

Penggunaan Dua Strain *Agrobacterium tumefaciens* Super Virulen untuk Ko-Kultivasi Tanaman Padi Kultivar Cisadane dan Rojolele

Inez H. Slamet-Loedin, Wuryan Rahayu,
Sondang Hutajulu, dan J. Lono Wibowo

Pusat Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi-LIPI, Cibinong

ABSTRAK

Plasmid pIG 121 Hm yang mengandung gen ketahanan terhadap antibiotik higromisin (*hpt*) dan gen penyandi enzim β -glucuronidase (*GUS*) ditranformasikan kedua macam strain super virulen dari *Agrobacterium tumefaciens*, yaitu Agl-1 dan EHA 101. Kedua strain digunakan untuk menginfeksi empat kultivar tanaman, yaitu Cisadane dan IR64 (*indica*), Rojolele (*javanica*) dan Koshihikari (*japonica*). Infeksi dilakukan pada kalus embriogenik padi yang berasal dari skutelum benih masak berumur tiga minggu dengan menggunakan induser acetosyringone. Uji *GUS* dilakukan tiga hari setelah ko-kultivasi dan empat minggu kemudian. Kalus ditanam pada media mengandung 50 mg/l antibiotik higromisin-B. Tanaman diperoleh dari kalus yang resisten terhadap higromisin-B dari kultivar Cisadane dan Rojolele yang diinfeksi dengan EHA 101 (pIG 121Hm). Tanaman dianalisis dengan teknik PCR untuk mengkonfirmasi keberadaan gen *GUS* dan *hpt*.

Kata kunci: *Agrobacterium tumefaciens*, higromisin, PCR.

ABSTRACT

Plasmid pIG 121 Hm containing resistance gene to antibiotic hygromycin, marker gene *GUS-A*, was transformed into two super virulent *Agrobacterium* strains i.e. Agl-1 and EHA 101. Three week-old scutellum derived calli of 4 rice cultivars (Cisadane, IR64, Rojolele, and Koshihikari) was infected by Agl-1 (pIG 121 Hm) and EHA 101 (pIG 121 Hm) in the presence of acetosyringone. *GUS* assay was carried out 3 days and 4 weeks after co-cultivation showed positive results. Calli were selected on 50 ng/L antibiotic hygromycin B. Plants were obtained from calli resistant to hygromycin B of cv. Cisadane and Rojolele infected by EHA 101 (pIG 121 Hm). PCR analysis confirmed the presence of *GUS-A* and *hpt*.

Key words: *Agrobacterium tumefaciens*, hygromycin, PCR.

PENDAHULUAN

Teknik introduksi gen yang pada awalnya berhasil digunakan pada padi ialah teknik elektroporasi protoplas dan PEG (Zhang dan Wu, 1988) terutama untuk padi jenis *japonica* yang kurang rekalsitran dibandingkan dengan jenis *indica*, tetapi teknik ini sulit untuk diterapkan pada jenis *indica* terutama varietas-varietas pemuliaan elite. Datta *et al.* (1992) berhasil memperoleh tanaman transgenik dari padi *indica* IR72,

namun ternyata kurang fertil. Kemudian dilaporkan keberhasilan elektroporasi jaringan (Xu dan Li, 1994) tetapi reproduksibilitasnya masih belum diketahui. Teknik yang banyak digunakan untuk jenis *indica* ialah teknik penembakan DNA (Li *et al.*, 1993; Colley *et al.*, 1995) dan belum lama ini teknik *A. tumefaciens* dilaporkan menghasilkan tanaman padi transgenik (Rashid *et al.*, 1996), setelah pada tahun 1994 dilaporkan berhasil digunakan untuk dua varietas *japonica* oleh Hiei *et al.* (1994).

A. tumefaciens telah secara rutin digunakan untuk transformasi tanaman dikotil, tetapi masih sangat sulit untuk digunakan pada tanaman jenis monokotil. Seluruh laporan keberhasilan penggunaan *A. tumefaciens* pada padi hingga saat ini menggunakan dua strain yang sama (Hiei *et al.*, 1994; Dong *et al.*, 1996; Rashid *et al.*, 1996; Slamet *et al.*, 1996), yaitu kombinasi antara strain biasa LBA 4404 dengan vektor super binari pTOK 233 (Hiei *et al.*, 1994) atau strain super virulen EHA 101 dengan vektor binari pIG 121 Hm (Ohta, 1990).

Penelitian tentang transformasi tanaman padi di Indonesia masih sangat terbatas dan *Agrobacterium* baru dilaporkan berhasil digunakan untuk transformasi satu varietas *indica* yaitu Basmati (Rashid *et al.*, 1996). Pada penelitian ini vektor binari pIG 121 Hm dikombinasi dengan dua strain super virulen EHA 101 dan Agl-1 kemudian digunakan untuk mengko-kultivasi padi Indonesia jenis *indica* dan *javanica* dengan kontrol satu varietas *japonica*.

BAHAN DAN METODE

Bahan Tanaman

Kalus berumur tiga minggu dari empat varietas padi kultivar Rojolele (*javanica*) yang telah lama ditanam di daerah rawa Karang Agung, Koshihikari (*japonica*), IR64 dan Cisadane (*indica*) digunakan sebagai bahan tanaman yang diinfeksi oleh *A. tumefaciens*. Benih IR64, Cisadane, dan Rojolele diperoleh atas kebaikan Dr. Suwarno (Balitbio-Puslitbangtan), benih Koshihikari diperoleh dari Dr. R. Jefferson (Cambia). Kalus diinisiasi dari skutelum benih padi pada media Linsmaer dan Skoog (Linsmaer dan Skoog, 1965) yang mengandung 2,5 mg/l 2,4-D.

Vektor dan Galur Bakteri

Binari vektor yang digunakan adalah pIG 121 Hm yang berisikan gen higromisin dan gen *GUS-A* dengan tambahan intron pada *sequence* tersandi dikontrol oleh promoter 35 S (Ohta *et al.*, 1990). Vektor diperoleh dari Dr. K. Nakamura (Universitas Nagoya). Strain bakteri yang digunakan ialah *A. tumefaciens* strain super virulen EHA 101 dan Agl-1 diperoleh dari Dr. R. Jefferson.

Introduksi Vektor ke dalam *A. tumefaciens*

Binari vektor pIG 121 Hm ditransformasikan ke dalam kedua strain *A. tumefaciens* dengan menggunakan elektroporesis. Keduanya ditanam pada media seleksi yang sesuai, yaitu AB medium (Chilton *et al.*, 1974) dengan 50 mg/l kanamisin dan karbenisilin untuk Agl-1 (pIG 121 Hm) dan AB medium dengan 50 mg/l kanamisin untuk EHA 101 (pIG 121 Hm).

Ko-Kultivasi

Bakteri ditumbuhkan tiga hari kemudian disuspensikan di media AAM (Hiei, 1994) dengan 100 μ m asetosiringon. Kerapatan bakteri diukur dengan spektrofotometer λ 600 nm sampai kerapatan 0,1-0,5. Infeksi dilakukan dengan merendam kalus masing-masing berukuran 2-3 mm ke dalam suspensi bakteri selama 30 menit, kemudian kalus diko-kultivasi dengan bakteri pada media Linsmaer dan Skoog dengan tambahan 2,5 mg/l dan 100 μ m acetosyringone selama tiga hari (Gambar 1a). Kalus sebagian dipindahkan pada media seleksi yang mengandung higromisin 50 mg/l sebagian digunakan untuk uji *GUS*.

Uji *GUS*

Uji *GUS* dilakukan dengan merendam kalus di buffer fosfat pH 7,0 dan triton 1% selama satu jam pada 37°C. Kalus dicuci dua kali dengan bufer fosfat dan direndam di larutan X-gluc satu malam pada 37°C. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop stereo (Rueb *et al.*, 1989).

Regenerasi Tanaman

Kalus yang tumbuh pada media seleksi yang mengandung higromisin diregenerasikan pada media yang mengandung 0,3 mg/l BAP dan 0,5 mg/l IAA. Planlet yang diperoleh ditransfer ke media MS.

Analisis PCR

DNA diisolasi dari planlet tanaman transgenik dan diuji dengan teknik PCR menggunakan primer *GUS*-A 5'-GCCATTTGAAGCCGATGTCACGCC-3' dan 5'-GTATC GGTGTGAG CGTCGCAGAAC-3' (+350 and 1400), primer *hpt* 5'-GATGCCTCCGCTCG AAGTAGCG-3' dan 5'-GCATCTCCCGCCTGCAC-3' dan primer *vir-g*: 5'-AGGTAGATCT GAGGAGTCCCTTATGAAACACGTTCTTCTTATCG-3' and 5'-ATCCAGATCTCAGGCTGCC ATCGTCCCCCGT-3'.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Salah satu kelebihan *Agrobacterium* Agl-1 ialah adanya gen ketahanan terhadap ampicilin/karbenisilin pada bakteri ini, sehingga mengeliminasi kemungkinan kontaminasi bakteri lain dan memudahkan seleksi transformasi binari vektor pIG 121 Hm ke dalamnya. Kedua strain EHA 101 maupun Agl-1 merupakan strain super virulen yang cakupan infeksiya sangat luas. Kedua strain ini diuji untuk melihat tingkat efektivitasnya dalam menginfeksi tanaman padi. Vektor binari pIG 121 Hm yang digunakan mengandung gen *hpt* dan gen *GUS-A*. Pada gen *GUS-A* disisipkan intron di *sequence* bersandi sehingga ekspresi gen hanya mungkin terjadi bila sudah terintegrasi pada tanaman. Bila masih pada bakteri intron tidak terpotong, sehingga ekspresi tidak terjadi. Hasil dari ko-kultivasi pada Tabel 1 menunjukkan bahwa secara umum persentase kalus yang menghasilkan reaksi biru lebih tinggi pada EHA 101 (pIG 121 Hm), tetapi hasil ini hanya merupakan indikasi karena sampel yang diuji dipilih secara random dan uji ini bersifat destruktif. Pada Gambar 1b tampak gen *GUS-A* yang menghasilkan warna biru bila direaksikan dengan substrat X-gluc (Jefferson *et al.*, 1987).

Tabel 1. Pengaruh strain bakteri Agl-1 dan EHA 101 dengan plasmid pIG 121 Hm terhadap keberhasilan infeksi kalus empat varietas padi.

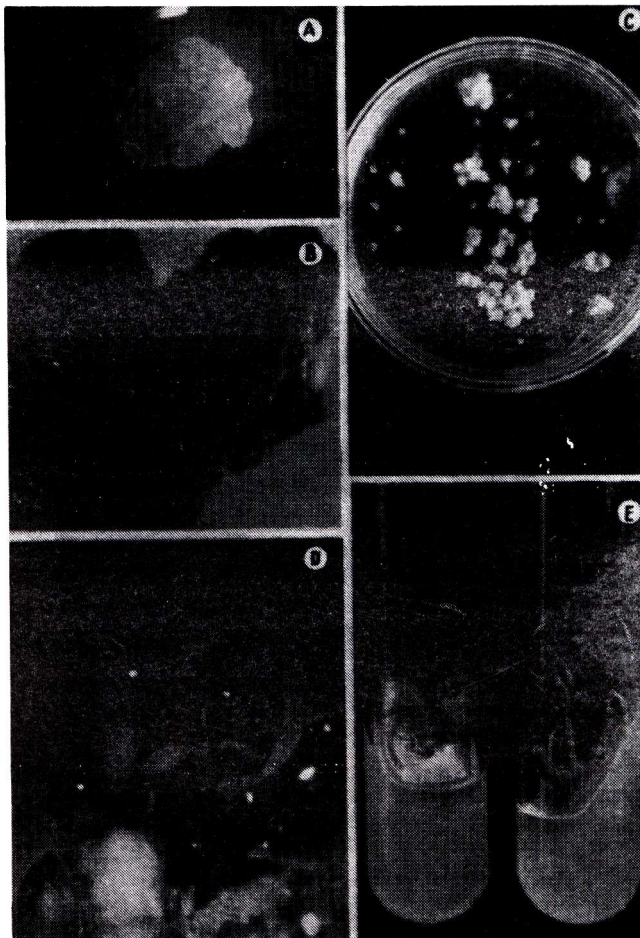
Perlakuan		GUS (%)
Varietas	Bakteri	Tiga hari setelah infeksi
IR64	Agl-1 (pIG 121 Hm)	20
	EHA 101 (pIG 121 Hm)	80
	Kontrol tidak diinfeksi	0
Cisadane	Agl-1 (pIG 121 Hm)	0
	EHA 101 (pIG 121 Hm)	0
	Kontrol tidak diinfeksi	0
Rojolele	Agl-1 (pIG 121 Hm)	20
	EHA 101 (pIG 121 Hm)	13,33
	Kontrol tidak diinfeksi	0
Koshihikari	Agl-1 (pIG 121 Hm)	0
	EHA 101 (pIG 121 Hm)	13,33
	Kontrol tidak diinfeksi	0

Tabel 2 menunjukkan bahwa sampai tiga bulan setelah infeksi hampir seluruh kalus varietas IR64 resisten terhadap 50 mg/l higromisin, termasuk dari kalus kontrol. Ternyata pada tahapan kalus IR64 relatif tahan terhadap higromisin, kalus yang tumbuh bukan transgenik melainkan merupakan *escapes*. Namun demikian, tidak ada tanaman resisten yang berhasil diregenerasikan. Diperkirakan bahwa higromisin pada level 50 mg/l tidak dapat mematikan kalus IR64 tetapi menghilangkan kapasitas kalus untuk beregenerasi. Sedangkan untuk Cisadane dan Koshihikari terlihat nyata bahwa higromisin merupakan agen penyeleksi yang baik dan level yang digunakan cukup efektif (Gambar 1c). Kalus Rojolele pada dua subkultur pertama masih seluruhnya tumbuh, kemudian terseleksi pada tahapan ketiga. Tanaman yang berhasil diperoleh dari kalus Cisadane dan Rojolele tampak pada Gambar 1d dan 1e. Keberhasilan ini sangat ditentukan oleh kondisi kultur jaringan yang telah dioptimisasi lebih dahulu dan adanya asetosiringon sebagai induser dari gen virulen *Agrobacterium*.

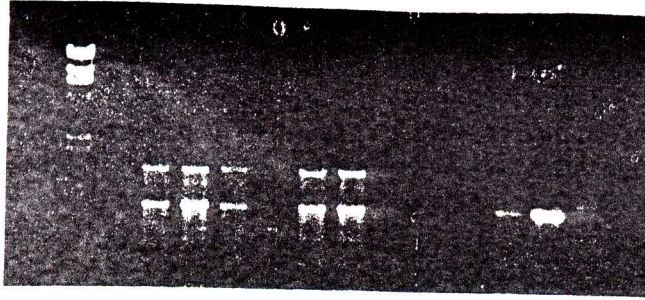
DNA diisolasi dari beberapa planlet tanaman transgenik kemudian digunakan untuk analisis PCR dengan menggunakan primer *GUS-A*, *hpt* dan *vir*. Hasil analisis tampak pada Gambar 2 memperlihatkan keberadaan gen *GUS-A* dan gen *hpt*, sehingga terbukti tanaman tersebut merupakan tanaman transgenik. Hasil PCR dengan primer *vir* berfungsi sebagai negatif kontrol untuk membuktikan bahwa hasil positif bukan karena kontaminasi bakteri.

Tabel 2. Jumlah Hyg^R kalus dan tanaman transgenik.

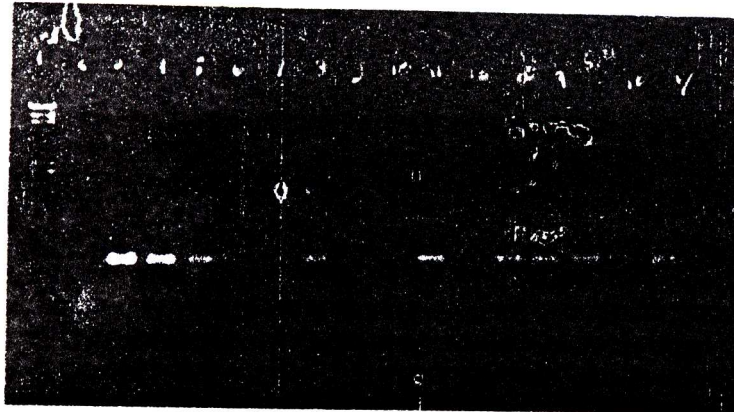
Perlakuan		Persentase kalus tumbuh pada media seleksi				Regenerasi jumlah planlet
varietas	bakteri	Jumlah kalus awal	Tiga minggu setelah infeksi	Dua bulan setelah infeksi	Tiga bulan setelah infeksi	
IR64	Agl-1 (pIG 121 Hm)	12	100	100	100	-
	EHA 101 (pIG 121 Hm)	13	100	84,62	84,62	-
	Tidak diinfeksi	12	83,33	83,33	83,33	-
Cisadane	Agl-1 (pIG 121 Hm)	14	42,86	0	0	-
	EHA 101 (pIG 121 Hm)	16	56,25	25	12,5	25
	Tidak diinfeksi	10	20	0	0	-
Rojolele	Agl-1 (pIG 121 Hm)	37	69,70	12,12	0	-
	EHA 101 (pIG 121 Hm)	36	53,73	26,03	18,09	54
	Tidak diinfeksi	10	100	100	0	-
Koshihikari	Agl-1 (pIG 121 Hm)	35	90,62	18,26	0	-
	EHA 101 (pIG 121 Hm)	34	78,39	40,66	7,69	-
	Tidak diinfeksi	10	100	90	0	-



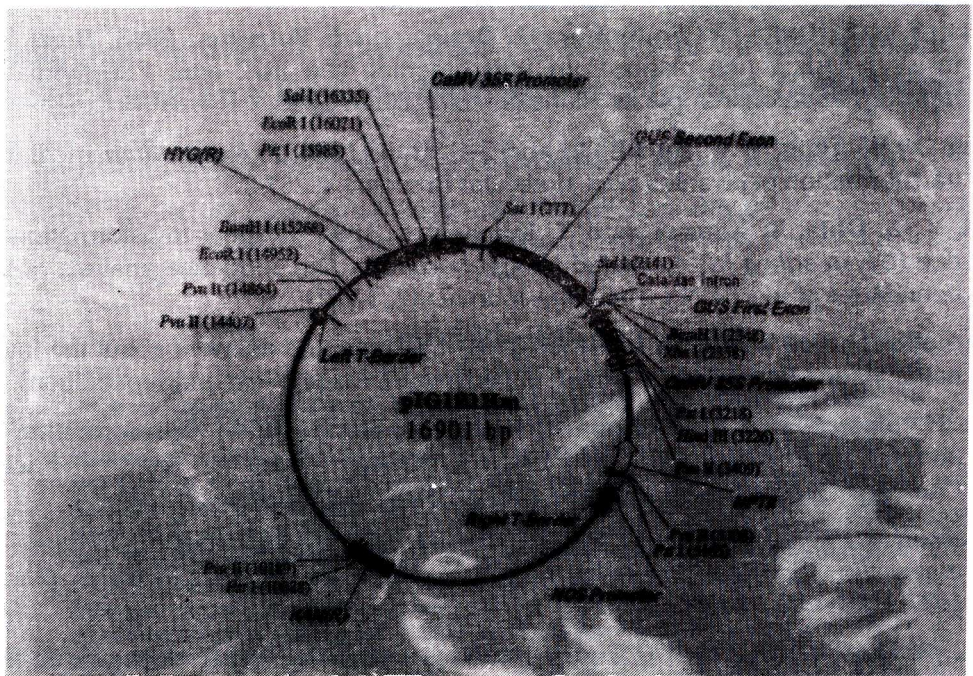
Gambar 1 a. Ko-kultivasi kalus padi dengan *A. tumefaciens*.
 b. Hasil uji *GUS* pada kalus
 c. Kalus yang resisten dan tidak resisten pada media seleksi mengandung antibiotik higromisin.
 d. Regenerasi tanaman dari kalus resisten.
 e. Planlet tanaman Rojolele transgenik.



Gambar 2a. Hasil analisis PCR dengan primer *GUS-A*. Enam lajur pertama ialah enam sampel yang diambil secara random. Lajur ke 7-8 kontrol negatif (tanaman yang tidak diinfeksi dan reaksi PCR). Tiga lajur berikutnya adalah kontrol positif (bakteri EHA 101 mengandung pIG 121 Hm dan plasmid pIG 121 Hm serta bakteri Agl-1).



Gambar 2b. Analisis PCR dengan primer *hpt*. Tiga lajur pertama ialah kontrol positif, dua lajur berikut adalah kontrol negatif, kemudian adalah sampel tanaman transgenik.



Gambar 3. Peta plasmid pIG 121 Hm.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa tanaman padi transgenik dari kultivar padi Cisadane dan Rojolele, yang merupakan jenis indica dan javanica Indonesia, berhasil diperoleh. Tanaman padi transgenik ini diperoleh dengan menggunakan teknik introduksi gen melalui *A. tumefaciens* yang secara alami hanya menginfeksi tanaman dikotil. Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa strain *Agrobacterium* super virulen EHA 101 (pIG 121 Hm) lebih efektif dibandingkan dengan Agl-1 (pIG 121 Hm) untuk keempat jenis varietas yang digunakan.

DAFTAR PUSTAKA

- Chilton, M.D., T.C. Currier, S.K. Farrand, A.J. Bndich, M.P. Gordon, and E.W. Nester. 1974. *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 3672-3676.
- Cooley, J., T. Ford T, and P. Christou. 1995. Molecular and genetic characterization of elite transgenic rice plant produced by electric discharge particle accelaration. Theor Appl. Genet. 90: 97-104.

- Datta, S.K., K. Datta, N. Soltanifar, G. Donn, and I. Potrykus. 1992.** Herbicide resistant Indica rice plants from IRRI breeding line IR72 after PEG-mediated transformation of protoplasts. *Plant Mol. Biol.* 20: 619-629.
- Dong, J., W. Teng, W.G. Buchholz, and T.C. Hall. 1996.** *Agrobacterium* mediated transformation of javanica rice. *Molecular Breeding* 2: 267-276.
- 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 the T-DNA. *The Plant Journal* 6(271-282).
- International Rice Research Institute. 1995.** Question and answers about the International Rice Research Institute. A public awareness publication (Sept.edition).
- Inez H. Slamet-Loedin, W. Rahayu, and M.S. Prana. 1996.** Transformation of javanica rice using *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. of 3rd Asia-Pacific Conference on Agricultural Biotechnology: Issues and Choices*.
- Jefferson, R., T. Kavanagh, and B. Bevan. 1987.** *GUS* fusions beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher marker in higher plants. 1987. *EMBO J* 6: 3901-3907.
- Li, L., R. Qu, A. de Kochko, C. Fauquet, and R.N. Beachy. 1993.** An improved rice transformation system using the biolistic method. *Plant Cell Rep.* 12: 250-255.
- Linsmaer, E.M. and F. Skoog. 1965.** Organic growth requirement of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 18: 100-127
- Ohta, S., S. Mita, T. Hattori, and K. Nakamura. 1990.** Construction and expression in tobacco of a b-glucuronidase (*GUS*) reporter gene containing an intron within the coding sequence. *Plant Cell Physiol.* 31: 805-813.
- Rashid, H., S. Yokoi, K. Toriyama, and K. Hinata. 1996.** Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in Indica rice. *Plant Cell Rep.* 15: 727-730.
- Rueb, S. and L.A.M. Hensgens. 1989.** Improved Histochemical staining for b-D-glucuronidase activity in monocotyledonous plants. *Rice Genet. Newsl.* 6: 168-169.
- Xu, X.P. and B. Li. 1994.** Fertile transgenic Indica rice plants obtained by electroporation of the seed embryo cells. *Plant Cell Rep.* 13: 237-242.
- Zhang, W. and R. Wu. 1988.** Efficient regeneration of transgenic plants from rice protoplasts and correctly regulated expression of the foreign gene in the plants. *Theor Appl. Genet.* 76: 835-840.