisis tanaman dengan jumlah salinan gen tunggal lebih mudah dilakukan, sehingga tanaman mengandung gen target dengan salinan tunggal sangat diperlukan dalam studi biologi molekuler dan dalam mempelajari fungsi gen (*functional genomic*).

KESIMPULAN

Saat ini transformasi *Agrobacterium* telah berhasil dilakukan pada berbagai kultivar padi japonica, indica dan javanica. Pemilihan genotipe, jaringan tanaman, umur eksplan, strain *Agrobacterium*, vektor, konsentrasi asetosiringon dan pH, kerapatan sel bakteri, lama dan suhu kokultivasi, antibiotik, bahan penyeleksi, komposisi media kultur, sangat penting dalam menentukan keberhasilan transformasi. Pada beberapa tanaman yang sangat rekalsitran penggunaan konsentrasi asetosiringon dan bahan pematat yang tinggi, pengeringan kalus secara perlahan atau penambahan antinekrotik pasca ko-kultivasi dapat meningkatkan efisiensi transformasi secara nyata. Selain itu, pemilihan promoter, penggunaan kodon yang sesuai, penambahan enhancer dapat meningkatkan ekspresi gen di dalam tanaman. Saat ini berbagai gen, tunggal maupun poligenik, telah berhasil diintroduksi ke dalam tanaman padi dalam upaya perbaikan mutu

genetik padi dan dilaporkan stabil diturunkan ke generasi berikutnya. Kemampuan transformasi *Agrobacterium* menghasilkan tanaman transgenik dengan salinan gen tunggal akan banyak dimanfaatkan untuk mempelajari fungsi berbagai gen penting tanaman padi pada masa mendatang.

DAFTAR PUSTAKA

- Alsheikh, M.K., H.P. Suso, M. Robson, N.H. Battey, and A. Watten. 2002. Appropriate choice of antibiotic and *Agrobacterium* strain improves transformation of antibiotic-sensitive *Fragaria vesca* and *F.V. semperflorens*. *Plant Cell Rep.* 20:1173-1180.
- Azhakanandam, K., M.S. McCabe, J.B. Power, K.C. Lowe, E.C. Cocking, and M.R. Davey. 2000. T-DNA transfer, integration, expression and inheritance in rice: Effects of plant genotype and *Agrobacterium* super-virulence. *J. Plant Physiol.* 157:429-439.
- Bizily, S.P., C.L. Rugh, R.B. Maegher. 2000. Phytodetoxification of hazardous organomercurials by genetically engineered plants. *Nat. Biotechnol.* 18:213-217.
- Cao, M.X., J.Q. Huang, Z.M. Wei, Q.H. Yao, C.Z. Wan, and J.A. Lu. 2004. Engineering higher yield and herbicide resistance in rice by *Agrobacterium*-mediated multiple gene transformation. *Crop Sci.* 44:2206-2213.
- Cheng, X., R. Sardana, H. Kaplan, and I. Altosaar. 1998. *Agrobacterium*-transformed rice plants expressing synthetic *cryIAb* and *cryIAC* genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. *Appl. Biol. Sci.* 95(6):2767-2772.
- Cheng, M., T. Hu, L. Jeanne, L. Chong-Nong, and E.F. Joyce. 2003. Desiccation of plant tissues post-*Agrobacterium* infection enhances T-DNA delivery and increases stable transformation efficiency in wheat. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 39(6):595-604.
- Cohen, M.B. 2000. Bt rice: Practical steps to sustainable use. *International Rice Research Notes* 25(2):4-10.
- Dai, S., P. Zheng, P. Marmey, S. Zhang, W. Tian, S. Chen, R.N. Beachy, and C. Fauquet. 2001. Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. *Mol. Breed.* 7:25-33.
- de la Riva, A.G., J. Gonzalez-Cabrera, R. Vazquez-Padron, and C. Arya-Pardo. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*: A natural tool for plant transformation. *Electronic Journal of Biotechnology* 1(3) issue of Dec 15.
- Dey, M., H. Jiang, and R. Wu. 2003. Antinecrotic substances improved regeneration frequency of transgenic rice. *Rice Genetics Newsletter* 19:82-84.
- Garg, A.K., J-K Kim, T.G. Owens, A.P. Ranwala, Y.D. Choi, L.V. Kochian, and R.J. Wu. 2002. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(25):15898-15903.

- Goto, F., T. Yoshihara, N. Shigemoto, S. Toki, F. Takaiwa. 1999.** Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. *Nat. Biotechnol.* 17:282-286.
- Hiei, Y. and T. Komari. 1996.** Stable inheritance of transgenes in rice plants transformed by *Agrobacterium tumefaciens*. *Proceedings of the Third Rice Genetic Symposium, Manila Philippines* 16-20 Oct. p. 131-142.
- Hiei, Y., S. Ohta, T. Komari, and T. Kumashiro. 1994.** Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of T-DNA. *Plant J.* 6:1-11.
- Hiei, Y., T. Komari, and T. Kubo. 1997.** Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol.* 35:205-218.
- Hoekema, A., P.W. Roelvink, P.J.J. Hooykaas, and R.A. Schilperoort. 1984.** Delivery of T-DNA from the *Agrobacterium tumefaciens* chromosome into plant cells. *EMBO J.* 3(11):2485-2490.
- Jin, W-Z., W. Shao-min, X. Min, D. Rui-jun, W. Ping. 2004.** Characterization of enhancer trap and gene trap harboring *Ac/Ds* transposon in transgenic rice. *Journal of Zhejiang University Science* 5(4):390-399.
- Ling, H.Q., D. Kriseleit, and M.W. Ganai. 1998.** Effect of ticarcilin/potassium clavulanate on callus growth and shoot regeneration in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Cell Rep.* 17:843-847.
- Maftuchah, I.H. Slamet-Loedin, dan H. Aswidinnor. 2002.** Pengujian berbagai metode transformasi pada padi Cisadane melalui *Agrobacterium tumefaciens*. *Kongres III Konsorsium Bioteknologi Indonesia dan Seminar Bioteknologi*.
- Mei, L., S. Zong-Siu, Z. Jie, X. Tong, H. Garye, and L. Matteo. 2004.** Enhancing rice resistance to fungal pathogens by transformation with cell wall degrading enzyme genes from *Trichoderma atroviride*. *Journal of Zhejiang University Science* 5(2):133-136.
- Nishizawa, Y., Z. Nishio, K. Nakazono, M. Soma, E. Nakajima, M. Ugaki, and T. Hibi. 1999.** Enhanced resistance to blast (*Magnaporthe grisea*) in transgenic rice by constitutive expression of rice chitinase. *Theor. Appl. Genet.* 99:383-390.
- Rachmawati, D., T. Mori, T. Hosaka, F. Takaiwa, E. Inoue, and H. Anzai. 2004.** Production and characterization of recombinant human lactoferrin in transgenic Javanica rice cv Rojolele. 4th International Crop Science Congress.
- Rahmawati, S. dan I.H. Slamet-Loedin. 2004.** Konstruksi vektor biner mengandung gen hybrid *cryIB-cryIAa* untuk transformasi *Agrobacterium* tanaman padi. *Biota* 9:67-73.
- Rashid, H., S. Yokoi, K. Toriyama, and K. Hinata. 1996.** Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in *Indica* rice. *Plant Cell Re.* 15:727-730.
- Rohila, J.S., R.K. Jain, and R. Wu. 2002.** *Agrobacterium*-mediated transformation of Basmati rice to express the barley HVA1 gene for enhance tolerance to abiotik stress. *Rice Genetic Newsletters* 18.
- Saharan, V., R.C. Yadav, N.R. Yadav, and K. Ram. 2004.** Studies on improved *Agrobacterium*-mediated transformation in two indica rice (*Oryza sativa* L.). *African Journal of Biotechnology* 3(11):572-575.
- Sheng, J. and V. Citovski. 1996.** *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: Have virulence proteins, will travel. *The Plant Cell* 8:1699-1710.
- Slamet-Loedin, I.H. 1994.** Transformasi genetik pada tanaman: Beberapa teknik dan aspek penting. *Hayati* 1(2):66-67.
- Slamet-Loedin, I.H., W. Rahayu, S. Hutajulu, dan J. Wibowo. 1997a.** Penggunaan dua strain *Agrobacterium tumefaciens* supervirulen untuk ko-kultivasi tanaman padi kultivar Cisadane dan Rojolele. *Prosiding Seminar Perhimpunan Bioteknologi Indonesia*. Surabaya, 12-14 Maret 1997. hlm. 140-148.
- Slamet-Loedin, I.H., M. Firdausi, A.S. Rahayu, dan P.D. Tjondronegoro. 1997b.** Pengaruh pemotongan skutelum dan jenis bahan pematat terhadap pembentukan kalus embriogenik dan regenerasi tanaman dari beberapa kultivar tanaman padi. *Prosiding Seminar Perhimpunan Bioteknologi Indonesia*. Surabaya, 12-14 Maret 1997. hlm. 203-210.
- Tang, H., Z. Ren, and G. Krezal. 2000.** An evaluation of antibiotics for the elimination of *Agrobacterium tumefaciens* from walnut somatic embryos and for the effects on the proliferation of somatic embryos and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Rep.* 19:881-887.
- Tinland, B. 1996.** The integration of T-DNA into plant genomes. *Trends Plant Sci.* 1(6):178-184.
- Toki, S. 1997.** Rapid and efficient *Agrobacterium*-mediated transformation in rice. *Plant Mol. Biol. Rep.* 15(1):16-21.
- Torisky, R.S., L. Kovacs, S. Avdiushko, J.D. Newman, A.G. Hunt, and G.B. Collins. 1997.** Development of a binary vector system for plant transformation based on supervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain Chry5. *Plant Cell Rep.* 17:102-108.
- Vain, P., A.S. Afolah, B. Worland, and J.W. Snape. 2003.** Transgene behaviour in populations of rice plants transformed using a new dual binary vector system: pGreen/pSoup. *Theor. Appl. Genet.* 107:210-217.
- Vasconcelos, M., K. Datta, N. Oliva, M. Khalekuzzaman, L. Torizzo, S. Krishnan, M. Oleivera, F. Goto, and S.K. Datta. 2003.** Increased iron and zink accumulation in transgenic rice with the ferritin gene. *Plant Sci.* 164:371-378.
- Walkerpeach, C.R. and J. Velten. 1994.** *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plant cells: Cointegratee and binary vector system. *Plant Mol. Biol. Man.* B1:1-19.
- Wu, G., H. Cui, G. Ye, Y. Xia, R. Sardana, X. Cheng, Y. Li, I. Altosaar, and Q. Shu. 2002.** Inheritance and expres-

sion of the *cryIAb* gene in Bt (*Bacillus thuringiensis*) transgenic rice. Theor. Appl. Genet. 104:727-734.

Yara, A., M. Otani, K. Kusumi, O. Matsuda, T. Shimada, and K. Iba. 2001. Production of transgenic Japonica rice (*Oryza sativa*) cultivar, Taichung 65, by the *Agrobacterium*-mediated method. Plant Biotechnol. 18(4):305-310.

Ye, X., S. A-Babili, A. Kloti, J. Zhang, P. Lucca, P. Beyer, and I. Potrykus. 2000. Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. Science 287:303-305.
