

Eksplorasi Gen-gen Toleran Cekaman Abiotik pada Tanaman

Suharsono

*Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi dan Departemen Biologi, FMIPA,
Institut Pertanian Bogor*

Pendahuluan

Produksi pertanian dapat ditingkatkan melalui program intensifikasi dan ekstensifikasi. Baik program intensifikasi maupun program ekstensifikasi membutuhkan kultivar unggul. Kultivar unggul dapat dirakit melalui perbaikan genetik baik melalui persilangan konvensional maupun melalui teknologi DNA rekombinan.

Program ekstensifikasi pertanian terbentur pada terbatasnya lahan yang sesuai. Beralih-fungsinya lahan pertanian menjadi pemukiman atau kawasan industri, terutama di pulau Jawa, merupakan salah satu faktor yang menyebabkan lahan pertanian menjadi sempit. Oleh sebab itu, pembukaan lahan baru untuk pertanian harus dilakukan. Namun, pembukaan lahan baru yang belum dimanfaatkan dengan optimal, terutama di luar Pulau Jawa, mempunyai banyak kendala, karena sebagian besar lahan adalah lahan marginal seperti lahan asam, lahan garam, lahan yang sangat kering. Perbaikan genetik sangat tergantung dari sumber bahan genetik, khususnya gen. Analisis molekuler terhadap tanaman yang toleran terhadap suatu cekaman, sangat mendukung program perbaikan genetik tanaman yang dapat beradaptasi pada kondisi lahan marginal tertentu.

Isolasi gen-gen yang berhubungan dengan toleransi tanaman terhadap suatu cekaman sangat penting untuk perbaikan genetik tanaman dalam rangka peningkatan produksi pertanian. Toleransi terhadap suatu cekaman abiotik adalah suatu sifat yang kompleks yang dikendalikan oleh beberapa yang berbeda yang terkoordinasi melalui suatu sistem jejaring. Gen-gen yang berhubungan dengan sistem toleransi tanaman terhadap suatu cekaman dapat diisolasi dari tumbuhan yang tumbuh di tanah marginal dengan menggunakan gen dari spesies lain yang ekspresinya diinduksi oleh cekaman tersebut sebagai pelacak.

Melalui penapisan diferensial terhadap tanaman *near iso line* (NIL) yang mendapat cekaman, gen yang berhubungan dengan cekaman dapat dideterminasi dan diisolasi. Penapisan diferensial terhadap pustaka cDNA dari tanaman yang mendapat cekaman dan yang tidak mendapat cekaman sangat banyak digunakan dalam usaha isolasi gen. Dengan menggunakan pelacak dari spesies lain, penapisan terhadap pustaka genom juga sering dilakukan untuk mendapatkan gen yang utuh. Dalam rangka menyimpan seluruh bahan genetik kedelai lokal Indonesia, pustaka genom kedelai kultivar Slamet dan kultivar Lumut telah dikonstruksi (Suharsono 2002; Suharsono dan Jusuf 2003).

Active Oxygen Species (AOS) seperti radikal superoksida (O_2^-), H_2O_2 , dan radikal hidroksil (OH^\cdot) dapat mengganggu fungsi DNA, protein, membran, dan klorofil. Cekaman abiotik dapat menyebabkan peningkatan AOS. Untuk mengatasi masalah ini tanaman mengembangkan sistem kompleks antioksidan.

Toleransi Tanaman terhadap Cekaman Asam dan Aluminium

Lahan asam di dunia meliputi sekitar 1×10^9 hektar, yang mencakup daerah tropis dan subtropis (Van Wambeke 1976; Haug 1984; Moller *et al.* 1984). Indonesia mempunyai sekitar 47.600.000 ha jenis Podsolik Merah Kuning yang bersifat asam (Syarifuddin dan Abdurachman 1993). Selain itu, Indonesia mempunyai lahan gambut yang bersifat asam yang sangat luas.

Tanah asam dapat dinaikkan pH-nya melalui pengapuran sehingga sesuai untuk produksi tanaman, tetapi pengapuran membutuhkan biaya yang mahal dan tidak bersifat permanen. Penggunaan tanaman yang sesuai dengan kondisi lahan asam dengan kelarutan Al yang tinggi merupakan usaha yang lestari dalam produksi tanaman di lahan asam.

Pengaruh Aluminium terhadap Tanaman

Di dalam tanah aluminium terdapat dalam berbagai bentuk, tergantung pada pH tanah. Pada pH di bawah 5,0, ion Al^{+3} merupakan bentuk yang paling dominan yang sangat beracun bagi tanaman. Pada kondisi netral, pH 6, aluminium menjadi bentuk yang tidak larut $Al(OH)_3$, dan pada kondisi alkalin, aluminium menjadi bentuk $Al(OH)_4^-$. Al dapat berasosiasi dengan berbagai senyawa organik dan inorganik seperti PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , F⁻, asam organik, protein, dan lipid (Delhaize dan Ryan 1995).

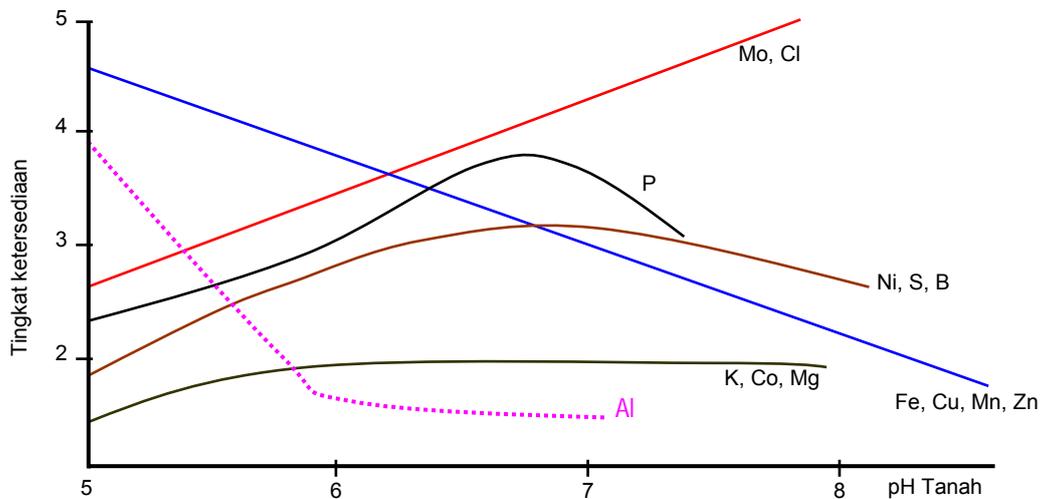
Keracunan Al pada tanaman merupakan faktor pembatas utama bagi pertumbuhan tanaman di lahan asam (Basu *et al.* 1994; Jones dan Kochian 1995). Gejala keracunan Al yang umum ditemui pada tanaman adalah penghambatan pertumbuhan akar (Foy *et al.* 1978). Menurut Ryan *et al.* (1993) dan Sasaki *et al.* (1995), Al menghambat pertumbuhan hanya pada bagian ujung (meristem) akar.

Kelarutan Al berhubungan erat dengan tingkat keasaman tanah, dan keasaman tanah dapat disebabkan oleh pencucian ion logam-logam alkalin seperti Na, K, Ca, dan Mg (Mossor-Pietraszewska 2001). Meningkatnya kelarutan Al di dalam tanah asam menyebabkan terjadinya defisiensi nutrisi seperti Mg, Ca, dan P dan unsur mikro seperti Zn, Pb, dan Mo (Foy and Flemming 1978). Ketersediaan berbagai unsur di dalam tanah bagi tanaman dipengaruhi oleh pH tanah (Gambar 1).

Ion Al diambil oleh tanaman melalui akar, dan hanya sedikit melalui daun. Pengambilan logam aktif tersebut melibatkan pembawa ion spesifik yang membutuhkan energi, tetapi pembawa ion Al belum ditemukan. Al dapat terikat pada berbagai bagian sel seperti dinding sel, membran plasma atau DNA, dan kebanyakan Al terikat pada dinding sel (Mossor-Pietraszewska 2001).

Gejala keracunan Al yang paling mudah dikenali adalah terhambatnya pertumbuhan akar utama. Ujung-ujung akar utama, terutama pada 2-3 mm dari pucuk akar, menebal, berwarna kecoklatan dan bercabang kurang sempurna (Sasaki *et al.* 1995; Ryan *et al.* 1993; 1994).

Pada tanaman gandum, penghambatan pemanjangan akar oleh cekaman Al selama 6 jam pertama mencapai 60%. Hal ini dikarenakan Al telah mengintervensi fungsi-fungsi sel sehingga terjadi penghambatan pembelahan sel, pemanjangan sel atau transport nutrisi (Lazof *et al.* 1994). Salah satu fungsi yang terganggu adalah metabolisme polisakarida din-



Gambar 1. Hubungan antara tingkat ketersediaan berbagai unsur dalam tanah dan pH tanah (Goedert *et al.* 1997).

ding sel ujung akar, sekitar 1-6 mm. Perubahan metabolisme polisakarida dinding sel di ujung akar ini mengakibatkan pemanjangan akar terhambat (Le Van *et al.* 1994).

Membran plasma merupakan sasaran utama Al. Al mempengaruhi permeabilitas membran dan dinding akar karena Al dapat mengikat gugus karboksil dan fosfat pada membran dan dinding sel. Al mengikat membran sehingga mempengaruhi struktur membran yang berakibat penghambatan aktivitas ATPase. Di samping itu, penurunan aktivitas ATPase dikarenakan fungsi Ca pada membran digantikan oleh Al (Sasaki *et al.* 1995).

Al juga menghambat aktivitas enzim fosfolipase C yang bertanggung jawab memecah fosfoinositol difosfat (PtdIn(4,5)P₂) menjadi inositol trifosfat (ins(1,4,5)P₃ atau IP₃) dan diasilgliserol (DAG), mengakibatkan penghambatan baik pembelahan atau pemanjangan sel (Jones dan Kochian 1995).

Al menurunkan aktivitas H⁺-ATPase mikrosom pada akar gandum, baik pada varietas toleran maupun peka terhadap Al, namun penurunan aktivitas pada varietas peka lebih besar. Di samping itu, Al juga menghambat efluk ion K⁺ dengan mempengaruhi kanal K⁺ (Sasaki *et al.* 1995).

Al dapat meningkatkan aktivitas pompa ATP yang tergantung H⁺ (ATP-dependent H⁺) dan abscisic acid (ABA) pada akar tanaman gandum. Perlakuan ABA meningkatkan aktivitas transport H⁺ pada tonoplasma, sehingga diduga pada akar yang dicekam oleh Al, ABA berperan sebagai pengaktif pompa H⁺ (Kasai *et al.* 1995).

Interaksi Al dengan DNA dan RNA mempengaruhi sifat-sifat fisikokimia dan fungsi biologis seperti sintesis DNA dan RNA. Pengaruh ini disebabkan karena Al yang memiliki muatan positif mengikat fosfat pada kedua utas DNA sehingga utas DNA gagal berpisah. Kegagalan pemisahan dua utas DNA ini akan diikuti gangguan pada pembelahan sel (Matsumoto 1991).

Sistem Toleransi Tanaman terhadap Cekaman Al

Untuk mengetahui sistem toleransi tanaman terhadap cekaman aluminium, beberapa peneliti telah melakukan penelitian tentang cekaman aluminium pada beberapa tanaman. Menurut Taylor (1991) mekanisme toleransi tanaman terhadap cekaman Al dilakukan melalui 2 cara, yaitu (1) mekanisme eksternal atau eksklusi dan (2) mekanisme internal. Mekanisme eksternal dilakukan dengan cara mencegah Al masuk ke dalam sistem simplas, yaitu dengan melakukan imobilisasi Al di dinding sel, menciptakan sistem permeabilitas selektif di membran plasma, menginduksi kenaikan pH di rizosfer dan apoplas akar, mengeluarkan Al dari dalam sel, mengeluarkan (eksudasi) fosfat dan ligan pengkelat Al. Mekanisme internal dilakukan dengan melakukan pengkelatan terhadap Al di sitosol oleh asam-asam organik, protein atau ligan organik lainnya, melakukan kompartementasi Al di vakuola, menginduksi sintesis protein tertentu terutama protein pengkelat Al.

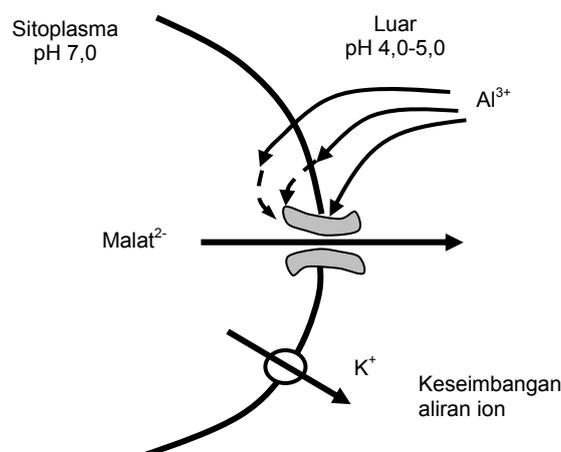
Peningkatan pH di permukaan akar (rizosfer) diduga berhubungan dengan mekanisme pengeluaran Al untuk mengurangi aktivitas kimia Al sebelum mengganggu fungsi metabolik sel yang penting (Foy dan Flemming 1978). Akumulasi Al di akar pada genotipe gandum sensitive lebih banyak dibandingkan dengan genotipe toleran karena genotipe toleran mampu memompa keluar Al (Sasaki *et al.* 1995). Vazquez *et al.* (1999) melaporkan bahwa tanaman jagung varietas toleran yang mendapat cekaman Al mampu mendepositkan Al ke dalam vakuola dan tetapi tidak pada dinding sel.

Sekresi asam organik seperti asam malat, asam sitrat, asam oksalat dan asam sukcinat juga merupakan salah satu cara tanaman untuk menanggulangi pengaruh destruktif dari Al. Perbedaan asam organik yang diekstrak dari akar mempunyai perbedaan dalam kemampuan mengendapkan Al. Asam oksalat mempunyai kemampuan mengendapkan Al paling kuat, diikuti asam sitrat, asam malat dan asam sukcinat (Hue *et al.* 1986). Pada tanaman jagung, sel mampu mengeluarkan asam malat dan melepaskan fosfat untuk membentuk kompleks Al-fosfat, sehingga mengurangi toksisitas Al (Pellet *et al.* 1995).

Bukti yang mendukung bahwa asam malat berperan dalam mekanisme toleransi Al adalah (a) pelepasan asam malat distimulasi secara spesifik oleh Al, (b) asam malat melindungi bagian tanaman gandum yang peka Al di ujung akar ketika pada larutan hara ditambahkan Al, (c) banyak asam malat yang disekresi oleh akar berhubungan dengan lokus *Al1* pada tanaman yang toleran terhadap Al (Delhaize dan Ryan 1995).

Asam malat merupakan asam organik yang banyak dikeluarkan dari ujung akar gandum yang toleran Al. Ekskresi asam malat pada tanaman gandum toleran Al mencapai 5-10 kali lipat dibandingkan gandum yang peka Al (Delhaize *et al.* 1993). Hasil ini didukung oleh penelitian Ryan *et al.* (1995) bahwa pada tanaman gandum anion organik utama yang merespon cekaman Al adalah asam malat.

Menurut Delhaize dan Ryan (1995) efluks malat dari sitoplasma ke larutan di luar sel dijumpai oleh saluran di membran plasma. Al menstimulasi efluks malat melalui tiga cara, yaitu (1) Al berinteraksi langsung dengan saluran sehingga mengubah bentuk saluran dan meningkatkan aktivitasnya, (2) Al berinteraksi dengan reseptor di permukaan membran dan oleh reseptor diteruskan ke penyampai pesan kedua menuju saluran sehingga meningkatkan aktivitasnya, dan (3) Al masuk ke dalam sitosol dan mempengaruhi aktivitas saluran baik secara langsung melalui pengikatan terhadap saluran maupun secara tidak langsung melalui jalur signal transduksi (Gambar 2).



Gambar 2. Model pembukaan saluran malat yang dipicu oleh Al (Delhaize dan Ryan 1995).

Pada tanaman kedelai asam malat banyak diakumulasi pada jaringan akar, sedangkan asam sitrat banyak dieksudasi ke daerah rizosfer. Kultivar toleran lebih banyak mengakumulasi dan mengeksudasi asam organik dibandingkan dengan kultivar peka (Kasim 2000).

Prolin yang berperan dalam cekaman hiperosmotik terutama cekaman kekeringan dan garam juga berperan dalam toleransi tanaman terhadap Al (Mossor-Pietraszewska 2001).

Al mampu mengurangi jumlah Ca^{2+} dan menurunkan aktivitas ATPase pada membran plasma (Matsumoto 1991). Penurunan aktivitas ATPase pada kultivar rentan lebih tinggi dibandingkan pada kultivar toleran. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas enzim ATPase pada tanaman toleran kurang dipengaruhi Al dibandingkan dengan tanaman yang peka (Sasaki *et al.* 1995).

Deposit kalose pada plasmodesmata diinduksi oleh cekaman fisik, pelukaan, infeksi jamur dan Al. Tanaman *Triticum aestivum* var. peka mendepositkan kalose (1-3- β -D-glucan) pada daerah plasmodesmata untuk mencegah transport simplas. Plasmodesmata bukan merupakan pori yang statis tetapi bersifat dinamis terhadap stimulasi gerakan simplastis dan perbedaan tekanan turgor. Penyumbatan plasmodesmata menyebabkan tertutupnya komunikasi antar sel yang dilakukan melalui plasmodesmata (Sivaguru *et al.* 2000).

Cekaman Al pada *T. aestivum* L. menginduksi sintesis protein 51 kD pada kultivar toleran tetapi tidak pada varietas peka (Basu *et al.* 1994). Induksi yang lebih kuat terjadi pada 5 mm dari ujung, dibandingkan 2 cm berikutnya. Protein tersebut tidak diinduksi oleh logam lain seperti Cu, Zn, dan Mn.

Antara tanaman kultivar kedelai toleran dan peka yang diinduksi oleh cekaman Al terdapat perbedaan profil protein spesifik berukuran 79,8 kD. Protein ini diekspresikan kuat di daerah 0,5-0,8 cm dari ujung akar kedelai toleran (Sopandie *et al.* 2003).

Walaupun kebanyakan tanaman teracuni oleh aluminium, tetapi tumbuhan harendong (*Melastoma affine* dan *M. malabathricum*) dan *Melaleuca cajuputi* dapat tumbuh baik pada tanah asam dengan kelarutan Al yang tinggi. *M. malabathricum* dapat menyerap Al dan mengakumulasi Al di daun dan batang sehingga disebut sebagai akumulator Al, sedangkan *M. cajuputi* tidak dapat mengakumulasi Al di batang sehingga disebut pendorong-keluar (*excluder*) Al (Osaki *et al.* 1998). Di daun, Al diakumulasi di sel epidermis atas dan tersebar di sel mesofil, sedangkan di akar, Al di seluruh jaringan, terutama di epidermis dan endodermis (Watanabe *et al.* 1998; 2003). Tanaman ini mampu meningkatkan ketersediaan P di perakaran, karena meningkatnya oksalat yang diinduksi Al, sehingga dapat meningkatkan pertumbuhan tanaman (Watanabe dan Osaki 2002).

Penelitian tentang *M. malabathricum* di Indonesia hanya terbatas pada pengaruh tumbuhan ini terhadap tingkat keasaman tanah dan terhadap serapan P pada kedelai (Suhardi 2004, komunikasi pribadi). Sampai saat ini isolasi gen yang terkait dengan toleransi *M. malabathricum* terhadap cekaman tanah asam dan kelarutan aluminium yang tinggi belum dilakukan. Dengan menggunakan bank data dari gen (genbank) yang berhubungan dengan toleransi spesies lain, gen-gen dari *M. malabathricum* yang berhubungan dengan toleransi terhadap cekaman tanah asam dan kelarutan aluminium yang tinggi dapat diisolasi.

Gen yang Ekspresinya Diinduksi oleh Cekaman Al

Untuk mengetahui mekanisme toleransi tanaman terhadap cekaman aluminium, beberapa peneliti telah melakukan penelitian tentang gen yang ekspresinya diinduksi oleh cekaman Al. Snowden dan Gardner (1993), Richards *et al.* (1994), dan Snowden *et al.* (1995) telah mengisolasi tujuh klon cDNA. Ezaki *et al.* (1995) telah mengisolasi gen-gen yang ekspresinya diinduksi oleh cekaman aluminium pada kultur sel tembakau. Richards *et al.* (1998) telah mempelajari gen yang ekspresinya diinduksi oleh cekaman Al pada *Arabidopsis thaliana*.

Pada kedelai kajian genetik dan fisiologi tanaman yang mendapat cekaman pH rendah dan Al tinggi (Sopandie *et al.* 1996; Jusuf *et al.* 1999) dan kajian tentang biologi molekuler kedelai (Anwar 1999; Jusuf *et al.* 1999) yang mendapat cekaman abiotik seperti kekelembaban, pH rendah, dan aluminium tinggi telah dilakukan. Dalam rangka mengisolasi gen yang ekspresinya diinduksi oleh cekaman Al pada pH 4 dari kedelai, pustaka cDNA dari kedelai kultivar Yellow Biloxi telah dikonstruksi di dalam fage galur gt11 (Elfawati 1999). Anwar (1999) dan Yuniati (2000) telah mengkonstruksi pustaka cDNA kedelai masing-masing dari kultivar Lumut dan Slamet yang mendapat cekaman aluminium di dalam vektor plasmid.

Gen-gen yang diisolasi dari cDNA tanaman gandum yang mendapat cekaman aluminium dinamai *wali* (*wheat aluminium induced*), yaitu *wali1-wali7*. *wali1* berukuran 700 bp menyandi suatu protein yang mirip dengan metallothionin yang kaya dengan sistein yang berukuran 7,4 kD. Protein tersebut mempunyai daerah hidrofobik pusat yang memisahkan 2 *cys-rich domain* masing-masing mengandung 3 motif Cys-X-Cys. Transkripsi *wali1* meningkat pada perlakuan 50 μ M Al selama 24 jam dan mencapai puncaknya pada 96 jam (Snowden dan Gardner 1993).

wali2 berukuran 1300 bp menyandi protein berukuran 37,5 kD dan tidak mempunyai homologi dengan tanaman lain dalam database. Pola transkripsi *wali2* menunjukkan bahwa pada perlakuan Al selama 0,5 jam meningkat, kemudian menurun pada perlakuan 2 dan 4 jam, dan diikuti peningkatan transkripsi pada perlakuan 24 jam sampai 96 jam (Snowden dan Gardner 1993).

wali3 berukuran 700 bp menyandikan protein berukuran 9,5 kD. Berdasarkan urutan nukleotidanya, *wali3* mempunyai 62% homologi dengan *wali5* (700 bp) dan *wali6* (641 bp). Transkripsi *wali3* mulai meningkat pada perlakuan Al selama 24 jam dan mencapai puncaknya pada 96 jam. Sedangkan transkripsi *wali5* dan *wali6* hanya diinduksi pada 2 hari setelah perlakuan (Snowden dan Gardner 1993; Richards dan Gardner 1994).

wali4 menyandi bagian C-terminal 129 asam amino dari enzim phenyl alanine ammonia lyase (PAL) yang mengkatalisis siklus fenilpropanoid dengan produk akhir flavonoid, antosianin, tanin, dan lignin. Ekspresi PAL pada tanaman dipengaruhi berbagai cekaman seperti perlukaan, radiasi ultraviolet, dan elicitor fungi (Snowden *et al.* 1995). *wali4* mulai ditranskripsikan oleh tanaman yang mendapat perlakuan Al selama 24 dan 48 jam, dan setelah itu tidak ditranskripsikan lagi.

Peroksidase digolongkan ke dalam oksidoreduktase yang menggunakan hidrogen peroksida sebagai substrat. Enzim peroksidase berkaitan dengan sejumlah proses fisiologis yang meliputi lignifikasi, penyembuhan luka, oksidasi fenol, dan pertahanan terhadap penyakit. Ekspresi gen peroksidase ini diinduksi berbagai cekaman seperti patogen, garam, Al, dan pelukaan (Reimann *et al.* 1992; Ritter *et al.* 1993; Richards *et al.* 1998; Cheong *et al.* 2002).

Glutathion S-transferase (GST) merupakan enzim yang banyak dijumpai pada tanaman maupun mikroba. GST terdiri dari beberapa subunit dan secara spesifik mengikat sejumlah senyawa hidrofobik eksogen dan mencegah peroksidasi lipid. Al yang dapat menyebabkan peroksidasi pada membran fosfolipid akan dicegah oleh GST. Transkripsi GST pada kultur sel tembakau meningkat dengan perlakuan pH rendah, Al atau starvasi P. Tingkat transkripsi GST tertinggi terjadi pada saat perlakuan 20 jam, kemudian turun pada perlakuan 30 jam (Ezaki *et al.* 1995). Gen *parB* yang mempunyai homologi dengan GST juga diinduksi ekspresinya oleh auksin pada protoplas mesofil tembakau (Takahashi dan Nagata 1992). Promoter gen GST selain diinduksi oleh auksin juga diinduksi oleh asam salisilat, asam absisik, asam jasmonik, benzil adenin, H₂O₂, dan kadmium (Cd) (Ulmasov *et al.* 1995).

Metallothionin (MT) merupakan protein yang kaya dengan sistein yang diperlukan dalam mengatasi ion-ion metal toksik dalam konsentrasi tinggi. Zhou dan Goldsbrough (1994) telah mengisolasi dua MT (MT1 dan MT2) dari *Arabidopsis* yang homolog dengan MT hewan dan jamur. Transkripsi MT2 meningkat dengan perlakuan CuSO₄, ZnSO₄, dan CdSO₄. Dari ketiga logam berat tersebut Cu paling efisien dalam menginduksi ekspresi MT2, yaitu dapat meningkatkan ekspresi (transkripsi) sebesar 5,5 kali. *Arabidopsis* yang mendapat perlakuan 50 µM Cu menyebabkan peningkatan transkripsi MT2 sampai 72 jam perlakuan.

Richards *et al.* (1998) telah mengisolasi beberapa klon cDNA dari tanaman *Arabidopsis* yang diberi nama gen-gen *EARLI* (*early Arabidopsis aluminum induced*). Klon *pEARLI* menyandikan gen yang termasuk ke dalam kelompok hidrofobik yang belum diketahui fungsinya. Klon ini dihasilkan dari perlakuan Al yang sangat cepat.

Sivaguru *et al.* (2003) melaporkan bahwa AI menginduksi ekspresi gen WAK1 (*cell wall-associated receptor kinase 1*) pada organ spesifik. Melalui analisis RT-PCR terbukti bahwa ekspresi gen WAK1 diinduksi oleh AI pada akar. Puncak ekspresi terjadi pada 3 jam setelah pemberian cekaman AI, diikuti dengan penurunan ekspresi pada 6 jam setelah perlakuan dan ekspresinya terus menurun hingga pada 9 jam setelah pemberian cekaman AI ekspresi gen tersebut benar-benar tidak ada. Gen WAK1 diduga merupakan gen awal yang ekspresinya diinduksi oleh AI. Tanaman transgenik yang mengekspresikan gen tersebut secara berlebihan menunjukkan peningkatan toleransi terhadap AI.

Ermolayev (2003) telah membandingkan ekspresi gen-gen yang diinduksi oleh AI pada tanaman kedelai dari kultivar sensitif dan toleran. Ekspresi gen-gen penyandi phosphoenolpyruvate carboxilase (PEPC), penyandi protein pengontrol tumor (TCTP/klon 58), dan penyandi inosine-5'-monophosphat dehydrogenase (IMPDH/klon 633) yang berlebihan terjadi hanya pada akar tanaman kedelai kultivar toleran yang mendapat cekaman AI. Tanaman *Arabidopsis* transgenik yang mengandung klon 633 (IMPDH) menunjukkan penurunan penetrasi AI pada akar, terutama pada zona pembelahan dan pemanjangan. Pembentukan akar-akar lateral pada tanaman transgenik tersebut yang diberi cekaman AI membuktikan bahwa IMPDH berperan dalam toleransi tanaman terhadap AI.

AI dapat mempengaruhi gen-gen yang berhubungan dengan pembelahan sel seperti *heat shock protein* (hsp), protein histon H3, H4, dan S-adenosyl-L-homocystein (SHH). Salah satu fungsi hsp adalah untuk pelipatan protein (*protein folding*) dan diekspresikan di berbagai tipe sel dalam kondisi tidak mendapat cekaman panas. Tingkat transkripsi H3 dan H4 menurun dengan berlanjutnya perlakuan AI baik pada varietas toleran maupun varietas peka. Hal ini menunjukkan bahwa AI menghambat peran histon dalam pembelahan sel. Perlakuan 100 μ M AI selama 4 jam pada gandum menyebabkan peningkatan transkripsi SHH, tetapi kemudian menurun setelah 2 hari perlakuan. Pada perlakuan 10 μ M AI transkripsi SHH tetap tinggi sampai 4 hari perlakuan (Richards dan Gardner 1994).

Sebuah protein TAI-18 yang mirip dengan *pathogen-related protein* diinduksi oleh AI pada akar gandum. Biosintesis TAI-18 mulai meningkat selama 3-6 jam perlakuan AI dan mencapai puncaknya pada perlakuan 9-12 jam. Ekspresi protein ini juga dipengaruhi oleh Cu, Cd, pH rendah, dan kekurangan Ca, tetapi tidak dipengaruhi oleh kejutan panas (Cruz-Ortega dan Ownby 1993).

Beberapa kandidat cDNA yang ekspresinya diduga diinduksi oleh cekaman AI telah diisolasi melalui konstruksi pustaka cDNA dari tanaman kedelai kultivar Lumut yang peka terhadap cekaman AI dan penapisan diferensial terhadap pustaka tersebut (Jusuf *et al.* 1999; Anwar *et al.* 2000). Klon kandidat tersebut adalah *gmali1* (GenBank No. AF901303) yang diduga menyandi H⁺-ATPase membran plasma, *gmali14* menyandi Histon H3, *gmali20* menyandi katalase, *gmali49* menyandi NADH dehydrogenase, *gmali50* (GenBank No. AF169830) menyandi *auxin-induced protein*. Beberapa klon cDNA lainnya yang merupakan kandidat gen yang ekspresinya diinduksi oleh cekaman AI dianalisis dalam penelitian ini seperti klon GR. Dengan RT-PCR, Anwar (1999) juga mengisolasi *sapali* (GenBank No. AF 901304) menyandi aminoasil peptidase. Yuniati (2000) telah mengisolasi klon cDNA A36 dari gen yang diduga ekspresinya diinduksi oleh AI melalui penapisan diferensial terhadap pustaka cDNA dari tanaman kedelai kultivar Slamet yang mendapat cekaman AI dan pH rendah. Urutan nukleotida klon cDNA A36 telah diidentifikasi dalam penelitian ini. Beberapa klon cDNA yang diperoleh Anwar *et al.* (2000) dan Yuniati (2000) dianalisis lebih lanjut

dalam penelitian ini untuk mengetahui spesifikasi ekspresi klon tersebut dengan memberikan berbagai cekaman abiotik seperti pH4, Al, Fe, Cu, Zn, dan NaCl.

Sasaki *et al.* (2004) telah mengisolasi gen penyandi protein transporter malat yang diaktivasi oleh aluminium (*almt*) yang diisolasi dari gandum. Dengan menggunakan galur NIL, gen *almt* diekspresikan lebih intensif di tanaman gandum yang toleran terhadap cekaman Al dibandingkan dengan kultivar yang peka, walaupun gen ini bersifat konstitutif. Selain itu, gen ini diekspresikan lebih intensif di ujung akar daripada di daun. Ini membuktikan bahwa *almt* mempunyai peranan yang cukup penting dalam toleransi gandum terhadap Al.

Toleransi Tanaman terhadap Cekaman Garam dan Kekeringan

Dehidrasi menyebabkan beberapa perubahan di dalam sel, di antaranya adalah akumulasi prolin, glisin betain, beberapa gula, dan perubahan tingkat protein tertentu. Perubahan ini berasosiasi dengan penyesuaian tekanan osmotik dan perlindungan terhadap membran (Bruce *et al.* 2002). Pengaruh merusak dari garam terhadap tanaman adalah konsekuensi dari kekurangan air karena konsentrasi senyawa terlarut di dalam tanah dan mempengaruhi rasio K^+/Na^+ yang disebabkan oleh influx Na^+ serta konsentrasi ion Na^+ yang merugikan tanaman. Sebagian besar gen yang diinduksi oleh kekeringan diinduksi juga oleh garam yang tinggi dan/atau perlakuan ABA, yang menunjukkan bahwa terdapat komunikasi (*crossstalk*) antara respon terhadap kekeringan, garam yang tinggi, dan ABA (Shinozaki *et al.* 2003).

Ekspresi gen dipengaruhi oleh perubahan ketersediaan air. Dalam keadaan mendapat cekaman kekeringan ABA diproduksi dalam tingkat yang tinggi. Perlakuan ABA eksogen dapat mempengaruhi ekspresi gen yang diregulasi oleh dehidrasi sehingga ABA disebut juga sebagai transduser signal. Beberapa gen yang ekspresinya diinduksi oleh kekeringan tidak memberikan respon bila diperlakukan dengan ABA. Ini menunjukkan bahwa gen ini tidak tergantung dari ABA. Kekeringan merupakan signal yang akan diterima oleh suatu reseptor dan akan diteruskan secara berjenjang dengan atau tanpa melibatkan ABA yang kemudian menginduksi ekspresi gen yang diinduksi oleh kekeringan melalui aktivasi beberapa faktor transkripsi yang spesifik.

Beberapa molekul disintesis atau diakumulasi selama mendapat cekaman kekeringan seperti poliamin. S-adenosilmetionin dekarboksilase (SAMDC) yang terlibat di dalam sintesis poliamin, diinduksi oleh cekaman kekeringan dan perlakuan ABA. Prolin dehidrogenase (PDH) adalah enzim yang terlibat dalam oksidasi prolin, diregulasi negatif oleh cekaman kekeringan tetapi tidak dipengaruhi oleh perlakuan ABA. Dengan demikian, SAMDC dan PDH dapat digunakan sebagai alat untuk melakukan penapisan terhadap tanaman yang toleran kekeringan (Bruce *et al.* 2002).

Tanaman yang toleran dan tumbuh di daerah bergaram, mempunyai kandungan garam yang tinggi di dalam sel. Penggunaan ion anorganik untuk mengatur tekanan osmotik menunjukkan bahwa tanaman harus mampu mentolerir kandungan garam yang tinggi di dalam sel. Na^+ toksik bagi tanaman karena mempunyai pengaruh negatif terhadap nutrisi K^+ , aktivitas enzim sitosol, fotosintesis, dan metabolisme. Berdasarkan analisis aktivitas enzim terhadap garam menyimpulkan bahwa tanaman yang toleran garam dapat menjauhkan Na^+ dari sitosol. Tanaman dapat menggunakan beberapa strategi untuk mempertahankan

konsentrasi Na yang rendah di dalam sel, yaitu dengan (1) menghambat influks, (2) kompartementasi Na⁺ di vakuola, dan (3) mengaktifkan efluks Na⁺. *High-affinity K⁺ transporter* dari gandum (HKT1) berfungsi sebagai kotransporter Na⁺-K⁺ yang bertanggungjawab terhadap pengambilan Na⁺ dengan afinitas yang rendah pada konsentrasi Na⁺ tinggi, sehingga tanaman tidak mengalami keracunan. Transpor Na⁺ keluar sel dapat dilakukan oleh antiport Na⁺/H⁺ di membran plasma. Ekspresi yang berlebihan dari gen *AtNHX1* penyandi antiport Na⁺/H⁺ vakuola dari *A. thaliana* pada tanaman *Brassica napus* menghasilkan tanaman yang lebih toleran terhadap cekaman 200 mM NaCl dibandingkan dengan tipe liarnya. Tanaman transgenik yang mengekspresikan *AtNHX1* pada 200 mM NaCl mempunyai kandungan Na⁺ 70 kali dan 9 kali, masing-masing pada daun dan akar, lebih tinggi daripada tanaman liarnya atau tanaman transgenik yang tidak mendapat cekaman garam. Kandungan K⁺ di daun dan akar dari tanaman transgenik yang ditanam dalam keadaan mendapat cekaman garam menurun hingga 75% dan 82% dibandingkan dengan tanaman liarnya. Kandungan prolin dari tanaman ini juga meningkat hingga 6 kali pada keadaan mendapat cekaman garam (Zhang *et al.* 2001).

SOS1 (*salt overly sensitive 1*) memegang peranan yang penting dalam toleransi tanaman terhadap cekaman garam. Gen *sos1* menyandi antiporter Na⁺/H⁺. Ekspresi *sos1* diinduksi oleh cekaman NaCl tetapi tidak oleh ABA dan cekaman dingin (Shi *et al.* 2000)

Respon umum terhadap cekaman garam, kekeringan, dan suhu rendah adalah akumulasi gula dan senyawa kompatibel yang lainnya. Senyawa ini berfungsi sebagai osmoprotektan (penjaga osmolaritas) dan pada beberapa kasus berfungsi menjaga stabilitas biomolekul di bawah kondisi cekaman.

Transport aktif dari senyawa ke dalam sel untuk menjaga turgor tergantung dari gradien proton yang dilakukan oleh pompa proton. Pada tanaman, terdapat tiga pompa proton yang berbeda, yaitu (1) ATPase tipe P yang memompa H⁺ sitoplasma ke luar sel melewati membran plasma, (2) H⁺-ATPase vakuola, dan (3) H⁺-pirofosfatase vakuola yang keduanya memompa proton ke dalam vakuola atau kompartemen lainnya.

Vakuola merupakan 40-90% dari volume sel tanaman dan bersama-sama dengan sitosol berfungsi untuk mempertahankan turgor untuk pertumbuhan dan rigiditas tanaman. Turgor sel sangat tergantung dari aktivitas pompa H⁺ vakuola untuk menjaga gradien H⁺ sehingga ion-ion anorganik, asam organik, gula dan senyawa-senyawa lainnya dapat di-transport. Akumulasi dari senyawa-senyawa ini dibutuhkan untuk mempertahankan keseimbangan air di dalam sel.

Secara umum, akumulasi senyawa terlarut di dalam vakuola dapat menyebabkan ketahanan terhadap garam dan kekeringan. Pengisolasian ion seperti Na di dalam suatu organel dapat meningkatkan tekanan osmotik dan mereduksi pengaruh keracunan dari kation ini. NaCl dapat menginduksi aktivitas transpor H⁺ oleh pompa vakuola, baik pada tanaman yang toleran maupun yang sensitif terhadap garam.

H⁺-pirofosfat vakuola dari *A. thaliana* disandi oleh gen *AVP1*. Meningkatnya ekspresi gen *avp1* sampai dengan 2,4 kali di dalam *A. thaliana* menyebabkan tanaman toleran terhadap 250 mM NaCl dan kekeringan (Gaxiola *et al.* 2001).

Salah satu senyawa yang berfungsi sebagai osmoprotektan adalah trehalose yang merupakan molekul disakarida dari glukosa yang tidak tereduksi. Di dalam bakteri, khamir dan avertebrata, trehalose berperan sebagai protektan terhadap cekaman abiotik. Treha-

lose menjaga stabilitas enzim, protein, dan membran lipid yang terdehidrasi dan menjaga struktur biologi dari kerusakan selama desikasi. Gen penyandi TPS (trehalose-6-phosphate synthase) yang diisolasi dari tanaman mempunyai kemiripan dengan *tps* dari khamir sehingga diperkirakan mempunyai peranan yang sama. Pada bakteri dan khamir, trehalose disintesis melalui dua tahap, yaitu (1) sintesis trehalose-6-fosfat dari UDP-glukosa dan glukosa-6-fosfat dengan katalisator enzim TPS dan (2) sintesis trehalose dari trehalose-6-fosfat oleh enzim trehalose-6-phosphate phosphatase (TPP). Ekspresi konstitutif TPS dan/atau TPP dari *Escherichia coli* atau khamir di tanaman kentang atau tembakau menghasilkan tanaman yang tidak normal seperti pertumbuhan yang terhambat.

Dengan mengekspresikan gen *tpsp* yang merupakan hasil fusi *tps* dan *tpp*, dengan menggunakan promoter yang spesifik atau terinduksi, Garg *et al.* (2002) mendapatkan tanaman yang toleran terhadap 100 mM NaCl. Kandungan ion Na^+ di batang tanaman yang mengekspresikan gen *tpsp* adalah 30-35% lebih rendah daripada tanaman liarnya. Ini menunjukkan bahwa trehalose berperan dalam menjaga ion dan memfasilitasi eksklusi ion Na^+ . Selain toleran terhadap NaCl, ekspresi gen *tpsp* menghasilkan tanaman yang lebih toleran terhadap kekeringan daripada tanaman liarnya. Peranan trehalose ini dideteksi dengan semakin meningkatnya kandungan trehalose saat tanaman transgenik mendapatkan cekaman.

Glisin betain disintesis dari choline melalui dua tahap, yaitu (1) oksidasi choline menjadi betain aldehid oleh enzim choline monooxygenase dan (2) oksidasi betain aldehid menjadi glisin betain oleh enzim betaine aldehyde dehydrogenase. Dalam kondisi cekaman osmotik aktivitas kedua enzim tersebut meningkat beberapa kali. cDNA dari gen penyandi kedua enzim tersebut telah diisolasi. Peningkatan aktivitas enzim ini selaras dengan peningkatan transkrip dari cDNA penyandi kedua enzim tersebut (Bray *et al.* 2000). Hal ini dapat dijadikan sebagai landasan untuk merakit tanaman yang toleran terhadap cekaman garam melalui ekspresi berlebihan gen penyandi kedua enzim tersebut.

SOD merupakan sistem pertahanan pertama dalam menanggulangi kerusakan yang disebabkan oleh AOS dengan mengkatalisis O_2^- menjadi H_2O_2 . Di tanaman, terdapat tiga SOD, yaitu Fe-SOD, Mn-SOD, CuZn-SOD. CuZn-SOD adalah yang paling banyak dan ditemukan di sitosol, peroksisom, kloroplas dan apoplas. Mn-SOD terdapat di matriks mitokondria dan peroksisom (Alscher *et al.* 2002). Fe-SOD lebih banyak ditemukan di tanaman dikotil. Fe-SOD terdapat di kloroplas, dan pada tembakau berasosiasi dengan tilakoid. Askorbat peroksidase (APX) berperan penting dalam detoksifikasi H_2O_2 . APX terdapat di stroma kloroplas, membran tilakoid, badan mikro, sitosol, dan mitokondria.

Cekaman 70 mM NaCl menginduksi ekspresi Fe-SOD, 90 mM NaCl CuZn-SOD di kloroplas (membran tilakoid dan stroma). Askorbat peroksidase (APX) di stroma meningkat sedangkan di tilakoid menurun dengan perlakuan 70-110 mM NaCl. Hilangnya APX di tilakoid merupakan faktor yang penting dalam peningkatan H_2O_2 di dalam kloroplas yang merupakan hasil dari meningkatnya aktivitas Fe-SOD dan CuZn-SOD di tilakoid dan stroma. H_2O_2 mungkin terlibat dalam meningkatnya APX di stroma (Gomez *et al.* 2004).

Kesimpulan

Aluminium menjadi beracun bagi tanaman bila dalam lingkungan asam. Di dalam lingkungan asam, Al dalam keadaan terlarut dan menjadi beracun bagi tanaman karena

dapat berikatan dengan senyawa organik dan anorganik. Mekanisme toleransi tanaman terhadap Al dapat dilakukan melalui dua cara, yaitu mekanisme internal, yaitu dengan detoksifikasi Al seperti kompartementasi dan eksternal seperti pengikatan Al oleh asam organik seperti asam malat atau asam sitrat, dan pemompaan Al keluar sel. Dengan mengetahui mekanisme tanaman dalam menanggapi cekaman Al dan protein atau enzim yang terlibat dalam proses tersebut, maka gen yang bertanggungjawab terhadap sistem toleransi tanaman dapat diisolasi.

Sama dengan sistem toleransi tanaman terhadap cekaman Al, toleransi tanaman terhadap garam dan kekeringan melibatkan senyawa osmoprotektan seperti prolin, glisin, betain, dan trehalose, dan protein transporter yang terdapat di membran plasma maupun di membran vakuola. Selain itu, enzim yang dapat mendetoksifikasi pengaruh cekaman garam seperti SOD juga berperan penting dalam sistem toleransi tanaman terhadap cekaman garam.

Tanaman yang dapat tumbuh dengan baik pada kondisi lingkungan yang mendapat cekaman abiotik seperti kelarutan Al yang tinggi, kandungan garam yang tinggi, kekeringan, dan asam, dapat dijadikan sebagai sumber gen yang berhubungan dengan toleransi tanaman terhadap cekaman tersebut.

Daftar Pustaka

- Alscher, R.G., N. Erturk, and L.S. Heath. 2002.** Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* 53:1331-1341.
- Anwar, S. 1999.** Pengklonan gen-gen yang diinduksi oleh aluminium pada kedelai (*Glycine max* (L) Merrill). Disertasi. Institut Pertanian Bogor.
- Anwar, S., M. Jusuf, Suharsono, and D. Sopandie. 2000.** Pengklonan gen yang diinduksi oleh aluminium pada kedelai. *J. Bioteknologi Indonesia* 5(1):7-16.
- Basu, A., U. Basu, and G.J. Taylor. 1994.** Introduction of microsomal membrane protein in root of an aluminum resistant cultivar of *Triticum aestivum* L. under condition of aluminum stress. *Plant Physiol.* 104:1007-1013.
- Bray, E.A., J. Bailey-Serres, and E. Weretilnyk. 2000.** Response to abiotic stresses. *In* Buchanan *et al.* (Eds.). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Amer. Soc. Plant Physiol, Rockville, Maryland. p. 1158-1203.
- Bruce, W.B., G.O. Edmeades, and T.C. Barker. 2002.** Review: Molecular and physiological approaches to maize improvement for drought tolerance. *J. Exp. Botany* 53:13-25.
- Cheong, Y.W., H.S. Chang, R. Gupta, X. Wang, T. Zhu, and S. Luan. 2002.** Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 129:661-677.
- Cruz-Ortega, R. and J.D. Ownby. 1993.** A protein similar to PR (pathogen-related) proteins is elicited by metal toxicity in wheat roots. *Plant Physiol.* 89:211-219.
- Delhaize, E., S. Craig, C.D. Beaton, R.J. Bennet, V.C. Jagdish, and P.J. Randall. 1993.** Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol.* 103:685-693.

- Delhaize, E. and P.R. Ryan. 1995.** Aluminum toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiol.* 107:315-321.
- Elfawati. 1999.** Konstruksi pustaka cDNA tanaman kedelai (varietas Yellow Biloxi) yang diinduksi cekaman aluminium menggunakan vektor. Tesis S2. Program Pascasarjana IPB.
- Ermolayev, V. 2003.** Comparison of Al-induced gene expression in sensitive and tolerant soybean cultivars. *J. Exp. Bot.* 54(393):2745-2756.
- Ezaki, B., Y. Yamamoto, and H. Matsumoto. 1995.** Cloning and sequencing of the cDNAs induced by aluminum treatment and Pi starvation in culture tobacco cells. *Physiol. Planta.* 93:11-18.
- Foy, C.D. and A.L. Fleming. 1978.** The physiology of plant tolerance to excess available aluminum and manganese in acid soils. *In Crop Tolerance to Suboptimal Land Conditions.* Jung *et al.* (Eds.). American Soil Science Society of America. p. 302-328.
- Foy, C.D., R.L. Chaney, and M.C. White. 1978.** The physiology of metal toxicity in plants. *Plant Physiol.* 29:511-566.
- Garg, A.K., Kim J-K, 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* 99:15898-15903.
- Gaxiola, R.A., J. Li, S. Undurraga, L.M. Dang, G.J. Allen, S.L. Alper, and G.R. Fink. 2001.** Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:11444-11449.
- Goedert, W.J., E. Labato, and S. Laurenco. 1997.** Nutrient use efficiency in Brazilian acidic soils. Nutrient management efficiency. *In Moniz et al. (Eds.). Plant Soil Interactions and Plant at Low pH.* Brazilian Soil Science Society. p. 97-104.
- Gomez, J.M., A. Jimenes, E. Olmos, and S. Sevilla. 2004.** Location and effect of long-term NaCl stress on superoxide dismutase and ascorbate peroxidase isoenzymes of pea (*Pisum sativum* cv. Puget) chloroplasts. *J. Exp. Bot.* 55:119-130.
- Haug, A. 1984.** Molecular aspects of aluminum toxicity. *CRC Crit Rev. Plant Sci.* 1:345-373.
- Hue, N.V., G.R. Croddock, and F. Adam. 1986.** Effect of organic acids on Al toxicity in subsoil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 50:28-34.
- Jones, D.L. and L.V. Kochian. 1995.** Aluminum inhibition of the inositol 1,4,5-triphosphat signal transduction pathway in wheat roots: A role in aluminum toxicity. *Plant Cell* 7:1913-1922.
- Jusuf, M., Suharsono, and D. Sopandie. 1999.** Molecular biology of soybean tolerance to aluminium stress. Report of Graduate Team Research Grant, Urge Project, Batch II. Directorate General of Higher Education, Jakarta.
- Kasai, M., M. Asaki, K. Yamashita, Y. Yamamoto, and H. Matsumoto. 1995.** Increase of ATP-dependent H⁺ pump activity of tonoplast of barley roots by aluminum stress: Possible involvement of abscisic acid for the regulation. *In Date, R.A. (Ed.). Plant Soil Interactions at Low pH.* Kluwer Acad. Publ. Netherland. p. 341-344.
- Kasim, N. 2000.** Eksudasi dan akumulasi asam organik pada beberapa kedelai (*Glycine max* (L) Merrill) genotipe toleran aluminium. Thesis S2. Program Pascasarjana IPB.
- Lazof, D.B., J.G. Goldsmith, T.W. Ruffy, and R.W. Linton. 1994.** Rapid uptake of leaf ontogeny. *Plant Physiol.* 106:1107-1114.

- Le Van, H., S. Kuraishi, and N. Sakurai. 1994.** Aluminum-induced rapid root inhibition and changes in cell-wall components of squash seedlings. *Plant Physiol.* 106:971-976.
- Matsumoto, H. 1991.** Biochemical mechanism of toxicity of aluminum and the sequestration of aluminum in plant cells. *In Wright et al. (Eds.). Plant-Soil Interactions at Low pH.* Kluwer Academic Publ. Netherland. p. 825-838.
- Moller, T., J.C. Bailar, J. Kleinberg, C.O. Guss, M.E. Castellion, and C. Motz. 1984.** Chemistry With Inorganic Qualitative Analysis. Acid Press, Inc. Orlando.
- Mossor-Pietraszewska, T. 2001.** Effect of aluminum on plant growth and metabolism. *Acta Biochimica Polonica* 48(3):673-686.
- Osaki, M., T. Watanabe, T. Ishizawa, C. Nilnond, T. Nuyim, C. Sittibush, and T. Tadano. 1998.** Nutritional characteristics in leaves of native plants grown in acid sulfate, peat, sandy podzolic, and saline soils distributed in Peninsular Thailand. *Plant Soil* 201:175-182.
- Pellet, D.M., D.L. Grunes, and L.V. Kochian. 1995.** Organic acid exudation as an aluminum-tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L). *Planta* 196:788-795.
- Reimmann, C., C. Ringli, and R. Dudler. 1992.** Complementary DNA cloning and sequence analysis of a pathogen-induced putative peroxidase from rice. *Plant Physiol.* 100:1611-1612.
- Richards, K.D. and R.C. Gardner. 1994.** The effect of aluminium treatment on wheat root: Expression of heat shock, histon and SHH genes. *Plant Physiol.* 98:37-45.
- Richards, K.D., E.J. Schott, Y.K. Sharma, K.R. Davis, and R.C. Gardner. 1998.** Aluminum induced oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 116:409-418.
- Ritter, D., R.D. Allen, N. Trolinder, D.W. Hughes, and G.A. Galau. 1993.** Cotton cotyledone cDNA encoding a peroxidase. *Plant Physiol.* 102:1351-1357.
- Ryan, P.R., T.B. Kinraide, and L.V. Kochian. 1993.** Aluminum toxicity in root: An investigation of spatial sensitivity and role of the root cap. *J. Exp. Bot.* 44(259):437-446.
- Ryan, P.R., T.B. Kinraide, and L.V. Kochian. 1994.** Al^{3+} - Ca^{2+} interaction in aluminum rhizotoxicity. I. Inhibition of root growth is not caused by reduction of calcium uptake. *Planta* 192:98-103.
- Ryan, P.R., E. Delhaize, and P.J. Randall. 1995.** Malat efflux from root apices and tolerance to aluminum are highly correlated in wheat. *Aust. J. Plant Physiol.* 22:531-536.
- Sasaki, T., Y. Yamamoto, B. Ezaki, M. Katsuhara, S.J. Ahn, P.R. Ryan, E. Delhaize, and H. Matsumoto. 2004.** A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. *Plant J.* 37:645-653.
- Sasaki, M., M. Kasai, Y. Yamamoto, and H. Matsumoto. 1995.** Involvement of plasma membrane potential in tolerance mechanism of plant roots to aluminum toxicity. *In Date, R.A. (Ed.). Plants Soil Interactions at Low pH.* Kluwer Acad. Publ. Netherland. p. 285-290.
- Shi, H., M. Ishitani, C. Kim, and Zhu J-K. 2000.** The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encode a putative Na^+/H^+ antiport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:6896-6901.
- Shinozaki, K., K. Yamaguchi-Shinozaki, and M. Seki. 2003.** Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6:410-417.
- Sivaguru, M., B. Ezaki, Z. He, H. Tong, H. Osawa, F. Baluska, D. Volkmann, and H. Matsumoto. 2003.** Aluminum-induced gene expression and protein localization of a cell wall-associated receptor kinase in arabidopsis. *Plant Physiol.* 132:2256-2266.

- Sivaguru, M., H. Fujiwara, J. Samaj, F. Baluska, Z. Yang, H. Osawa, T. Maeda, T. Mori, D. Volkmann, and H. Matsumoto. 2000.** Aluminum-induced 1-3- β -D-glucan inhibits cell-to-cell trafficking of molecules through plasmodesmata. A new mechanism of aluminum toxicity in plant. *Plant Physiol.* 124:991-1005.
- Snowden, K.C. and R.C. Gardner. 1993.** Five genes induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. *Plant Physiol.* 103:855-861.
- Snowden, K.C., K.D. Richards, and R.C. Gardner. 1995.** Aluminum-induced genes. Induction by toxic metals, low cadmium, and wounding and pattern of expression in root tips. *Plant Physiol.* 107:341-348.
- Sopandie, D., M. Jusuf, Hamim, and Supiatno. 1996.** Fisiologi dan genetika daya adaptasi kedelai terhadap cekaman kekeringan dan pH rendah dengan Al tinggi. Laporan Riset Unggulan Terpadu (RUT I).
- Sopandie, D., I. Marzuki, and M. Jusuf. 2003.** Aluminium tolerance in soybean: protein profiles and accumulation of Al in roots. *Hayati.* 10(1):30-33.
- Suharsono. 2002.** Konstruksi pustaka genom kedelai kultivar Slamet. *Hayati* 9:69-70.
- Suharsono dan M. Jusuf. 2003.** Pembuatan pustaka genom tanaman kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill) kultivar Lumut di dalam fage lambda. Seminar Nasional Bioteknologi, Unsoed, 5-6 April 2003.
- Syarifuddin, A. dan Abdurachman A. 1993.** Optimasi pemanfaatan sumber daya lahan berwawasan lingkungan. Prosiding Simposium Penelitian Tanaman Pangan III. Pusat penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan dan Badan Litbang Deptan. Jakarta/Bogor 23-25 Agustus 1993.
- Takahashi, Y. and T. Nagata. 1992.** *parB*: An auxin-regulated gene encoding glutathione S-transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:56-59.
- Taylor, G.J. 1991.** Current views of the aluminium stress response the physiological basis tolerance. *Curr. Top. Biochem. Physiol.* 10:57-93.
- Ulmasov, T., A. Ohmiya, G. Hagen, and T. Guifoyle. 1995.** The soybean GH2/4 gene that encodes a glutathione S-transferase has a promoter that is activated by a wide range of chemical agents. *Plant Physiol.* 108:919-927.
- Van Wambeke, A. 1976.** Formation, distribution and consequence of acid soils in agriculture development. In Wright, M.J. and S.A. Ferrari (Eds.). *Plant Adaptation to Mineral Stress in Problem Soils.* Spec. Publ. Cornell Univ. Agric. Exp. Stn. Ithaca, New York. p. 15-24.
- Vazquez, M.D., C. Poschenreider, I. Corrales, and J. Barcelo. 1999.** Change in apoplastic aluminum during the initial growth response to aluminum by roots of a tolerant maize variety. *Plant Physiol.* 119:435-444.
- Watanabe, T., S. Jansen, and M. Osaki. 2003.** A physiological study of *Melastoma malabathricum*, an aluminum accumulating woody plant. Abstr. Fifth Keele Meeting on Aluminum. February 23-25.
- Watanabe, T. and M. Osaki. 2002.** Role of organic acids in aluminum accumulation and plant growth in *Melastoma malabathricum*. *Tree Physiol.* 22:785-792.
- Watanabe, T., M. Osaki, T. Yoshihara, and T. Tadano. 1998.** Distribution and chemical speciation of aluminum in the Al accumulator plant, *Melastoma malabathricum* L. *Plant Soil* 201:165-173.

- Yuniati, R. 2000.** Pengklonan cDNA tanaman kedelai (*Glycine max* (L) Merrill) varietas Slamet yang diinduksi cekaman aluminium. Tesis S2. Program Pascasarjana IPB.
- Zhang, H-X., J.N. Hodson, J.P. Williams, and E. Blumwald. 2001.** Engineering salt-tolerant Brassica plants: Characterisation of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:12832-12836.
- Zhou, J. and P.B. Goldsbrough. 1994.** Functional homologs of fungal metallothionein genes from *Arabidopsis*. *Plant Cell* 6:875-884.