

BULETIN *AgroBio*

ISSN 0853-9022

Vol. 1, No. 1, 1996

JURNAL TINJAUAN ILMIAH RISET BIOLOGI DAN BIOTEKNOLOGI PERTANIAN



Jamur Patogen Serangga: Potensi, Kendala, dan Strategi
Pengembangannya Sebagai Agen Pengendali
Biologi Wereng Coklat **Tri Puji Priyatno &
M. Kosim Kardin** 1

Kemajuan Teknik Deteksi dan Identifikasi
Pseudomonas solanacearum **Yadi Suryadi &
Muhammad Machmud** 11

Penyakit Hawar Daun Bakteri pada Padi Sawah:
Masalah dan Pemecahannya **Hartini R. Hifni,
Soma Mihardja, Eddy Soetarwo, Yusida, &
M. Kosim Kardin** 18

Rekayasa Genetik untuk Perbaikan Tanaman
Muhammad Herman 24



Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan
Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian

Penerbit

Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan,
(Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian,
Departemen Pertanian)

Alamat Penerbit

Jalan Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111, Indonesia

Alamat Surat Elektronik

borif@indo.net.id & rifcb@indo.net.id

Telepon

+62 (251) 33-7975; 32-3420 [Suara]
+62 (251) 33-8820 [Faksimil]

Kala Terbit

Dua nomor per volume

Penanggung jawab Publikasi

Kepala Balai Penelitian
Bioteknologi Tanaman Pangan

Redaktur Eksekutif

Dr. Imam Prasadja

Redaktur Teknis

Dr. Sutaryo Brotonegoro
Dr. Ida Hanarida Somantri
Dr. Mohammad Iman
Ir. Budi Hari Priyanto
Dr. Muhammad Arifin
Dr. Muhammad Herman

Redaktur Pelaksana

Ir. Sri Purwandhari

Buletin AgroBio (dahulu bernama **Buletin Penelitian**) memuat artikel tinjauan ilmiah hasil riset dalam bidang biologi dan bioteknologi tanaman. Naskah (boleh ditulis dalam bahasa Indonesia atau Inggris) yang diajukan untuk diterbitkan hendaknya belum pernah dipublikasikan pada media cetak mana pun dan ditulis sesuai dengan "Pedoman Bagi Penulis" (lihat sampul belakang bagian dalam). Dewan Redaksi berhak menyunting naskah tanpa mengubah isi dan makna tulisan atau menolak menerbitkan suatu naskah.

Naskah dapat bersifat tinjauan ilmiah (kritis) atau tinjauan informatif (anotasi) terhadap subjek tertentu, atau gabungan antara keduanya. Tinjauan ilmiah merupakan hasil evaluasi, sintesis, dan analisis kritis tentang riset bagi kepentingan ilmu pengetahuan dan teknologi, sedangkan tinjauan informatif merupakan hasil evaluasi bagi kepentingan pengguna.

Isi naskah dapat membahas salah satu dari butir-butir berikut, yaitu: (a) status riset pada subjek tertentu, baik yang telah, sedang, maupun yang akan dikerjakan, (b) pengungkapan masalah dan pemecahannya, (c) pengembangan suatu metode atau konsepsi, dan (d) gagasan dan pendekatan yang dapat dijadikan landasan bagi suatu usulan riset. Sumber bacaan seyogyanya meliputi bahan pustaka terbitan dalam dan luar negeri yang terkini dan relevan.

Keterangan Gambar Sampul Luar (dari atas ke bawah):

- Jagung transgenik (biru), jagung non-transgenik (kuning)
- Infeksi cendawan patogen *Beauveria bassiana* pada walang sangit (*Leptocorsiva varicornis*)
- Penurunan efisiensi pemupukan akibat cekaman lingkungan

Rekayasa Genetik untuk Perbaikan Tanaman

M. Herman

Kelompok Peneliti Biologi Molekuler dan Rekayasa Genetika
Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan

ABSTRACT

Herman, M. 1996. Genetic Engineering for Crop Improvements. Buletin AgriBio 1(1): 24-34. Plant breeders and genetic engineers share the common goal of plant improvement. While plant breeders conventionally use selective breeding for varietal enhancement, genetic engineers continue to develop techniques for the isolation and insertion of genes for desirable traits. Several steps using both cellular and molecular biology techniques are involved in producing a genetically engineered plant. Plant tissue culture is the foundation of plant genetic engineering in higher plants. The capacity to transform plants with desired genes is determined by the ability to efficiently regenerate them from transformed cells or tissues. Several commonly used methods for the transfer of DNA are *Agrobacterium* mediated genetic transformation or introduced to the plants directly through either the use of particle bombardment or the use of electroporation. Several genes of use for crop improvements through genetic engineering are genes for resistance to biotic and abiotic stress: Bt and proteinase inhibitor genes (insect resistance); chitinase gene (fungi resistance); phosphinothricin acetyl transferase gene (herbicide resistance); metallothionein-II (heavy metal). Modified product quality genes are chalcone synthase gene (flower pigments) and polygalacturonase gene (delayed fruit ripening).

KEY WORDS

Crops improvement, genetic engineering, gene transfer, transformation.

Dalam perbaikan tanaman, pemulia dan perekayasa genetik mempunyai tujuan yang sama. Sebagai bahan dasar perbaikan tanaman, pemulia menggantungkan diri kepada adanya variasi. Tiga sumber variasi yang digunakan dalam pemuliaan tanaman konvensional adalah (a) segregasi dan rekombinasi setelah hibridisasi, (b) mutagenesis secara kimiawi dan fisika, dan (c) koleksi plasma nutfah dari varietas dan spesies kerabat luar (5). Pemulia tanaman secara konvensional melakukan persilangan dan atau seleksi, sedangkan perekayasa genetik mengembangkan secara terus menerus dan memanfaatkan teknik isolasi dan penyisipan gen dari sifat yang diinginkan.

Kehadiran teknologi transformasi memberikan wahana baru

bagi pemulia tanaman untuk memperoleh kelompok gen baru yang lebih luas. Suatu gen yang tidak terdapat pada suatu spesies tanaman tertentu dimungkinkan untuk dapat diperoleh dari organisme lain, seperti bakteri, virus, binatang, dan tanaman lain (Tabel 1) dan dipindahkan ke tanaman. Gen yang diperoleh dengan jalan sintesis secara kimia juga berhasil ditransformasikan ke tanaman (5, 28, 64). Hal ini menggambarkan kekuatan dari rekayasa genetik dalam memperlebar lingkup atau kisaran pemindahan gen di luar jangkauan pemuliaan konvensional. Teknik rekayasa genetik dapat digunakan sebagai mitra dan pelengkap teknik pemulia tanaman yang sudah mapan dan telah digunakan dengan sukses selama bertahun-tahun.

Tanaman, binatang dan mikroorganisme dapat berfungsi ganda,

baik sebagai sumber maupun penerima dari gen asing. Beberapa contoh gen yang dapat dimanfaatkan untuk perbaikan tanaman melalui rekayasa genetik ialah gen ketahanan terhadap cekaman lingkungan biotik atau abiotik, dan gen untuk memodifikasi kualitas dari suatu produk tanaman (Tabel 1). Beberapa gen tersebut adalah gen *Bt* dan *proteinase inhibitor* (tahan hama serangga), gen *viral coat protein* (tahan virus), gen *chitinase* (tahan cendawan), gen *phosphinothricin acetyl transferase* (tahan herbisida), gen *metallothionein-II* (tahan logam berat), gen *Mn-superoxide disintase* (oksidasi), gen *dihydropicolinate synthase* (perubahan komposisi asam amino), gen *chalcone synthase* (perubahan pigmen bunga), dan gen *polygalacturonase* (penundaan pemasakan buah).

Contoh kesuksesan proyek rekayasa genetik pada tanaman dapat dilihat pada banyaknya jumlah usulan untuk pengujian tanaman transgenik di lapangan. Antara tahun 1987-1991, Departemen Pertanian Amerika Serikat (USDA) telah menerima lebih 100 usulan. Sebagian besar dari usulan tersebut adalah percobaan untuk pengujian peningkatan ketahanan terhadap cekaman biotik dan abiotik (Tabel 2). Sebagian percobaan yang lain ditujukan untuk perubahan kualitas dari suatu produk tanaman.

TAHAPAN REKAYASA GENETIK

Produksi tanaman transgenik melibatkan beberapa tahap dalam teknik biologi molekuler dan seluler. Suatu sifat yang diinginkan harus dipilih dan gen yang mengandung sifat tersebut harus diidentifikasi. Seandainya gen tersebut belum tersedia dalam klon (*clone*) maka harus diisolasi dari organisme donor. Supaya gen tersebut

dapat berfungsi maka dia harus dimodifikasi secara molekuler, yaitu harus mengandung daerah pengaturan (*regulatory region*), sehingga dapat diekspresikan pada tanaman dengan tepat dan benar (5, 64). Gen yang sudah diisolasi harus dikonstruksi dalam suatu vektor plasmid untuk dipindahkan ke tanaman secara langsung melalui *particle bombardment* atau tidak langsung dengan media vektor *Agrobacterium*.

Untuk keberhasilan suatu transformasi, rangkaian gen yang diintroduksi ke tanaman harus dapat disisipkan ke genom tanaman, diekspresikan, dan tetap terpelihara dalam seluruh, proses pembelahan sel berikutnya. Pada tahap terakhir, sel atau jaringan tanaman yang ditransformasi harus dapat diregenerasi menjadi suatu tanaman. Regenerasi tanaman dapat dilakukan baik secara organogenesis (68) atau embriogenesis (58, 67). Regenerasi tanaman yang berasal dari berbagai *explant* menghasilkan embrio somatik atau tunas liar. Produksi struktur seperti embrio dari sel somatik disebut embriogenesis somatik. Embrio somatik dapat terjadi dengan dua jalan yang berbeda, yaitu secara tidak langsung (sesudah suatu tipe dari kultur kalus) atau langsung (tanpa mengalami fase pertumbuhan kalus). Organogenesis dapat didefinisikan sebagai transformasi dari sel tunggal kalus, atau jaringan menjadi struktur seperti *organ*. Di antara tahapan tersebut di atas umumnya regenerasi tanaman merupakan tahap yang paling sulit dicapai.

Tanaman transgenik perlu dikarakterisasi secara molekuler untuk mengkonfirmasi integritas gen yang diintroduksi dan menentukan jumlah kopinya di dalam genom tanaman. Selain itu, tanaman tersebut juga perlu dikarakterisasi secara biokimia untuk menentukan apakah gen tersebut berfungsi

dengan benar. Setelah tahap-tahap biologi seluler dan molekuler dilalui, tanaman transgenik perlu dikarakterisasi sifat-sifat yang diinginkan di laboratorium dan rumah kaca. Untuk mengetahui apakah sifat tanaman tersebut dapat diturunkan atau tidak, cukup menguji generasi lanjutannya. Sebelum tanaman transgenik

dilepas, perlu diadakan suatu uji di lapang.

TEKNIK PEMINDAHAN GEN

Dalam sistem transformasi, biasanya gen yang akan dipindah ke tanaman diklon terlebih dahulu dalam vektor plasmid yang dapat

Tabel 1 Gen untuk perbaikan tanaman

Sifat yang diinginkan	Gen	Sumber gen
Tahan herbisida	<i>bar</i> PAT <i>aro</i> EPSP synthase	Bakteri Bakteri, tanaman
Cekaman biotik		
• Tahan bakteri	<i>Cecropin</i> <i>Apidaecin</i> <i>Thionin</i>	Binatang Binatang Tanaman
• Tahan cendawan	<i>Chitinase</i> <i>Ribosome inactivating protein</i>	Tanaman Tanaman
• Tahan serangga	<i>Bt cry</i> 1A(b) <i>Bt cry</i> 1A(c) <i>Trypsin inhibitor</i> <i>Proteinase inhibitor</i>	Bakteri, synthetic Bakteri, synthetic Tanaman Tanaman
• Tahan virus	<i>Coat protein</i> <i>TMV replicase protein</i> <i>Satellite RNA</i> <i>RNA binding protein</i>	Virus Virus Virus Virus
Cekaman abiotik		
• Logam berat	<i>Metallothionein</i> II	Binatang
• Salinitas	<i>1-phosphate dehydrogenase</i>	Binatang
• Beku	<i>Fish antifreeze protein</i>	Bakteri
• Oksidasi	<i>Mn-super-oxide dismutase</i>	Tanaman
Modifikasi kualitas produk		
• Komposisi asam lemak	<i>ACP thioesterase</i>	Tanaman
• Komposisi asam amino	<i>Methionine rich protein</i> <i>Dihydropicolinate synthase</i>	Tanaman Bakteri
• Komposisi zat tepung umbi	GBSS	Tanaman
• Penundaan pemasakan buah	<i>Polygalacturonase</i> <i>ACC oxidase</i> <i>ACC synthase</i> <i>ACC deaminase</i>	Tanaman,<

memperbanyak diri dalam *Agrobacterium tumefaciens* atau *Escherichia coli*. Gen tersebut digabungkan dengan *promoter*, seperti *promoter* CaMV 35S untuk tanaman dikotil dan *promoter* rice Act 1 untuk tanaman monokotil (38), yang dapat diekspresikan dalam tanaman dan dirangsang dengan *terminator* yang tepat. Dengan demikian, transkrip mRNA dapat diangkut dari inti sel ke sitoplasma untuk proses translasi (5).

Plasmid yang digunakan untuk transformasi tanaman tidak hanya mengandung gen dari sifat yang diinginkan tetapi juga gen markah untuk seleksi, seperti gen ketahanan terhadap herbisida atau antibiotik (Gambar 1). Gen markah tersebut akan memudahkan seleksi sel atau jaringan yang tertransformasi. Seandainya gen yang diinginkan dan markah seleksi terletak dalam dua plasmid yang berbeda maka perlu dilakukan co-transformasi, yaitu memindahkan dua plasmid ke tanaman secara simultan (34, 42). Setelah proses pemindahan gen, sebelum regenerasi tanaman eksplan dipindahkan ke medium seleksi untuk mengidentifikasi *transformants*.

Vektor *Agrobacterium*

Dari banyak teknik pemindahan gen yang berkembang beberapa tahun terakhir ini, teknik melalui media vektor *A. tumefaciens* merupakan teknik yang paling sering digunakan untuk mentransformasi tanaman dikotil. *A. tumefaciens* mampu memindahkan gen ke dalam genom tanaman melalui eksplan baik yang berupa potongan daun (*leaf discs*) atau bagian lain dari jaringan tanaman yang mempunyai potensi beregenerasi tinggi (25, 41). Gen yang dipindah terletak pada plasmid Ti (*tumor inducing*). Segmen spesifik dari DNA plasmid Ti disebut DNA T

Tabel 2. Permohonan pengujian lapang tanaman transgenik ke USDA tahun 1987-1991 (Bennett (5)).

Tanaman transgenik	Sifat yang diinginkan					
	Kualitas produk	Tahan bakteri	beku	fungi	herbisida	serangga virus
Alfalfa						+
Jagung	+				+	+
Kapas					+	+
Kedelai					+	
Kentang	+	+			+	+
Melon						+
Padi	+				+	+
Tembakau	+				+	+
Tomat	+		+	+	+	+

(*transfer DNA*) yang berpindah dari bakteri ke inti sel tanaman dan berintegrasi ke dalam genom tanaman (5, 66). Karena *A. tumefaciens* merupakan patogen tanaman maka *Agrobacterium* sebagai vektor yang digunakan untuk transformasi tanaman adalah bakteri dari jenis plasmid Ti yang dihilangkan virulensinya (*disarmed*). Sehingga sel tanaman yang ditransformasi oleh *Agrobacterium* dan yang mampu beregenerasi akan membentuk suatu tanaman sehat hasil rekayasa genetika. Tanaman tersebut akan menurunkan DNA T yang *disarmed* dan gen asing (dari sifat yang diinginkan) ke keturunannya (12). Teknik transformasi melalui media vektor *Agrobacterium* pada tanaman dikotil telah mantap dan berhasil dengan baik tetapi sebaliknya tidak umum digunakan pada tanaman monokotil (45). Meskipun demikian beberapa peneliti (12, 47, 51)

melaporkan bahwa beberapa *strain Agrobacterium* berhasil mentransformasi tanaman monokotil seperti jagung dan padi.

Elektroporasi

Metode pemindahan DNA yang umum digunakan pada tanaman monokotil adalah elektroporasi dari protoplas (2), perlakuan *polyethylene glycol* (PEG) pada protoplas (35), dan kombinasi antara dua perlakuan tersebut di atas. PEG memudahkan presipitasi dari DNA dan membuat

dalam protoplas. Integritas membran membaik kembali (seperti semula) dalam beberapa detik sampai semenit setelah perlakuan listrik (28). Jagung dan padi telah berhasil dengan sukses ditransformasi melalui elektroporasi dengan efisiensi antara 0,1-1%. Kelemahan dari penggunaan protoplas sebagai eksplan untuk transformasi adalah sulitnya regenerasi dari protoplas, dan sangat rumit dan variasi somaklonal akibat panjangnya periode kultur (64).

Penembakan Partikel

Saat ini, teknik paling modern dalam transformasi tanaman adalah penggunaan metode penembakan partikel (*particle bombardment*) atau *Biolistic* (33, 37, 62). Metode pemindahan gen ini dijalankan secara fisik dengan menembakkan partikel yang dilapisi DNA (*microprojectile*) langsung ke sel atau jaringan tanaman. Dengan cara demikian, partikel dan DNA yang ditembakkan menembus dinding sel dan membran, kemudian DNA melarut dan menyebar dalam sel secara bebas (50). Telah didemonstrasikan bahwa teknik ini efektif untuk memindahkan gen pada bermacam-macam eksplan. Penembakan partikel mempermudah produksi tanaman transgenik dari berbagai spesies yang sebelumnya sukar ditransformasi dengan *Agrobacterium*, khususnya tanaman monokotil seperti padi, jagung, dan rumput gambut (*turfgrass*) (33, 58, 69).

Karbit Silikon

Metode pemindahan gen lain yang kurang umum digunakan dalam transformasi tanaman tetapi telah dilaporkan berhasil mentransformasi jagung, dan rumput gambut adalah penggunaan karbit

silikon (*silicon carbide*) (2, 30). Suspensi sel tanaman yang akan ditransformasi dicampur dengan serat karbit silikon dan DNA plasmid dari gen yang diinginkan dimasukkan kedalam tabung Eppendorf kemudian dilakukan pemusingan dengan *vortex*. Serat karbit silikon berfungsi sebagai jarum injeksi mikro (*microinjection*) untuk memudahkan pemindahan DNA ke dalam sel tanaman.

USAHA PERBAIKAN TANAMAN

Tahan Herbisida

Gulma dapat mengurangi hasil tanaman sampai 20% (26). Di negara maju seperti Amerika Serikat (AS) penggunaan herbisida sebagai bahan pemberantas gulma sudah sangat intensif, karena kerugian yang diakibatkan oleh gulma setahun mencapai 3-4 miliar dolar AS. Dengan perkembangan teknologi DNA rekombinan yang makin maju, para peneliti mulai mencoba memproduksi tanaman tahan herbisida melalui rekayasa genetik yaitu dengan mengintroduksi gen asing yang dapat menghilangkan pengaruh racun herbisida (36).

Gen *bar* mengandung kode untuk *phosphinotricin acetyl transferase* (PAT) diisolasi dari *Streptomyces hygroscopicus*. Gen *bar* selain digunakan sebagai gen marker untuk menyeleksi sel atau jaringan yang tertransformasi juga digunakan untuk diintroduksi ke tanaman supaya tahan herbisida (26). Kentang, tembakau, dan tomat transgenik yang mengandung gen *bar* dengan promoter CaMV 35 S dapat mentolerir herbisida dengan dosis 4-10 kali lebih besar daripada dosis normal di lapangan (26). Pendekatan alternatif adalah mengintroduksi *aro* gen yang mengandung kode 5-*enolpyruvylshikimate-3-phosphate*

synthase (EPSPS) yang toleran terhadap herbisida *glyphosate* (16). EPSPS adalah hasil isolasi dari bakteri *Klebsiella pneumoniae*. Mutan EPSPS toleran *glyphosate* telah diisolasi dari *Salmonella typhimurium* dan dipetakan pada lokus *aroA* EPSPS (13). Enzim mutan tersebut menunjukkan ketahanan terhadap *glyphosate* sampai 2 kali lipat sewaktu *aroA* gen diklonkan di *E. coli* maka *E. coli* yang telah mengalami transformasi mampu hidup dan tumbuh pada media dengan *glyphosate* 200 mg/ml. Melalui vektor *Agrobacterium* gen *aroA* telah memproduksi tembakau yang hasilnya menunjukkan bahwa tembakau transgenik dapat tumbuh 70% pada 20 hari setelah penyemprotan *glyphosate* dengan dosis 0,5 kg/ha dibandingkan hanya 10% tanaman kontrol (bukan transgenik) (13).

Ketahanan terhadap Cekaman Biotik

BAKTERI. Meskipun belum ada tanaman transgenik yang menunjukkan adanya ketahanan terhadap patogen bakteri, tetapi langkah pertama yang sukses menuju ke arah ketahanan terhadap bakteri di dalam tanaman sudah dirintis. Peptida

dari 28 residu asam amino. Pep-tida anti bakteri ini telah dide-monstrasikan berhasil dengan ba-ik melawan lima bakteri dalam tubuh serangga madu *Apis mel-lifera*. Produksi tanaman yang mengandung *cecropin* dan *apeda-ecin* sedang dalam proses pene-litian. Kelompok II dari protein anti bakteri tersebut adalah *thio-nin*. Protein dasar ini terdiri dari 45-50 residu asam amino yang pertama kalinya diisolasi dari *en-dosperm* tanaman sereal (go-longan gramineae) yang berfungsi sebagai penyebab terhambatnya pertumbuhan yeast untuk fermen-tasi. *Thionin* tersebut telah di eksploitasi oleh para ahli biologi molekuler tanaman sebagai bahan transformasi (20).

Semua kelompok peptida di atas menunjukkan toksisitas terha-dap penyakit busuk cincin (*Clavi-bacter michiganense*) dan penyakit bercak daun pada tomat (*Xantho-monas campestris*). Patogen ta-naman seperti *Erwinia* dan *Pseu-domonas* juga peka terhadap peptida-peptida tersebut (9).

CENDAWAN. Banyak tanaman, bina-tang, dan mikroorganisme yang menghasilkan protein yang beracun terhadap cendawan. Gen da-ri protein tersebut telah berhasil diklon dan dipergunakan dalam transformasi tanaman untuk me-ningkatkan ketahanan terhadap cendawan. Ada dua gen yang di-gunakan untuk memproduksi ta-naman transgenik, yaitu *chitinase* yang berasal dari tanaman ka-cang-kacangan dan *ribosome in-activating protein* (RIP) yang diiso-lasi dari barley.

Brogie *et al.* (8) menemukan bahwa bibit tembakau hasil trans-formasi dengan gen *chitinase* ma-sih dapat hidup pada tanah yang diinfeksi *Rhizoctonia solani* de-ngan tingkat inokulum yang tinggi dibandingkan dengan tanaman yang bukan transgenik. Hal terse-

but disebabkan oleh *chitinase* yang bekerja sebagai perusak *chi-tin* yang berfungsi sebagai bahan penguat dinding sel cendawan (52). Gen *chitinase* tidak berfungsi baik jika diperlakukan terhadap *Pythium aphanidera-metum* kare-na dinding sel patogen tersebut mengandung *chitin* sedikit sekali (9). Tanaman canola (*Brassica napus*) transgenik yang mengan-dung gen *chitinase* juga menun-jukkan ketahanan terhadap *R. solani* (8).

Tembakau yang ditransforma-si dengan RIP dapat menghambat pertumbuhan *R. solani*. Dalam studi *in vitro* kombinasi perlakuan ganda antara RIP dan *chitinase* ternyata dapat menghambat per-tumbuhan *Tricoderma reesei* dan *Fusarium sporotrichioides* secara sinergistik dibandingkan perlaku-an tunggal (9). Akan sangat mena-rik untuk diketahui apakah kalau dua gen (RIP dan *chitinase*) di transformasikan secara bersama-an ke tanaman akan mempunyai efek ketahanan sinergistik terha-dap *R. solani*.

SERANGGA. Di negara yang beriklim tropis dan lembab, salah satu ken-dala dalam produksi suatu komo-ditas tanaman adalah gangguan serangga hama. Bahkan pada ta-naman tertentu masih merupakan kendala utama. Kerugian akibat kerusakan yang ditimbulkannya bisa mencapai beberapa juta dolar AS. Usaha pengendalian yang bi-asa dilakukan petani adalah pena-naman varietas tahan atau pe-nyemprotan insektisida.

Di negara maju, seperti Ameri-ka Serikat petani sudah menggu-nakan insektida hayati yang ber-asal dari bakteri *Bacillus thurengi-ensis* (*Bt*) selama lebih dari 30 ta-hun. Dalam pembetukan spora-nya, bakteri memproduksi protein kristal yang dapat meracuni dan membunuh larva dari beberapa

serangga. Kristal protein ini tidak berbahaya bagi serangga yang bu-kan sasaran dan binatang lain dari golongan vertebrata. Sayangnya, secara komersial produksinya ter-batas dan pengaruh perlingdungan-nya berumur pendek.

Perkembangan terakhir dari kemajuan teknologi DNA rekombi-nan, khususnya teknik rekayasa genetik telah membuka peluang dan kemungkinan untuk men-transformasi tanaman dengan gen asing dari organisme

dung kode gen tunggal, seperti *Bt endotoxins* (11), *proteinase inhibitor* (2949), *cowpea trypsin inhibitor* (27), *pea seed lectin* (17), dan *chitinase* (10, 23). Sebab protein dengan kode gen tunggal lebih mudah diintroduksi ke dalam tanaman. Supaya fungsi dari gen penghambat tersebut efektif, harus diekspresikan di jaringan tanaman pada bagian yang diserang. Protein penghambat mengganggu sistem pencernaan makanan serangga.

Dari penelitian-penelitian yang ada, umumnya tanaman tahan serangga yang berhasil ditransformasi adalah berasal dari gen *cry Bt* yang bersifat meracuni hama serangga dari kelompok Coleoptera atau Lepidoptera (3, 11, 15, 43, 63, 65). Racun *Bt* akan melekat pada *epithelial glycoprotein* dalam usus serangga khususnya pada usus tengah. Keadaan tersebut akan menyebabkan bocornya usus sehingga cairan yang ada akan merembes ke luar ke daerah antara usus dan *hemocoel* dan mengakibatkan matinya serangga (23).

Akhir-akhir ini hasil penelitian menunjukkan bahwa gen *cry Bt* tipe liar (*wild type*) yang ditransformasi ke tanaman ternyata berekspresikan ketahanan yang rendah terhadap serangga (11). Penggunaan *codon* dari gen *cry Bt* (yang diisolasi dari bakteri) dikelabui oleh keharusan untuk mengekspresi dalam sel bakteri sehingga tidak optimum untuk diekspresikan dalam sel tanaman (11). Cara yang dilakukan dalam pemecahan kendala tersebut adalah dengan mensintesis urutan (*sequence*) gen secara kimiawi untuk menghilangkan banyaknya motif urutan *adenin thymine* (AT)-rich. Banyaknya urutan (AT) inilah yang menyebabkan tidak stabilnya mRNA dari tanaman transgenik. Hasil percobaan tanaman transgenik dengan gen *Bt* sintesis menunjukkan peningkatan ekspresi

keefektifan ketahanan terhadap serangga antara 10 hingga 100 kali (44).

Kelompok yang lain dari gen tahan serangga adalah *proteinase inhibitor*. Pada tembakau transgenik yang diintroduksi gen *serine proteinase inhibitor* yang diperoleh dari *cowpea* menunjukkan ketahanan terhadap hama *Heliothis virescens* (10). Gen *proteinase inhibitor* II (yang diperoleh dari kentang) yang diintroduksi ke tembakau telah meningkatkan ketahanan tanaman transgenik terhadap serangga *Manduca sexta* (29). Gen lain yang ditransformasikan pada tembakau untuk memperoleh ketahanan terhadap *Helicoverpa zea* adalah *cowpea trypsin inhibitor* (27).

VIRUS. Virus tanaman masih merupakan masalah serius bagi banyak tanaman pertanian. Penyakit yang disebabkan oleh infeksi virus dapat mengurangi tingkat pertumbuhan dan hasil tanaman baik secara kuantitas maupun kualitas. Telah lama diketahui bahwa tanaman dapat dilindungi terhadap serangan *strain* virulen dari virus tertentu dengan menginfeksi tanaman sebelumnya dengan *strain* yang sudah dilemahkan dari virus yang sama atau dari kerabatnya. Fenomena tersebut dikenal dengan sebutan proteksi silang. Meskipun mekanisme proteksi silang tidak diketahui seluruhnya, tetapi diduga bahwa protein selubung (*coat protein*) adalah yang bertanggung jawab atas pengaruh proteksi. Ahli biologi molekuler tanaman mencoba mengkloning cDNA dari protein virus tanaman untuk keperluan penelitian fenomena proteksi silang lebih lanjut dan rinci (22). Ketahanan terhadap infeksi virus dapat diperoleh melalui rekayasa genetik tanaman dengan mengintroduksi gen asing (4).

Pada kasus virus benang (*strand*) RNA positif, pengaruh proteksi yang mirip dengan proteksi silang dapat dijumpai pada tanaman transgenik yang ditransformasi dengan gen protein selubung virus (31, 46). Gen yang digunakan dalam tipe transformasi tersebut adalah benang ganda cDNA yang berasal dari RNA virus. Tingkat ekspresi yang tinggi dari selubung protein sangat diperlukan untuk memperoleh pengaruh proteksi silang dalam tanaman transgenik (22). Telah diperoleh tanaman tahan virus hasil rekayasa genetik melalui *Agrobacterium* dari virus RNA benang negatif atau yang lebih dikenal sebagai gen *RNA-binding protein*. Metode proteksi silang pada tanaman transgenik telah dikembangkan melalui transformasi dengan DNA benang ganda yang diperoleh dari satelit RNA (39). Tembakau transgenik yang mengandung cDNA dengan kode *TMV protein replicase* merupakan tanaman tahan TMV yang dihasilkan lewat transformasi dengan *Agrobacterium* (18). Selain tembakau, tanaman lain yang tahan virus hasil rekayasa genetik adalah tomat tahan virus *golden mosaic*, kentang tahan virus X dan Y, dan alfalfa tahan virus *alfalfa mosaic* (14, 22, 24, 31).

Ketahanan terhadap Cekaman Abiotik

LOGAM

sedangkan bibit kontrol menunjukkan penghambatan yang serius pada pertumbuhan akar, tunas, dan daun menjadi klorosis.

SALINITAS. Telah ditemukan bahwa banyak substansi dengan berat molekul rendah berfungsi melindungi cekaman salinitas yang berakumulasi di dalam sel organisme hidup (20). Kasus pada tanaman, berbagai spesies mengakumulasi *glycine betaine*, *proline*, dan gula alkohol seperti *mannitol* dan *sorbitol*. Gen *E. coli* yang mengandung kode *mannitol-1-phosphate dehydrogenase* dengan promoter CaMV 35 S dan terminator *nos* telah diintroduksi ke tanaman tembakau. Dalam *E. coli* fungsi utama dari enzim yang reversibel tersebut adalah mengoksidasi *mannitol-1-phosphate* menjadi *fructose-6-phosphate*. Di dalam tanaman transgenik tembakau, rangkaian reaksi tersebut berlangsung sebaliknya dengan kelebihan *fructose-6-phosphate*, *mannitol-1-phosphate* dihidrolisis oleh *phosphatase* yang tidak spesifik, dan *mannitol* berakumulasi lebih dari 6 $\mu\text{mol/g}$ berat basah. Apabila tanaman tembakau transgenik dibandingkan dengan tembakau kontrol dalam hal toleransi terhadap 25 mM NaCl, maka akumulasi *mannitol* secara nyata dapat melindungi tanaman transgenik dewasa sampai pembungaan dan pembentukan biji. Tanaman kontrol mati sebelum pembungaan (20).

PEMBEKUAN. Di daerah yang beriklim dingin, banyak buah-buahan dan sayur-sayuran yang mengalami kerusakan hebat apabila keadaan udara yang membeku selama satu malam. Pemecahan masalah dilakukan dengan rekayasa genetika untuk memperoleh tanaman tembakau yang toleran terhadap pembekuan, yaitu dengan mengintroduksi gen yang mengan-

dung kode protein *alanine-rich anti freeze* yang berasal dari ikan (20). Meskipun protein dari golongan tersebut belum dapat didekati dalam tanaman, peranan dan kegiatannya dalam ikan telah mapan dan banyak dilaporkan. Protein tersebut dapat menekan titik beku air sehingga mengurangi kemungkinan terjadinya kerusakan sel. Protein tersebut telah dapat diekspresikan dalam tanaman tembakau, tetapi apakah dapat berfungsi untuk menekan titik beku air di dalam jaringan tanaman dan menghindari pembentukan es belum ada yang melaporkan.

OKSIDASI. Oksigen yang dihasilkan lewat fotosintesis dapat berkurang dalam sel tanaman dan menjadi bahan kimia sangat beracun yang dikenal secara kolektif sebagai spesies oksigen aktif. *Hydrogen peroxide*, *radikal hydroxyl*, dan *superoxide* adalah contoh dari kelompok oksigen tersebut. Secara alami dalam tanaman telah berkembang suatu mekanisme enzimatis (*catalase*, *peroxidase*, dan *superoxide dismutase*) untuk menangani molekul tersebut. Enzim-enzim itu dapat diproduksi pada berbagai cekaman lingkungan, seperti herbisida, polusi gas (SO_2 dan SO_3), racun cendawan tertentu, dan intensitas sinar yang tinggi. Fungsi mereka ialah menahan pemindahan elektron untuk fotosintesis pada intensitas sinar sedang sampai tinggi. Bowler *et al.* (6) menemukan bahwa tanaman tembakau yang ditransformasi dengan gen Mn-SOD (*superoxide dismutase*) dan promoter CaMV 35 S dapat toleran terhadap oksigen aktif. Hal ini dimungkinkan karena protein tersebut efektif pada penurunan cekaman oksidasi, sebab dia mengubah kuantitas *anion superoxide* menjadi *hydrogen peroxide*.

Modifikasi Kualitas Produk

PERUBAHAN KOMPOSISI ASAM LEMAK.

Gen *acyl-carrier protein thioesterase* (ACPT) yang berasal dari tanaman *oilseed California bay* (*Umbellularia californica*) telah ditransfer ke tanaman *Arabidopsis* (20). Hal ini ditujukan untuk mengubah sintesis rantai asam lemak dari molekul C_{16} atau C_{18} menjadi C_{12} laurate. Untuk menjamin *thioesterase* bekerja aktif di dalam biji *Arabidopsis* pada saatnya memproduksi *triacyl glycerol*, maka gen ACPT digabungkan dengan promoter dari gen *napin*. *Napin* adalah protein *seed storage* dari *Brassica napus*. Tanaman transgenik hasil transformasi menunjukkan adanya produksi biji yang mengandung C_{12} laurate sebagai suatu bagian besar dari asam lemak dalam *triacyl glycerol*.

PERUBAHAN KUANTITAS ASAM AMINO.

Protein yang terkandung dalam biji umumnya terdiri dari jumlah yang terbatas asam amino yang tersusun dalam unit struktur yang terulang (56). Dari jumlah tersebut sering kekurangan

posisi asam amino dalam protein biji sehingga dapat mengandung spektrum asam amino yang lebih baik. Penelitian Altenbach *et al.* (1) yang menggunakan gen *chimeric* yang mengandung kode *methionine rich seed protein* dari kacang Brasil untuk meningkatkan 30% kandungan methionine dari protein biji tembakau. Sedang penelitian lain (54) menunjukkan bahwa kandungan *lysine* dari tanaman tembakau telah ditingkatkan jumlahnya dengan diekspresikannya *bacterial dihydropicolinate synthase* dalam kloroplas. *Dihydropicolinate synthase* adalah enzim pertama dari *biosynthetic pathway lysine*.

PENUNDAAN KEMASAKAN BUAH PADA TOMAT. *Polygalacturonase* adalah satu dari beberapa enzim kunci (penting) dalam proses pelunakan selama kemasakan buah (21). Schuch *et al.* (53) mendemonstrasikan bahwa pendekatan dengan gen *antisense* dapat merendahkan tingkat *polygalacturonase* dalam buah tomat transgenik dan dapat memperpanjang waktu penyimpanan tanpa terjadinya pelunakan buah.

Kramer *et al.* (32) juga menggunakan pendekatan gen *antisense* untuk menunda pelunakan buah tomat. Tetapi dalam kasus mereka, konstruk *antisense* yang digunakan menghasilkan RNA yang berkomplemen dengan mRNA yang mengandung kode *1-aminocyclopropane 1-carboxylate (ACC)* oksidase, yaitu enzim yang bertanggung jawab dalam proses oksidasi ACC menjadi *ethylene*. Telah diketahui bahwa *ethylene* merupakan hormon tanaman yang mengatur kemasakan buah. Dalam studinya, mereka berhasil merendahkan tingkat *ethylene* dalam kemasakan buah tomat sampai 99,5% dengan menggunakan kerangka *antisense* dari gen yang mengandung kode ACC *synthase*.

Pendekatan *antisense* telah digunakan oleh Van de Krol *et al.* (61) untuk mengubah pola pigmentasi bunga petunia. Kerangka tersebut mengandung orientasi terbalik dari gen *chalcone synthase*, satu dari enzim awal dalam proses produksi *flavonoids* dari *phenylalanine*. Penelitian lain (40) mengintroduksi gen dari jagung ke petunia. Gen tersebut mengandung kode enzim yang bertanggung jawab dalam *pathway* produksi *anthocyanin*, yaitu pigmen yang mewarnai biji jagung menjadi ungu. CDNA dipindahkan melalui transformasi protoplas ke *variant* petunia yang berwarna merah muda sebab mengandung mutasi dalam salah satu dari gen pigmennya. Dari 15 tanaman yang beregenerasi, dua tanaman berbunga dengan warna merah bata menyeluruh atau merata. Sedangkan empat tanaman berbunga warna merah bata berkelompok-kelompok. Analisa Northern pada RNA tanaman transgenik menunjukkan bahwa gen jagung benar-benar telah diekspresikan.

KESIMPULAN

Keterbatasan rekayasa genetik:

1. Jumlah gen yang diisolasi dan yang sifat-sifat agronomisnya menguntungkan masih sangat terbatas.
2. Pengetahuan kita tentang regulasi dari ekspresi gen masih terbatas.
3. Metode kultur jaringan untuk regenerasi tanaman masih belum mencukupi.
4. Introduksi sesuatu gen ke dalam tanaman hasilnya tidak selalu dapat diduga.

Potensi rekayasa genetik:

1. Isolasi dari gen yang mengandung sifat tertentu dapat dilan-

kukan hanya dalam tabung reaksi.

2. Melengkapi gen yang diisolasi dengan tanda regulasi khusus yang dikenali oleh zat-zat molekuler tanaman yang berfungsi untuk proses transkripsi dan translasi.
3. Gen yang telah dimodifikasi dapat diintroduksikan ke dalam sel tanaman.
4. Sel tanaman transgenik dapat diregenerasi menjadi tanaman dewasa dan fertil.
5. Rekayasa genetik membuka kemungkinan introduksi sifat baru ke varietas yang sudah ada.
6. Rekayasa genetik tidak mengenal batasan spesies, artinya gen-gen penting dari organisme apapun dapat digunakan untuk perbaikan sifat tanaman

Karena mahal dan sulitnya teknologi rekayasa genetik, dan sulitnya memperoleh kerangka gen dari sifat yang diinginkan maka perlu adanya:

1. Pembinaan tenaga usia muda dalam bidang kultur

2. Asano, Y., Y. Otsuki, and R. L. Mee-usun. 1991. Insect control with genetically engineered crops. *Tibtech* 9: 197-200.
3. Barton, K. A., H. R. Whiteley and N. S. Yang. 1987. *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to Lepidopteran insects. *Plant Physiol.* 85: 1103-1109.
4. Beachy, R. N. 1990. Plant transformation to confer resistance against virus infection, p. 305-311. In J. P. Gustafson (ed.), *Gene manipulation in plant improvement*. Plenum Press. New York. N.Y.
5. Bennet, J. 1993. Genes for crop improvements. *Genetic engineering* 16: 93-113.
6. Bowler, C., L. Slooten, S. Vander-branden, R. De rycke, J. Botterman, C. Sybesma, M. Van Montagu, and D. Inze. 1991. Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. *EMBO J.* 10: 1723-1729.
7. Broglie, K. E., I. Chet, M. Holiday, R. Cressman, P. Biddle, S. Knowlton, C. J. Mauvais, and R. Broglie. 1991. Transgenic plants with enhanced resistance the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science* 254: 1194-1197.
8. Broglie, K., R. Broglie, N. Benhamou, and I. Chet. 1993. The role of cell wall degrading enzymes in fungal disease resistance, p. 139-156. In Ray Wu (ed.), *Biotechnology in plant disease control*. Willy-Liss, Inc. New York. N.Y.
9. Broglie, R., K. Broglie, D. Roby, and I. Chet. 1993. Production of transgenic plants with enhanced resistance to microbial pathogens, p. 265-276. In S. D. Kung and Ray Wu (eds.), *Transgenic plants vol 1: Engineering and utilization*. Acad. Press. New York. N.Y.
10. Brunke, K. J. and R. L. Meeusen. 1991. Insect control with genetically engineered crops. *Tibtech* 9: 197-200.
11. Cheng, J., M. G. Bolyard, R. C. Saxena, and M. B. Sticklen. 1992. Production of insect resistant potato by genetic transformation with a 3-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki. *Plant Sci.* 1: 83-91.
12. Chilton, M. D. 1993. *Agrobacterium* gene transfer progress on a "poor man's vector" for maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 3119-3120.
13. Comai, L., D. Facciotti, W. R. Hiatt, G. Thompson, R. E. Rose, and D. M. Stalker. 1985. Expression in plants of *aroA* gene from *Salmonella tryphimurium* confers tolerance to glyphosate. *Nature* 317: 741-744.
14. Day, A. G., E. R. Bejarano, K. W. Buch, M. Burrell, and C. P. Lichtenstein. 1991. Expression of antisense viral gene in transgenic tobacco confers resistance to the DNA virus tomato golden mosaic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 6721-7625.
15. Delannay, X. B. J. Laveille, R. K. Proksch, R. L. Fuschs, S. R. Sims, J. T. Greenplate, P. G. Marrone, R. B. Dobson, J. J. Augustine, J. G. Layton, and D. A. Fischhoff. 1989. Field performance of transgenic tomato plant expressing the *Bacillus thuringiensis* var kurstaki insect control protein. *Bio/Tech.* 7: 1265-1269.
16. Della-Cioppa, G., S. C. Bauer, M. L. Taylor, D. E. Rochester, B. K. Klein, D. M. Shah, R. T. Fraley, and G. M. Kishore. 1987. Targeting a herbicide resistant enzyme from *Escherichia coli* to chloroplast of higher plant. *Bio/Tech.* 5: 579-584.
17. Gatehouse, J. A., V. A. Hilder, and A. M. R. Gatehouse. 1991. Genetic engineering of plants for insect resistance, p. 105-135. In D. Giersen (ed.), *Plant genetic engineering*. Chapman and Hall, Inc. New York. N.Y.
18. Golemboski, D. B., G. P. Lomonosoff, and M. Zaitlin. 1990. Plants transformed with tobacco mosaic virus nonstructural gene sequence are resistant to the virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 6311-6318.
19. Gordon-Kamm, W. J., T. M. Spencer, M. L. Mangano, T. R. Adams, R. J. Daines, W. G. Start, J. V. O'Brien, S. A. Chambers, W. R. Adams, Jr., N. G. Willetts, T. B. Rice, C. J. Mackey, R. W. Krueger, A. P. Kausch, and P. G. Lemawx. 1990. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *Plant Cell* 2: 608-618.
20. Greenberg, B. M., and B. R. Glick. 1993. The use of recombinant DNA technology to produce genetically modified plants, p. 1-10. In D. Giersen (ed), *Methods in plant molecular biology and biotechnology*. CRC Press, Inc. New York. N.Y.
- 21

26. Hinchee, M. A. U., S. R. Padgett, G. M. Kishore, X. Delannay, and R. T. Fraley. 1993. Herbicide tolerant crops, pp. 243-263. In S. D. Kung and R. Wu (eds.), Transgenic plants, vol 1: Engineering and utilization. Acad. Press. New York. N.Y.
27. Hoffman, M. P., F. G. Zalom, L. T. Wilson, J. M. Smilanick, L. D. Malyj, J. Kiser, V. A. Hider, and W. M. Barnes. 1993. Field evaluation of transgenic tobacco containing genes encoding *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin or cowpea trypsin inhibitor. Efficacy against *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol. 6: 2516-2522.
28. Joersbo, M. and J. Brunstedt. 1991. Electroporation mechanism and transient expression, stable transformation and biological effects in protoplast. Physiologia Plantarum 81: 256-264.
29. Johnson, R., J. Narvaez, G. An, and C. Ryan. 1989. Expression of proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 9871-9875.
30. Kaeppler, H. F., W. Gu, D. A. Sommers, H. W. Rines, and A. F. Cockburn. 1990. Silicon carbide fiber-mediated DNA delivery into plant cells. Plant Cell Rept. 9: 415-418.
31. Kaniewski, W., C. Lawson, B. Sammons, L. Haley, J. Hart, X. Delannay, and N. E. Tunier. 1990. Field resistance of transgenic russet burbank potato to effects of infection by potato virus X and potato virus Y. Bio/Tech. 8: 750-754.
32. Kramer, M., R. E. Sheehy, and W. R. Hiatt. 1989. Progress towards the genetic engineering of tomato fruit softening. Trends Biotechnol. 7: 191-195.
33. Li, L., R. Qu, A. de Kochko, C. Faquet, and R. N. Beachy. 1993. An improved rice transformation system using the biolistic method. Plant Cell Rept. 12: 250-255.
34. Lyznik, L. A., R. D. Ryan, S. W. Ritchie, and T. K. Hodges. 1989. Stable co-transformation of maize protoplast with *gusA* and *neo* genes. Plant Mol. Biol. 13: 151-161.
35. Mass, C. and W. Werr. 1989. Mechanism and optimized conditions for PEG mediated DNA transfection into plant protoplast. Plant Cell Rept. 8: 148-151.
36. Mazur, B. J. and S. C. Falco. 1989. The development of herbicide resistant crops. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 40: 441-456.
37. McCabe, D. E., W. F. Swain, B. J. Martinelli, and P. Christou. 1988. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. Bio/Tech. 6: 923-926.
38. McElroy, D., A. D. Blowers, B. Jones, and R. Wu. 1991. Construction of expression vectors based on the rice actin 1 (*Act1*) 5' region for use in monocot transformation. Mol. Gen. Genet. 231: 150-160.
39. McGarvey, P. B. and J. M. Kaper. 1993. Transgenic plants for conferring virus tolerance, pp. 277-295. In S. D. Kung and R. Wu (eds.), Transgenic plants, vol1: Engineering and utilization. Acad. Press. New York. N.Y.
40. Meyer, P., I. Heidmann, G. Forkman, and H. Saedler. 1987. A new petunia flower color generated by transformation of a mutant with a maize gene. Nature 330: 667-678.
41. Mullins, M. G., F. C. Tang, and O. Facciotti. 1990. *Agrobacterium* mediated genetic transformation of grape vines: transgenic plants of *Vitis rupestris* Scheele and buds of *Vitis vinifera* L. Bio/Tech. 8: 1041-1045.
42. Peng, J., L. A. Lyznik, L. Lee, and T. K. Hodges. 1990. Co-transformation of indica rice protoplast with *gusA* and *neo* genes. Plant Cell Rept. 9: 168-172.
43. Perlak, F. J., R. W. Deaton, T. A. Armstrong, R. L. Fuchs, S. R. Sims, J. Y. Greenplate, and D. A. Fischhoff. 1990. Insect resistance cotton plants. Bio/Tech. 8: 939-943.
44. Perlak, F. J., R. L. Fuschs, D. A. Deans, S. L. McPherson and D. A. Fischhoff. 1991. Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88: 3324-3328.
45. Potrykus, I. 1990. Gene transfer to cereals: an assessment. Bio/Tech. 6: 535-536.
46. Powell, A., R. S. Nelson, B. De, N. Hoffmann, S. G. Rogers, R. T. Fraley, and R. W. Beachy. 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. Science 232: 738-743.
47. Raineri, D. M., P. Bottino, M. P. Gordon, and E. W. Nester. 1990. *Agrobacterium*-mediated

- of bacterial dihydroadipiculate synthase in their chloroplasts. *Plant J.* 2: 203-209.
55. Shimamoto, K., R. Terada, T. Izawa, and H. Fujimoto. 1989. Fertile transgenic rice plants regenerated from transformed protoplast. *Nature* 338: 274-276.
 56. Shutov, A. D. and A. I. Vaintraub. 1987. Degradation of storage proteins in germinating seeds. *Phytochemist.* 26: 1557-1562.
 57. Sticklen, M. B. 1990. Genetic engineering of plants: an alternative pesticides and a new component of integrated pest management, p. 552-566. In Diana L. Weigmann (ed.), *Pesticides in the next decade: The challenges ahead*. VPI Publ. Blacksburg, VA.
 58. Sticklen, M. B. 1991. Direct somatic embryogenesis and fertile plants from rice root cultures. *J. Plant Physiol.* 138: 577-580.
 59. Sticklen, M. B., R. K. Hajela, N. Hajela, D. McElroy, V. Cao, and R. Wu. 1991. Polygenic transformation of rice using a microprojectile delivery of DNA, p. 625-635. In G. Kush (ed.), *Rice genetic II*. International Rice Research Institute Publ. Manila.
 60. Sun Samuel, S. M. and B. A. Larkins. 1993. Transgenic plants for improving seed storage proteins, p. 339-372. In S. D. Kung and Ray Wu (eds.), *Transgenic plants, vol I: Engineering and utilization*. Acad. Press. New York. N.Y.
 61. Van de Krol, A. R., L. A. Mur, P. de Lange, A. G. Gerats, J. N. Mul, and A. R. Stuitje. 1990. Antisense chalcone synthase genes in petunia: visualization of variable transgene expression. *Mol. Gen. Genet.* 220: 204-208.
 62. Vasil, V., S. M. Brown, D. re, M. E. Fromm, and I. K. Vasil. 1991. Stably transformed callus line from microprojectile bombardment of cell suspension cultures of wheat. *Bio/Tech.* 9: 743-747.
 63. Warren, G. W., N. B. Carozzi, N. Desai, and M. Koziel. 1992. Field evaluation of transgenic tobacco containing a *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein gene. *J. Econ. Entomol.* 5: 1651-1659.
 64. Watson, J. D., M. Gilman, J. Witkowski, and M. Zoller. 1992. *Recombinant DNA*. 626 p. Scientific American Book. New York. NY.
 65. Wilson, F. D., H. M. F. Lint, W. R. Deaton, D. A. Fischhoff, F. J. Perlak, T. A. Armstrong, R. L. Fuschs, S. A. Berberich, N. J. Parks, and B. R. Stapp. 1992. Resistance of cotton lines containing a *Bacillus thuringiensis* toxin to pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae) and other insects. *J. Econ. Entomol.* 4: 1516-1521.
 66. Zambryski, P., J. Tempe, and J. Shell. 1989. Transfer and function of T-DNA genes from *Agrobacterium Ti* and *Ri* plasmids in plants. *Cell* 56: 193-201.
 67. Zhong, H., C. Srinivasan, and M. B. Sticklen. 1991. Plant regeneration via somatic embryogenesis in creeping bent grass (*Agrostis palustris* Huds.). *Plant Cell Rept.* 10: 453-456.
 68. Zhong, H., C. Srinivasan, and M. B. Sticklen. 1992. In vitro morphogenesis of corn (*Zea mays* L.) II. Differentiation of ear and tassel clusters from cultured shoot apices. *Planta* 187: 490-497.
 69. Zhong, H., M. G. Bolyard, C. Srinivasan, and M. B. Sticklen. 1993. Transgenic of creeping bent grass (*Agrostis palustris* Huds.). *Plant Cell Rept.* 12: 453-456.