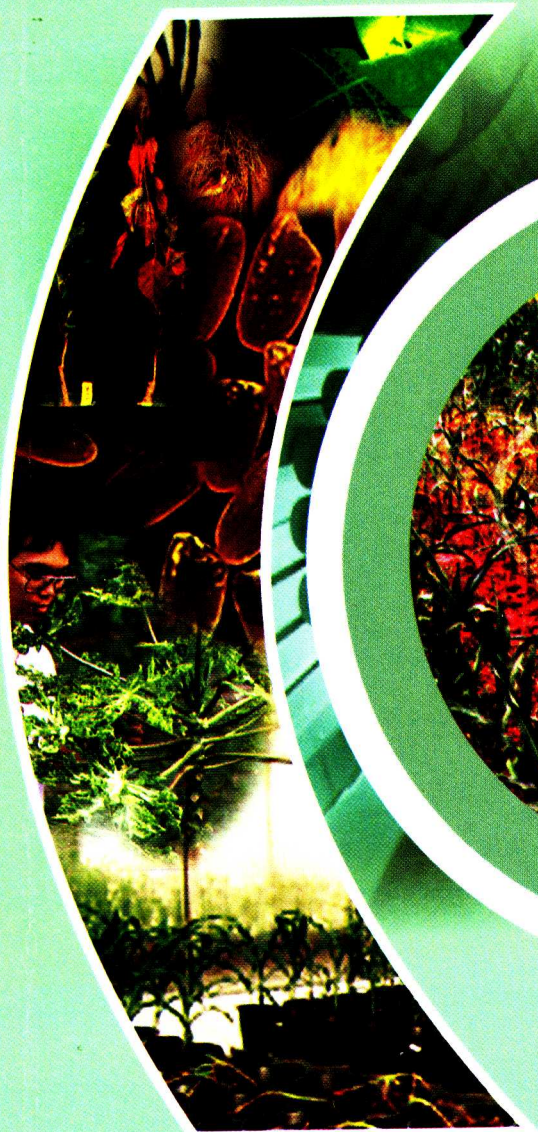


TANAMAN PRODUK REKAYASA GENETIK DAN KEBIJAKAN PENGEMBANGANNYA

VOLUME 1

**Teknologi Rekayasa Genetik dan
Status Penelitiannya di Indonesia**



**Tanaman Produk Rekayasa Genetik dan
Kebijakan Pengembangannya**

Volume 1

**Teknologi Rekayasa Genetik dan Status Penelitiannya
di Indonesia**

Oleh:
M. Herman

Penyunting:
**Bambang Purwantara
Machmud Thohari**



Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian
Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian
Departemen Pertanian

Hak cipta © 2008 BB-Biogen

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian

Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111

Telp. (0251) 8337975, 8339793

Faks. (0251) 8338820

E-mail: borif@indo.net.id

ISBN 978-979-3919-12-6

Daftar Isi

	halaman
Kata Pengantar	iii
Daftar Isi	v
Daftar Tabel	vii
Daftar Gambar	ix
I. Pendahuluan	1
II. Teknologi Rekayasa Genetik	4
Tahapan Teknologi	4
Konstruksi Gen	5
Teknik Transfer Gen	12
Vektor <i>Agrobacterium</i>	14
Usaha Perbaikan Tanaman	14
Status Litbang Tanaman PRG di Indonesia	61
Keterbatasan dan Potensi Teknologi Rekayasa Genetik	70
III. Status Global Komersialisasi Tanaman Produk Rekayasa Genetik	71
Distribusi Tanaman PRG Berdasarkan Jenis dan Sifatnya	71
Distribusi Tanaman PRG di Berbagai Benua	72
IV. Manfaat dan Keuntungan	92
Teknologi Rekayasa Genetik	92
Tanaman PRG	93
Sosial Ekonomi	93
Kesehatan Manusia dan Lingkungan	98
V. Persepsi Publik, Isu, dan Fakta Seputar Tanaman PRG	103
Persepsi Publik	103
Isu Keamanan Lingkungan	105
Isu Keamanan Pangan	118
Isu Perdagangan	124
VI. Pengaturan Keamanan Hayati dan Keamanan Pangan Tanaman PRG di Luar Negeri	128
Negara Maju	128
Negara Berkembang	137
Negara ASEAN	140

VII. Pengaturan Keamanan Tanaman PRG di Indonesia	147
Peraturan Perundang-Undangan	147
Kelembagaan	152
Pengkajian Keamanan Hayati Tanaman PRG	156
Pengalaman Evaluasi dan Pengujian Keamanan Hayati Tanaman PRG	168
VIII. Pelepasan, Pemanfaatan, Pengawasan, dan Pengendalian Tanaman PRG	174
Pelepasan dan Pemanfaatan Tanaman PRG	174
Pengawasan dan Pengendalian Tanaman PRG	180
Daftar Pustaka	184

Ringkasan Eksekutif

Buku Produk Rekayasa Genetik dan Kebijakan Pengembangannya terdiri atas Volume 1 tentang Teknologi Rekayasa Genetik dan Status Penelitiannya di Indonesia dan Volume 2 tentang Status Global Tanaman Produk Rekayasa Genetik dan Regulasinya. Volume 1 terdiri atas tiga bab, yaitu teknologi rekayasa genetik, rekayasa genetik untuk perbaikan tanaman, dan status penelitian tanaman produk rekayasa genetik di Indonesia.

Aplikasi bioteknologi modern dengan teknik rekayasa genetik dalam pemanfaatan sumber daya genetik (SDG) memiliki peluang besar untuk menunjang produksi pertanian dan ketahanan pangan, yang selanjutnya akan memberikan manfaat pada peningkatan kualitas hidup manusia. Penggunaan teknologi ini memberikan manfaat antara lain untuk perbaikan sifat tanaman. Selain dengan teknik rekayasa genetik, perbaikan sifat tanaman telah dilakukan oleh pemulia tanaman dengan modifikasi genetik melalui persilangan tanaman secara konvensional. Teknologi rekayasa genetik mempunyai potensi yang sangat besar sebagai teknologi pelengkap dan pendukung pemuliaan konvensional seandainya sumber gen interes yang ingin disilangkan tidak ada atau belum dijumpai di dalam koleksi plasma nutfah. Teknik rekayasa genetik dapat digunakan sebagai mitra dan pelengkap teknik pemuliaan tanaman yang sudah mapan dan telah berhasil digunakan selama bertahun-tahun. Kehadiran teknologi rekayasa genetik memberikan wahana baru bagi pemulia tanaman untuk memperoleh kelompok gen baru yang lebih luas.

Gen yang ditransfer ke dalam genom suatu tanaman untuk membentuk tanaman produk rekayasa genetik (PRG) dapat berasal dari spesies lain seperti bakteri, virus, hewan, atau tanaman lain, sehingga membuka kemungkinan introduksi sifat baru ke varietas yang sudah ada. Gen yang berasal dari bakteri dan dikenal secara luas karena banyak dimanfaatkan dalam perakitan tanaman PRG tahan serangga hama (TSH), adalah gen *cry* dari *Bacillus thuringiensis*. Istilah populer *cry* adalah singkatan kata *crystal* yang mempresentasikan gen dari strain Bt yang memproduksi protein kristal yang bekerja seperti insektisida (*insecticidal crystal protein*) yang dapat mematikan serangga hama. Tanaman PRG TSH yang mengandung gen dari *B. thuringiensis*, lebih dikenal dengan nama jagung Bt, kapas Bt, kentang Bt, atau padi Bt, dan telah dikomersialkan di berbagai negara.

Gen yang diperoleh dengan jalan sintesis secara kimia juga berhasil ditransformasikan ke tanaman. Pada dasarnya gen yang ditransfer harus gen yang bermanfaat yang belum ada atau belum dimiliki oleh tanaman dimaksud. Gen interes harus dikonstruksi dalam suatu vektor plasmid sebelum ditransfer ke dalam genom tanaman. Konstruksi gen yang digunakan dalam perakitan tanaman PRG terdiri atas gen interes, promotor dan terminator, gen marka seleksi, dan gen pelapor. Promotor yang digunakan dalam perakitan tanaman PRG ada berbagai jenis tergantung pada tujuan dari penggunaan promotor dalam pengendalian ekspresi gen interes. Jenis-jenis promotor tersebut antara lain: promotor *constitutive*, *inducible*, dan spesifik jaringan (*tissue specific*). Gen marka seleksi terdiri atas gen toleran herbisida, gen tahan antibiotik, dan gen-gen lain seperti gen *xylose isomerase* (*xylA*) dan

gen *phosphomannose isomerase* (*pmi*). Sedangkan contoh gen pelapor adalah gen GUS (β -glucuronidase) dari *Escherichia coli*, gen *luc* (*luciferase*) dari kunang-kunang, dan gen GFP (*green fluorescent protein*) dari ubur-ubur.

Teknik transfer gen meliputi teknik yang langsung atau tidak langsung. Teknik yang langsung antara lain penembakan partikel (*particle bombardment*), elektroporasi, *silicon carbide whiskers* (SCW). Sedangkan teknik tidak langsung menggunakan media vektor *Agrobacterium tumefaciens*. Teknik-teknik transfer gen baik yang langsung maupun tidak langsung menggunakan *A. tumefaciens* telah menghasilkan tanaman PRG. Dengan menggunakan teknik penembakan partikel, telah dirakit beberapa tanaman PRG dari berbagai komoditas seperti jagung, kedelai, pepaya, tebu, tembakau, dan ubi jalar. Teknik transformasi elektroporasi berhasil diaplikasikan pada berbagai komoditas seperti *barley*, jagung, kedelai, tanaman genus *Brassica* seperti *cauliflower* (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*), dan tembakau. Metode transfer gen lain yang kurang umum digunakan dalam transformasi tanaman tetapi telah dilaporkan berhasil mentransformasi jagung, *Agrostis alba* L. (*redtop*), dan *turfgras* adalah penggunaan SCW. Tanaman PRG seperti anggur, gandum, jagung, padi, pepaya, pisang, tebu, dan ubi jalar berhasil diperoleh melalui transformasi tanaman dengan mediasi *Agrobacterium*. Beberapa tanaman PRG yang dirakit melalui transformasi dengan *A. tumefaciens* telah berhasil dikomersialkan. Tanaman PRG tersebut adalah kedelai toleran herbisida (TH), kapas TH, kanola TH, alfalfa TH, kapas TSH, kentang TSH, labu tahan virus patogen (TVP), dan tomat dengan sifat penundaan kemasakan. Teknik transfer gen dengan penembakan partikel juga telah menghasilkan tanaman PRG yang telah dikomersialkan di Amerika Serikat, yaitu jagung TSH, jagung TH, dan pepaya TVP.

Rekayasa genetik memiliki potensi sebagai teknologi yang ramah lingkungan. Selain ramah lingkungan, teknologi rekayasa genetik diharapkan akan dapat membantu mengatasi masalah pembangunan pertanian yang tidak dapat dipecahkan secara konvensional. Sebagai contoh, dalam rangka meningkatkan produksi pertanian guna memenuhi kebutuhan penduduk yang selalu bertambah, salah satu kendala utamanya adalah faktor cekaman biotik dan abiotik, seperti hama dan penyakit, serta kekeringan. Perbaikan sifat tanaman melalui teknologi rekayasa genetik, selain untuk ketahanan terhadap cekaman biotik dan toleran cekaman abiotik, juga untuk modifikasi kualitas tanaman seperti peningkatan kandungan asam lemak dan vitamin, buah tanpa biji (partenokarpi), serta penundaan kemasakan buah. Kedelai, kapas, dan kacang tanah PRG dengan kandungan asam oleat tinggi (80%) telah dihasilkan oleh beberapa peneliti. Selain itu tomat dan pepaya yang kemasakan buahnya dapat ditunda juga telah dapat dirakit. Bahkan tomat PRG dengan nama dagang *Flavr Savr* berhasil dikomersialkan di Amerika Serikat.

Padi PRG dengan kandungan pro vitamin A tinggi yang populer dengan sebutan padi emas telah diperoleh yang merupakan hasil kerja sama penelitian antara Peter Beyer dan Ingo Potrykus. Padi PRG tersebut merupakan hasil transformasi gen *psy* (mengkode *phytoene synthase*, berasal dari *daffodil*) dan gen *crt I* (mengkode *phytoene desaturase*,

berasal dari *Erwinia uredovora*) ke dalam genom tanaman padi. Padi emas generasi ke-1 (*golden rice 1* atau GR1) mengandung *carotenoid* sampai 8 ug/g (sampel dari percobaan lapang). Kemudian dengan diisolasinya gen *psy* dari tanaman jagung dan padi, maka padi emas GR2 berhasil dirakit. Padi emas GR2 mengandung *carotenoid* sampai 25 ug/g (sampel dari percobaan rumah kaca). Padi emas GR1 dan GR2 telah disilangkan dengan IR64 dan IR36. Progeninya telah diuji di lapangan terbatas *International Rice Research Institute*.

Peneliti dari *Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization* yang bekerjasama dengan peneliti dari perusahaan *Japanese Suntory* berhasil merakit bunga mawar biru dengan mentransformasi tiga gen, yaitu gen *delphinidin* (F3'5'H, berasal dari *black pansy*, *Viola tricolor*), gen DFR (mengkode *dihydroflavonol reductase*, berasal dari *Iris hollandica*), dan gen *hairpin* RNAi (yang memblokir gen DFR dari mawar). Pada tahun 2008, tomat PRG ungu yang mengandung antioksidan *anthocyanin* tinggi berhasil dirakit oleh peneliti *John Innes Institute* dengan mentransfer gen *del* dan *Ros1* (berasal dari bunga *snapdragon*, *Antirrhium majus* Della, dan *Rosea1*).

Rekayasa genetik tidak mengenal batasan spesies, artinya gen-gen penting dari organisme apapun dapat digunakan untuk perbaikan sifat tanaman, dan membuka kemungkinan introduksi sifat baru ke varietas yang sudah ada, sehingga menambah keanekaragaman genetik. Sebagai contoh dengan berhasilnya perakitan tanaman PRG seperti padi emas, mawar biru, dan tomat ungu akan menambah keanekaragaman SDG tanaman. Isolasi gen yang mengandung sifat tertentu dapat dilakukan hanya dalam tabung reaksi. Meskipun demikian jumlah gen interes yang diisolasi dengan sifat-sifat agronomi yang menguntungkan masih sangat terbatas.

Indonesia dikenal sebagai negara yang memiliki kekayaan SDG tanaman yang berlimpah dan mempunyai nilai sangat tinggi. Kekayaan SDG yang begitu besar tersebut perlu dikelola secara berkelanjutan agar dapat meningkatkan kesejahteraan masyarakat tanpa merugikan kesehatan manusia maupun lingkungan. Salah satu teknologi yang dapat digunakan dalam pemanfaatan SDG tanaman di Indonesia adalah rekayasa genetik. Di Indonesia, penelitian rekayasa genetik untuk merakit tanaman PRG sudah dimulai pada awal 1990-an. Penelitian tersebut dilakukan oleh berbagai lembaga penelitian, perguruan tinggi, Badan Usaha Milik Negara (BUMN), dan perusahaan swasta. Penelitian rekayasa genetik di Indonesia masih dalam taraf penelitian dan pengembangan (litbang).

Komoditas yang diteliti untuk perakitan tanaman PRG, bervariasi dari tanaman pangan seperti padi, kedelai, jagung, dan ubi kayu; tanaman hortikultura seperti kentang, tomat, cabe, pepaya, dan jeruk; sampai tanaman perkebunan dan kehutanan seperti tebu, kelapa sawit, kakao, abaca, jarak pagar, dan jati. Ada dua teknik transfer gen yang digunakan, yaitu penembakan partikel dan mediasi dengan vektor *A. tumefaciens*. Penelitian rekayasa genetik tanaman di Indonesia, telah berhasil merakit berbagai tanaman PRG dengan berbagai sifat seperti ketahanan terhadap cekaman biotik, toleran cekaman abiotik, dan modifikasi kualitas seperti penundaan pemasakan, rendemen tinggi, dan amilosa rendah.

RINGKASAN EKSEKUTIF

Tanaman PRG yang berhasil dirakit antara lain padi tahan penggerek batang (*Scirpophaga incertulas*), tahan penyakit blas (*Pyricularia grisea*), dan toleran kekeringan; kedelai tahan penggerek polong (*Etiella zinckenella*); kentang tahan penyakit hawar daun (*Phytophthora infestans*) dan layu Fusarium serta tanaman PRG yang lain seperti tebu toleran kekeringan dan rendemen tinggi, pepaya dengan sifat penundaan kemasakan, tomat tanpa biji, dan ubi kayu amilosa rendah.

Tanaman-tanaman PRG tersebut ada yang sudah diuji di rumah kaca dan rumah kasa, fasilitas uji terbatas (FUT), bahkan ada yang telah diuji di lapangan terbatas (LUT), tetapi ada pula tanaman yang masih berupa planlet di laboratorium. Pada saat ini ada 10 lembaga yang masih melaksanakan penelitian tanaman PRG pada tahap laboratorium untuk berbagai jenis tanaman PRG dengan berbagai sifat. Lembaga-lembaga yang sedang melaksanakan perakitan tanaman PRG pada tahap rumah kaca dan atau rumah kasa dalam FUT adalah Balai Besar Litbang Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (BB-Biogen), Puslit Bioteknologi LIPI, Institut Pertanian Bogor, Institut Teknologi Bandung, Universitas Brawijaya, Universitas Udayana, Universitas Jember, dan PTPN XI. Sedangkan penelitian perakitan tanaman PRG pada tahap LUT dilaksanakan oleh tiga lembaga, yaitu BB-Biogen kerja sama dengan Balai Penelitian Tanaman Sayuran untuk kentang PRG tahan penyakit hawar daun, Puslit Bioteknologi LIPI untuk padi Bt tahan penggerek batang, dan PTPN XI bekerjasama dengan Universitas Jember untuk tebu toleran kekeringan dan rendemen tinggi.

Bab I. Teknologi Rekayasa Genetik

Penelitian bioteknologi melalui teknologi rekayasa genetik telah memperoleh hasil nyata, yaitu tanaman produk rekayasa genetik (PRG) yang siap untuk dimanfaatkan bagi kemajuan di berbagai bidang, khususnya pertanian. Selain itu, teknologi rekayasa genetik telah berhasil diaplikasikan dengan baik dalam penelitian dan pengembangan (litbang). Dalam bab ini diuraikan tahapan teknologi rekayasa genetik, konstruksi gen, teknik transfer gen, usaha perbaikan tanaman, dan keterbatasan serta potensi teknologi rekayasa genetik. Tahapan teknologi akan menjelaskan langkah teknik biologi molekuler dan seluler dalam perakitan tanaman PRG. Konstruksi gen yang digunakan dalam perakitan tanaman produk rekayasa genetik terdiri atas gen interes, promotor dan terminator, gen marka seleksi, serta gen pelapor. Teknik transfer gen meliputi teknik yang langsung dan tidak langsung. Rekayasa genetik untuk perbaikan sifat tanaman telah menghasilkan tanaman PRG baik pada tahapan komersial maupun litbang. Selain potensial, rekayasa genetik juga mempunyai keterbatasan.

TAHAPAN TEKNOLOGI

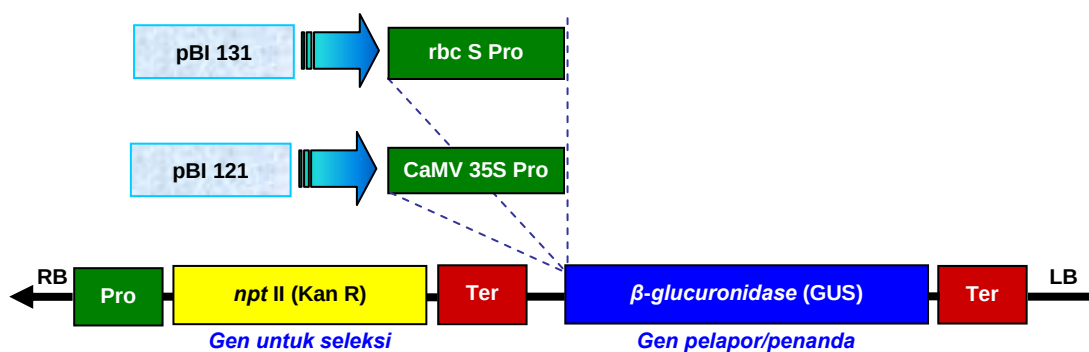
Produksi tanaman PRG melibatkan beberapa tahapan dalam teknik biologi molekuler dan seluler. Suatu sifat yang diinginkan harus dipilih dan gen yang mengatur sifat tersebut harus diidentifikasi. Apabila gen yang diinginkan belum tersedia, maka harus diisolasi dari organisme donor. Supaya gen tersebut dapat berfungsi maka harus dimodifikasi secara molekuler, yaitu harus mengandung daerah pengaturan (*regulatory region*), sehingga dapat diekspresikan ditanaman dengan tepat dan benar (Bennet 1993, Watson *et al.* 1992). Gen yang sudah diisolasi harus dikonstruksi dalam suatu vektor plasmid untuk ditransfer ke tanaman secara langsung melalui *particle bombardment* atau tidak langsung dengan media vektor *Agrobacterium*. Setelah proses transfer gen dan sebelum regenerasi tanaman, eksplan dipindahkan ke medium seleksi untuk mengidentifikasi transforman. Plasmid yang digunakan untuk transformasi tanaman tidak hanya mengandung gen dari sifat yang diinginkan, tetapi juga gen marka untuk seleksi, seperti gen toleran terhadap herbisida atau antibiotik. Gen marka tersebut akan memudahkan seleksi dari sel atau jaringan yang transformasi.

Untuk keberhasilan suatu transformasi, rangkaian gen yang diintroduksi ke tanaman harus dapat disisipkan atau dimasukkan ke dalam genom tanaman, diekspresikan, dan tetap terpelihara dalam seluruh proses divisi sel berikutnya. Pada tahap terakhir, sel atau jaringan tanaman yang ditransformasi harus dapat diregenerasi menjadi suatu tanaman. Regenerasi tanaman dapat dilakukan baik secara organogenesis (Zhong *et al.* 1992) atau embriogenesis (Sticklen 1991, Zhong *et al.* 1991). Regenerasi tanaman yang berasal dari berbagai eksplan menghasilkan embrio somatik atau tunas *adventitious*. 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

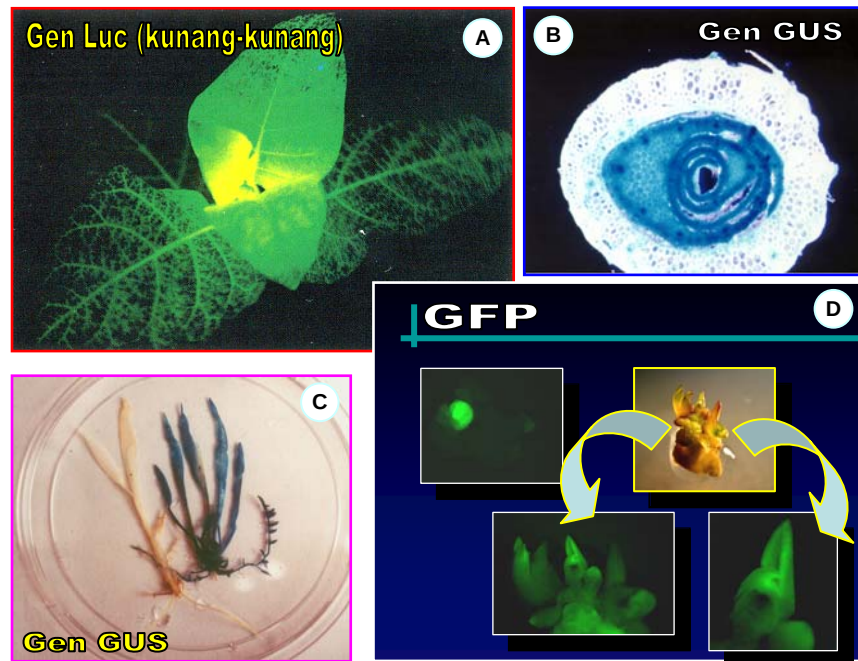
kultur kalus) atau langsung (tanpa mengalami fase pertumbuhan kalus). Organogenesis dapat didefinisikan sebagai transformasi dari sel tunggal kalus, atau jaringan menjadi struktur seperti *organ*. Di antara tahapan tersebut, umumnya regenerasi tanaman merupakan tahap yang paling sulit dicapai. Tanaman PRG perlu dikarakterisasi secara molekuler untuk mengkonfirmasi integritas gen yang diintroduksi dan menentukan jumlah kopinya di dalam genom tanaman. Tanaman tersebut juga perlu dikarakterisasi secara biokimia untuk menentukan apakah gen tersebut berfungsi dengan benar. Setelah tahapan biologi seluler dan molekuler dilalui, tanaman PRG perlu dikarakterisasi sifat yang diinginkan di laboratorium dan rumah kaca. Selanjutnya untuk mengkonfirmasi apakah sifat baru yang diinginkan dapat diturunkan, maka perlu dilakukan persilangan genetik.

KONSTRUKSI GEN

Dalam sistem transformasi, biasanya gen interes yang akan ditransfer ke tanaman diklon terlebih dahulu dalam vektor plasmid yang dapat memperbanyak diri dalam *Agrobacterium tumefaciens* atau *Escherichia coli*. Gen tersebut digabungkan dengan promoter yang dapat diekspresikan dalam tanaman dan dirangkaikan dengan terminator yang tepat (McElroy *et al.* 1991, Watson *et al.* 1992). Dengan demikian, transkrip mRNA dapat diangkut dari inti sel ke sitoplasma untuk proses translasi (Bennet 1993). Plasmid yang digunakan untuk transformasi tanaman tidak hanya mengandung gen dari sifat atau karakter yang diinginkan, tetapi juga gen marka untuk seleksi, seperti gen *npt II* untuk ketahanan terhadap antibiotik (*kanamycin*) atau gen bar untuk toleran terhadap herbisida *glufosinate*. Contoh rangkaian gen secara lengkap disajikan pada Gambar 1. Selain itu, terkadang ditambahkan gen pelapor (*reporter gene*) antara lain β -glucuronidase (GUS) atau gen *luciferase* (*luc*) atau gen *green fluorescent protein* (GFP). Contoh-contoh ekspresi gen pelapor disajikan pada Gambar 2. Gen marka tersebut akan memudahkan seleksi sel atau jaringan yang transformasi.



Gambar 1. Konstruksi gen yang mengandung marka seleksi tahan *kanamycin* (Kan R) dan pelapor β -glucuronidase (GUS), pro = promoter, rbc S Pro untuk plasmid BI 131, CaMV 35S Pro untuk plasmid pBI 121, ter = terminator, RB = *right border* (batas kanan), LB = *left border* (batas kiri) (Herman 1996).



Gambar 2. Contoh gen pelapor, (A) gen *luc* berasal dari kunang-kunang (Hideo dan Hiroaki 2005), (B dan C) gen GUS (Zhong 1992), (D) gen GFP (Kent 2003).

Gen Interes

Gen interes yang ditransformasikan ke genom tanaman untuk memperoleh sifat yang diinginkan seperti ketahanan terhadap cekaman biotik, toleran cekaman abiotik, toleran herbisida, dan merubah kualitas tanaman diuraikan dengan jelas pada bagian upaya perbaikan tanaman, khususnya dalam Bab II. Gen interes untuk perbaikan tanaman dapat diisolasi dari berbagai organisme seperti binatang, tanaman, bakteri, serangga, atau virus (Tabel 1, Tabel 2, Tabel 3). Gen untuk ketahanan terhadap serangga yang telah diisolasi dari tanaman adalah *cowpea trypsin inhibitor* (Hoffman *et al.* 1992), *GNA*, yaitu gen yang mengkode *snowdrop lectin Galanthus nivalis agglutinin* (Rao *et al.* 1998). Sedangkan gen ketahanan terhadap serangga yang dikenal secara populer adalah gen Bt yang diisolasi dari bakteri *Bacillus thuringiensis* (Cheng *et al.* 1992, Krattiger 1997). Gen toleran terhadap herbisida *glyphosate* telah diisolasi dari bakteri tanah *Agrobacterium* sp. (GEO-PIE 2003).

Promoter dan Terminator

Promoter merupakan daerah DNA di mana RNA *polymerase* akan menempel untuk memulai proses transkripsi (Levin 1994). Promoter yang digunakan dalam perakitan tanaman PRG ada berbagai jenis tergantung pada tujuan dari penggunaan promoter dalam

Tabel 1. Gen interes yang digunakan dalam perbaikan tanaman untuk ketahanan terhadap cekaman biotik.

Contoh gen	Sumber/asal gen	Sifat/karakter yang diinginkan
<i>cry1A(b)</i> , <i>cry3B(b1)</i> , <i>cry1F(a2)</i> , <i>cry9C</i>	Bakteri	Tahan serangga hama
<i>cry1A(b)+cry3B(b1)</i> , <i>cry34A(b1)+cry35A(b1)</i> ,	Bakteri	Tahan serangga hama
<i>cry1A(a)</i> , <i>cry1A(b)</i> , <i>cry1A(c)</i> , <i>cry1F</i> , <i>cry2A(b)</i>	Bakteri	Tahan serangga hama
<i>cry1A(c)+cry2A(b)</i> , <i>cry1A(c)+cry1F</i> , <i>Vip3A+cry1A(b)</i>	Bakteri	Tahan serangga hama
<i>cry3 A(a)</i>	Bakteri	Tahan serangga hama
<i>cry1A(b)</i>	Bakteri	Tahan serangga hama
<i>cry5</i>	Bakteri	Tahan serangga hama
<i>cry1B(a)+cry1I(a)</i>	Bakteri	Tahan serangga hama
<i>cry1B-cry1Aa</i> , <i>cry1B</i>	Bakteri	Tahan serangga hama
<i>pinII</i>	Tanaman	Tahan serangga hama
<i>α-amylase inhibitor</i>	Tanaman	Tahan serangga hama
<i>GNA</i>	Tanaman	Tahan serangga hama
<i>GNA</i>	Tanaman	Tahan nematoda parasit tanaman
<i>CpTI</i>	Tanaman	Tahan nematoda parasit tanaman
<i>Oc I D86</i>	Tanaman	Tahan nematoda parasit tanaman
<i>Oc-I1D86 + CpTI</i>	Tanaman	Tahan nematoda parasit tanaman
<i>Mi</i>	Tanaman	Tahan nematoda parasit tanaman
<i>RB</i>	Tanaman	Tahan cendawan patogen
<i>chitinase</i>	Bakteri	Tahan cendawan patogen
<i>chitinase</i>	Tanaman	Tahan cendawan patogen
<i>β-1,3-glucanase</i>	Tanaman	Tahan cendawan patogen
<i>RIP</i>	Tanaman	Tahan cendawan patogen
<i>chitinase + β-1,3-glucanase + RIP</i>	Tanaman	Tahan cendawan patogen
<i>entC</i> , <i>pmsB</i>	Bakteri	Tahan cendawan patogen
<i>cecP1</i>	Binatang	Tahan bakteri patogen
<i>Shiva-1</i>	Serangga	Tahan bakteri patogen
<i>MsrA1</i>	Serangga	Tahan bakteri patogen
<i>Xa21</i>	Tanaman	Tahan bakteri patogen
<i>CP</i>	Virus	Tahan virus patogen
<i>replicase</i>	Virus	Tahan virus patogen

cry = crystal, *pin* = proteinase inhibitor, *GNA* = *Galanthus nivalis* agglutinin, *CpTI* = cowpea trypsin inhibitor, *Ocl* = oryzacystatin-I, *RIP* = ribosome in-activating protein, *cecP1* = cecropin P1, *CP* = coat protein virus patogen.

pengendalian ekspresi gen interes. Jenis-jenis promoter tersebut antara lain: promoter *constitutive*, *inducible*, dan spesifik jaringan (*tissue specific*) (PL 2007).

1. Promoter *constitutive*

Promoter ini mengatur ekspresi gen interes di semua jaringan tanaman. Promoter *constitutive* dapat berasal dari penyakit tanaman khususnya virus patogen atau dari tanaman. Contoh promoter *constitutive* adalah CaMV 35S (berasal dari virus patogen *cauliflower mosaic*) *ubiquitin (Ubi)* dari jagung, *actin 1 (Act-1)* dari padi, dan *alcohol dehydrogenase 1 (Adh-1)* dari jagung (Christensen dan Quail 1996).

2. Promoter *inducible*

Gen interes akan diekspresikan apabila dipicu oleh adanya pengaruh luar. Ada dua jenis promoter *inducible*, yaitu promoter *temperature inducible* dan promoter *light inducible* (PL 2007).

TEKNOLOGI REKAYASA GENETIK

Tabel 2. Gen interes yang digunakan dalam perbaikan tanaman untuk toleransi terhadap cekaman abiotik.

Contoh gen	Sumber/asal gen	Sifat/karakter yang diinginkan
TPS	Tanaman	Toleran kekeringan
<i>GmTP55</i>	Tanaman	Toleran kekeringan
<i>DREB1A</i>	Tanaman	Toleran kekeringan
<i>HVA1</i>	Tanaman	Toleran kekeringan
<i>betA</i>	Tanaman	Toleran kekeringan
<i>SacB</i>	Bakteri	Toleran kekeringan
<i>Hd-Zip (oshox)</i>	Tanaman	Toleran kekeringan
<i>CBF3/DREB1A, ABF3</i>	Tanaman	Toleran salinitas
<i>OsMYB3R-2</i>	Tanaman	Toleran salinitas
<i>GmTP55</i>	Tanaman	Toleran oksidatif
<i>AtBCB, parB, AtPox</i>	Tanaman	Toleran oksidatif
<i>Mn-SOD</i>	Tanaman	Toleran pembekuan
<i>spermidine synthase</i>	Tanaman	Toleran pembekuan
<i>DREB1A</i>	Tanaman	Toleran pembekuan
<i>OsMYB3R-2</i>	Tanaman	Toleran pembekuan
<i>LeGPAT</i>	Tanaman	Toleran pembekuan
<i>parB</i>	Tanaman	Toleran logam berat
<i>CSb</i>	Bakteri	Toleran keracunan Al
<i>AtBCB, parB, tPox, NtGDI1</i>	Tanaman	Toleran keracunan Al
EPSPS	Bakteri	Toleran herbisida
PAT	Bakteri	Toleran herbisida
BXN	Bakteri	Toleran herbisida
ALS	Bakteri	Toleran herbisida

TPS = *trehalose-6-phosphate synthase*, EPSPS = *3-enolpyruvylshikimate-5-phosphate synthase*, PAT = *phosphinotricin acetyl transferase*, BXN = *Bromoxynil nitrilase*, ALS = *acetolactate synthase*.

Tabel 3. Gen interes yang digunakan dalam perbaikan tanaman untuk modifikasi kualitas.

Contoh gen	Sumber/asal gen	Sifat/karakter yang diinginkan
<i>Antisense PG</i>	Bakteri	Penundaan kemasakan
<i>Antisense ACC oxidase</i>	Tanaman	Penundaan kemasakan
<i>Antisense ACC synthase</i>	Tanaman	Penundaan kemasakan
<i>Antisense ACC deaminase,</i>	Bakteri	Penundaan kemasakan
<i>GmFad2-1</i>	Tanaman	Kandungan asam lemak tinggi
<i>ghSAD-1 dan ghFAD2-1</i>	Tanaman	Kandungan asam lemak tinggi
<i>TE</i>	Tanaman	Kandungan asam lemak tinggi
<i>Psy + crt I</i>	Tanaman + bakteri	Peningkatan kandungan vitamin A
<i>DFR dan F3', 5'H</i>	Tanaman	Perubahan warna pigmen bunga
<i>Antisense GBSS</i>	Tanaman	Amilosa rendah
<i>Inverted repeat ubi kayu GBSS</i>	Tanaman	Amilosa rendah
<i>Antisense SBEI</i>	Tanaman	Amilosa rendah
<i>Antisense GBSSI</i>	Tanaman	Amilosa rendah
<i>SSIII/GBSS</i>	Tanaman	Amilosa rendah
<i>DefH9-iaaM</i>	Tanaman + bakteri	Buah tanpa biji/partenokarpi
<i>TPRP-F1-roIB</i>	Tanaman + bakteri	Buah tanpa biji/partenokarpi
<i>Dihydronicolinate synthase</i>	Bakteri	Peningkatan kandungan asam amino

PG = *polygalacturonase*, ACC = *L-amino-cyclopropane L-carboxylate*, *psy* = *phytoene synthase*, DFR = *dihydroflavonol reductase*, F3',5'H = *flavonoid 3', 5'-hydroxylase*, GBSS = *granule-bound starch synthase*, SBEI = *starch TBPanching enzyme I*, SS = *starch synthase*.

- a. Promoter *temperature inducible* ada dua jenis, yaitu promoter *heat-shock* dan *cold-shock* yang telah dipatenkan masing-masing oleh *Mycogen Plant Sciences*, *United States Department of Health and Human Services*, dan *General Hospital Corporation* untuk promoter *heat-shock*; Takara Shuzo Co., Ltd, Japan Tobacco Inc., Universitas Quebec di Montreal, dan Danisco untuk promoter *cold-shock* (PL 2007). Gen *heat shock* ditemukan oleh Lesley *et al.* (1990). Promoter dari gen *thermophilic heat shock* (*tgrE*) yang lain telah disekuens untuk dianalisis respon *heat shock*. (Ohta *et al.* 1993). Gen *cold shock cspA* dari *E. coli*, juga ditemukan oleh Tanabe *et al.* (1992) dan Li *et al.* (1997).
- b. Promoter *light inducible* dari gen SSU (*small subunit*) kedelai, yaitu gen *ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase* (*rbcS*). Promoter jenis ini telah dipatenkan oleh *Calgene Inc* (PL 2007). Promoter *light repressible* gen *pra2* dari kacang kapri telah dipatenkan oleh *Mycogen Plant Sciences* (PL 2007). Gen *crtI* dan *carQRS* dari bakteri *Myxococcus xanthus* masing-masing telah ditemukan oleh Argudo *et al.* (1996) dan Whitworth *et al.* (2004).

3. Promoter spesifik jaringan

Dengan menggunakan promoter spesifik jaringan gen interest dapat diatur untuk diekspresikan di bagian jaringan tanaman yang dikehendaki. Ada beberapa contoh promoter spesifik jaringan antara lain promoter akar, biji, dan buah (PL 2007). Gen *Pyk10* dari *Arabidopsis thaliana* (untuk ekspresi gen pada bibit dan akar) (Nitz *et al.* 2001), gen dari *Beta vulgaris* (untuk diekspresikan di akar khususnya di *xylem parenchyma*) (WIPO 2006), tembakau RD2 (untuk ekspresi gen pada akar) (USP 2007); gen *beta-amylase* atau gen *barley hordein*, gen *GluB-1 glutelin* padi (untuk ekspresi gen pada biji) (USP 2007); dan TRX pisang dan *actin melon*, serta gen *2A11* dari tomat (untuk ekspresi gen pada buah) (Van Haaren dan Houck 1993). Ketiga jenis promoter tersebut telah dipatenkan oleh *Calgene Inc.*, *Sapporo Breweries* dan Universitas California untuk promoter biji, *Calgene Inc.* untuk promoter buah, dan *Pioneer Hi-Bred* untuk promoter akar (PL 2007). Contoh lain promoter spesifik jaringan adalah *rbcS* yang mengekspresikan gen interest di jaringan yang berwarna hijau. Poulsen *et al.* (1986) mengkarakterisasi gen *rbcS* yang berasal dari tanaman *Nicotiana plumbaginifolia*.

Menurut Levin (1994), dalam bukunya yang berjudul *Genes V terminator* didefinisikan sebagai suatu sekuens DNA yang berada di ujung *transcript* yang menyebabkan RNA *polymerase* menghentikan proses transkripsi. Transkripsi adalah proses sintesis RNA pada *template* DNA (Levin 1994). Contoh terminator adalah NOS 3' yang berasal dari *Agrobacterium*. NOS 3' adalah daerah 3' yang tidak ditranslasi dari gen *nopaline synthase* yang mengakhiri transkripsi dan mengarahkan poliadenilasi. Translasi adalah sintesis protein pada *template* mRNA (Levin 1994). Sedangkan poliadenilasi adalah proses penambahan asam poliadenilat pada daerah ujung 3' RNA eukaryotik setelah proses transkripsi (Levin 1994).

Gen Marka Seleksi

1. Gen toleran herbisida

Ada beberapa gen marka seleksi yang digunakan dalam proses perakitan tanaman PRG. Salah satu contoh gen marka seleksi adalah gen GOX. Gen ini diisolasi bakteri *Achromobacter* (GEO-PIE 2003). Gen GOX dapat mendetoksifikasi *glyphosate*, sehingga digunakan sebagai marka seleksi dalam proses rekayasa genetik tanaman PRG toleran herbisida *glyphosate* (GEO-PIE 2003). Contoh lain, adalah gen *bar* yang diisolasi dari *Streptomyces hygroscopicus*. Gen ini mengandung kode untuk *phosphinotricin acetyl transferase* (PAT). PAT dapat mendetoksifikasi herbisida *glufosinate*. Oleh karena itu, gen *bar* selain dapat digunakan sebagai gen marka seleksi, juga digunakan untuk merakit tanaman PRG TH *glufosinate* (Hinchee *et al.* 1993).

2. Gen tahan antibiotik

Contoh gen marka seleksi tahan antibiotik antara lain *hygromycin phosphotransferase* (*hpt*), *chloramphenicol acetyl transferase* (*CAT*), dan gen tahan *kanamycin* (*kan*).

a. Gen *hpt*

Gen *hpt* diperoleh dari *E. coli*. Gen ini digunakan sebagai marka seleksi dalam transformasi tanaman di dalam media yang mengandung hygromycin B (Peter *et al.* 1985).

b. Gen *CAT*

Gen *CAT* berasal dari bakteri. Gen ini digunakan sebagai marka seleksi untuk ketahanan terhadap antibiotik chloramphenicol. Gen *CAT* digunakan sebagai marka seleksi pada perakitan tembakau PRG (Hernandez *et al.* 1986). Penelitian lain menggunakan gen *CAT* dilakukan oleh Callis *et al.* (1988) dengan mentransformasi protoplas jagung dengan elektroporasi.

c. Gen *kan*

Gen tahan antibiotik *kanamycin* (*kan*) adalah salah satu marka seleksi yang sangat luas digunakan dalam perakitan tanaman PRG. Gen ini diisolasi dari komponen transposon Tn5 bakteri *E. coli* (Beck *et al.* 1982). Gen tersebut mengkode *aminoglycoside 3'-phosphotransferase* atau dengan nama lain *neomycin phosphotransferase* II (NPT II).

3. Gen-gen lain

Ada beberapa gen lain yang digunakan sebagai marka seleksi dalam proses perakitan tanaman PRG. Gen-gen tersebut antara lain adalah gen *xylose isomerase* (*xylA*), gen *phosphomannose isomerase* (*pmi*).

a. Gen *xylA*

Gen *xylA* diisolasi dari *Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes* dan *Streptomyces rubiginosus*. Gen tersebut dengan promotor *cauliflower mosaic virus* 35S ditransformasikan ke genom tanaman kentang, tembakau, dan tomat melalui mediasi vektor *Agrobacterium* (Haldrup *et al.* 2001). Tanaman PRG diseleksi dalam media yang mengandung *xylose*. Seleksi *xylose isomerase* pada kentang dan tomat menunjukkan lebih efisien dibandingkan seleksi dengan antibiotik *kanamycin*. Hasil seleksi menggunakan *xylose isomerase* pada eksplan sangat berbeda dengan *kanamycin* dan herbisida. Sistem seleksi dengan *xylose* merupakan sistem seleksi positif di mana sel-sel tanaman PRG berkembang biak sedangkan yang non PRG terhambat tetapi tetap hidup (Haldrup *et al.* 2001).

b. Gen *manA* (*pmi*)

Darzins *et al.* (1985) telah berhasil mengklon gen *phosphomannose isomerase* (*manA* atau *pmi*) dari *E. coli*. Gen ini mengkode *phosphomannose-isomerase* yang merubah *mannose-6-phosphate* menjadi *fructose-6-phosphate*. Negrotto *et al.* (2000) menggunakan gen *pmi* sebagai gen marka seleksi dalam proses transformasi tanaman jagung dengan vektor *Agrobacterium*. Sedangkan Reed *et al.* (2001) mentransformasi jagung, gandum dan *barley* juga dengan menggunakan gen *manA* (*pmi*) sebagai gen marka seleksi.

Gen Pelapor

1. Gen GUS

Gen GUS (*β -glucuronidase*) diisolasi dari bakteri *E. coli* (Jefferson *et al.* 1987, Jefferson 1989). Bahan yang digunakan dalam pengecatan GUS secara histokemikal adalah *5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide* (X-Gluc). Hasil reaksi dari pengecatan tersebut akan menunjukkan warna biru pada jaringan yang mengandung gen GUS (Jefferson *et al.* 1987, Jefferson 1989).

2. Gen *luc*

Gen *luc* (*luciferase*) berhasil diisolasi dari kunang-kunang atau *firefly* (*Photinus pyralis*) (Ow *et al.* 1986). Dale dan Ow (1991) menggunakan gen *luc* sebagai gen penanda dan seleksi sebagai pengganti gen seleksi dengan ketahanan antibiotik. Gen tersebut ditransformasikan ke genom tanaman tembakau. Hideo dan Hiroaki (2005) juga menggunakan gen *luc* sebagai gen penanda yang ditransformasikan ke genom tanaman tembakau dan begonia. Ekspresi gen *luc* pada daun dapat dipantau dengan menampakkan kependaran setelah diperlakukan dengan substrat *luciferin* (Hideo dan Hiroaki 2005). Tingkat kependaran ekspresi gen *luc* dipengaruhi oleh jenis tanaman, misalnya pada tanaman begonia lebih tinggi dibandingkan pada tembakau.

2. Gen GFP

Gen GFP (*green fluorescent protein*) telah diisolasi dari ubur-ubur atau *jellyfish* (*Aequorea victoria*). Lawton *et al.* (2000) menggunakan gen GFP sebagai penanda dan mentransformasikan ke genom tanaman ubi jalar dengan penembakan partikel dan elektroporasi. Ekspresi stabil dari gen GFP dapat diamati pada tunas daun yang muncul dari kalus embriogenik 4 minggu setelah penembakan. Percobaan dan hasil yang sama juga dilakukan oleh Winfield *et al.* (2001) pada tanaman ubi jalar.

TEKNIK TRANSFER GEN

Plasmid yang mengandung konstruksi gen yang lengkap (gen interes, gen marka seleksi, dan gen pelapor) siap ditransformasikan ke genom tanaman. Seandainya gen interes dan marka seleksi terletak dalam dua plasmid yang berbeda perlu dilakukan kotransformasi (*co-transformation*), yaitu mentransfer dua plasmid ke tanaman secara simultan (Lyznik *et al.* 1989, Peng *et al.* 1990). Setelah proses transfer gen, sebelum regenerasi tanaman eksplan dipindahkan ke medium seleksi untuk mengidentifikasi transforman. Teknologi transfer gen dibedakan menjadi dua, yaitu langsung dan tidak langsung (Herman 1996). Contoh transfer gen secara langsung adalah perlakuan pada protoplas tanaman dengan elektroporasi atau dengan *polyethyleneglycol* (PEG), penembakan eksplan gen dengan *gene gun*, atau penggunaan *silicon carbide whiskers* (SCW) dengan *vortex*. Sedangkan transfer gen secara tidak langsung adalah penggunaan vektor *Agrobacterium*.

Secara Langsung

1. *Particle bombardment* (penembakan partikel)

Teknik paling modern dalam transformasi tanaman adalah penggunaan metode *gene gun* atau *particle bombardment* atau penembakan partikel. Metode transfer gen ini dioperasikan secara fisik dengan menembakkan partikel *DNA-coated* langsung ke sel atau jaringan tanaman (Klein *et al.* 1988). Dengan cara demikian partikel dan DNA yang ditambahkan menembus dinding sel dan membran, kemudian DNA melarut dan tersebar dalam sel secara independen. Telah didemonstrasikan bahwa teknik ini efektif untuk mentransfer gen pada bermacam-macam eksplan. Penggunaan penembakan partikel membuka peluang dan kemungkinan lebih mudah dalam memproduksi tanaman PRG dari berbagai spesies yang sebelumnya sukar ditransformasi dengan *Agrobacterium*, khususnya tanaman monokotil seperti padi, jagung, dan *turfgrass*. Teknik transformasi tanaman dengan penembakan partikel telah berhasil diaplikasikan ke berbagai tanaman antara lain tebu, jagung, padi, tembakau, pepaya, kedelai, dan ubi jalar (Bower dan Birch 1992, Fromm 1994, Klein *et al.* 1989, Rasmussen *et al.* 1994, Damayanti 2005, Pardal *et al.* 2005, Ambarwati *et al.* 2005) dan menghasilkan tanaman PRG.

2. Elektroporasi

Metoda transfer DNA yang umum digunakan pada tanaman monokotil adalah elektroporasi dari protoplas, perlakuan *polyethylene glycol* (PEG) pada protoplas dan kombinasi antara dua perlakuan tersebut di atas (Joersbo dan Brunstedt 1991). PEG memudahkan presipitasi dari DNA dan membuat kontak lebih baik dengan protoplas, juga melindungi DNA plasmid mengalami degradasi dari enzim *nuclease* (Mass dan Wir 1989). Sedangkan elektroporasi dengan perlakuan listrik voltase tinggi menyebabkan permibilitas tinggi untuk sementara pada membran sel dengan membentuk pori-pori sehingga DNA mudah penetrasi ke dalam protoplas. Integritas membran kembali membaik seperti semula dalam beberapa detik sampai satu menit setelah perlakuan listrik. Jagung dan padi telah berhasil ditransformasi melalui elektroporasi dengan efisiensi antara 0,1-1%. Kelemahan penggunaan protoplas sebagai eksplan untuk transformasi adalah sulitnya regenerasi dari protoplas, ekstra komplikasi, dan variasi somaklonal akibat panjangnya periode kultur *in vitro*. Selain jagung dan padi, beberapa jenis tanaman PRG sudah berhasil diperoleh melalui transformasi dengan teknik elektroporasi. Tanaman PRG tersebut antara lain tebu (*Saccharum officinarum* L.), tembakau, tanaman genus *Brassica* seperti *cauliflower* (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*), kedelai, *barley*, dan kopi (*Coffea arabica* cv. *Catimor*) (Fromm *et al.* 1986, Arencibia *et al.* 1995, D'Halluin *et al.* 1999, Riggs dan Bates 1986, Eimert dan Siegemund 1992, Siegemund dan Eimert 1995, Dhir *et al.* 1992, Lazzeri 1995, Fernández 2003, Jin *et al.* 2004).

3. Silicon carbide whiskers (SCW)

Metode transfer gen lain yang kurang umum digunakan dalam transformasi tanaman tetapi telah dilaporkan berhasil mentransformasi jagung, *Agrostis alba* L. (Redtop), dan *turfgras* adalah penggunaan SCW (Kaeppeler *et al.* 1990, Asano *et al.* 1991, Kaeppeler dan Somers 1994, Frame *et al.* 1994, Wang *et al.* 1995). Suspensi sel tanaman yang akan ditransformasi dicampur dengan serat *silicon carbide* dan DNA plasmid dari gen yang diinginkan dimasukkan kedalam tabung Eppendorf kemudian dilakukan pencampuran dan pemutaran dengan *vortex* (Kaeppeler *et al.* 1990, Asano *et al.* 1991, Kaeppeler *et al.* 1992, Kaeppeler dan Somers 1994, Frame *et al.* 1994, Wang *et al.* 1995). Serat *silicon carbide* berfungsi sebagai jarum injeksi mikro (*microinjection*) untuk memudahkan transfer DNA ke dalam sel tanaman.

Secara Tidak Langsung

1. Vektor *Agrobacterium*

Dari banyak teknik transfer gen yang berkembang, teknik melalui mediasi vektor *A. tumefaciens* paling sering digunakan untuk mentransformasi tanaman dikotil. *A. tumefaciens* mampu mentransfer 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 (Hinchee *et al.* 1988, Mullins *et al.* 1990). Gen yang di-transfer terletak pada plasmid Ti (*tumor inducing*). Segmen spesifik dari DNA plasmid Ti disebut DNA T (*transfer* DNA) yang berpindah dari bakteri ke inti sel tanaman dan berintegrasi ke dalam genom tanaman. Karena *A. tumefaciens* merupakan patogen tanaman maka *Agrobacterium* sebagai vektor yang digunakan untuk transformasi tanaman adalah bakteri dari jenis plasmid Ti yang dilucuti virulensinya (disarmed), sehingga sel tanaman yang ditransformasi oleh *Agrobacterium* dan yang mampu beregenerasi akan membentuk suatu tanaman sehat hasil rekayasa genetik. Tanaman tersebut akan menurunkan DNA T yang disarmed dan gen asing (dari sifat yang diinginkan) ke keturunannya. Teknik transformasi melalui mediasi vektor *Agrobacterium* pada tanaman dikotil telah berhasil dengan baik tetapi sebaliknya tidak umum digunakan pada tanaman monokotil. Meskipun demikian beberapa peneliti melaporkan bahwa beberapa strain *Agrobacterium* berhasil mentransformasi tanaman monokotil seperti jagung dan padi. Tanaman PRG seperti pisang (*Musa acuminata*), anggur (*Vitis vinifera* L.), jagung, gandum, tebu, kentang, padi (*indica*, *japonica*, dan *javanica*), ubi jalar, dan pepaya berhasil diperoleh melalui transformasi tanaman dengan mediasi *Agrobacterium* (May *et al.* 1995, Perl *et al.* 1996, Ishida *et al.* 1996, Cheng *et al.* 1997, Enríquez-Obregón *et al.* 1997, 1998, 1999, Herman *et al.* 2007, Jinjiang *et al.* 1996, Zhou *et al.* 2005, Sisharmini *et al.* 2005, Hautea *et al.* 2003).

USAHA PERBAIKAN TANAMAN

Teknologi rekayasa genetik telah dimanfaatkan untuk perbaikan sifat/karakter tanaman yang meliputi antara lain untuk ketahanan terhadap cekaman biotik dan abiotik, toleran herbisida, serta untuk memodifikasi kualitas tanaman. Ketahanan terhadap cekaman biotik meliputi berbagai organisme pengganggu tumbuhan seperti serangga hama, nematoda parasit tanaman, cendawan patogen, bakteri patogen, dan virus patogen (Herman 1996). Toleran terhadap cekaman abiotik meliputi antara lain toleran kekeringan, oksidatif, pembekuan, logam berat, dan toleran keracunan Al (Zhang *et al.* 2000, Uchimiya 2001). Sedangkan modifikasi kualitas tanaman meliputi sifat penundaan kemasakan, kandungan asam lemak tinggi, kandungan vitamin tinggi, perubahan warna pigmen bunga, kandungan amilosa rendah, buah tanpa biji/partenokarpi, dan peningkatan kandungan asam amino, serta peningkatan kandungan *anthocyanin* (Schuch *et al.* 1989, Kramer *et al.* 1989, Van de Krol *et al.* 1990, Greenberg dan Glick 1993, Altenbach *et al.* 1989, Ye *et al.* 2000, Vetten 2004, Butelli *et al.* 2008). Beberapa tanaman hasil rekayasa genetik seperti tanaman tahan nematoda parasit tanaman dan bakteri patogen, toleran kekeringan, padi emas, mawar biru, tomat ungu, pepaya dengan penundaan kemasakan, dan ubi kayu amilosa rendah masih dalam taraf litbang (Herman 2008). Meskipun demikian, sudah ada beberapa tanaman PRG yang dikomersialkan seperti tanaman PRG toleran herbisida, tahan serangga hama, tahan virus patogen, dan kandungan asam lemak tinggi (James 2007). Rekayasa genetik untuk perbaikan tanaman dijelaskan dengan lengkap dalam Bab II.

POTENSI DAN KETERBATASAN TEKNOLOGI REKAYASA GENETIK

Potensi Rekayasa Genetik

1. Isolasi dari gen yang mengandung sifat tertentu dapat dilakukan 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 diintroduksi ke dalam sel tanaman.
4. Sel tanaman PRG dapat diregenerasi menjadi tanaman dewasa dan fertil.
5. Rekayasa genetik membuka kemungkinan introduksi sifat baru ke varietas yang sudah ada, sehingga menambah keanekaragaman genetik.
6. Rekayasa genetik tidak mengenal batasan spesies, artinya gen-gen penting dari organisme apapun dapat digunakan untuk perbaikan sifat tanaman.

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 sel dan jaringan untuk regenerasi tanaman masih belum mencukupi.
4. Introduksi sesuatu gen ke dalam tanaman hasilnya tidak selalu dapat diduga.

Saran-Saran

Menyadari bahwa teknologi rekayasa genetik membutuhkan biaya mahal, tingkat kesulitan tinggi, dan sulit memperoleh konstruksi gen dari sifat yang diinginkan, maka diperlukan langkah-langkah sebagai berikut:

1. Pembinaan tenaga usia muda dalam bidang kultur jaringan dengan penekanan pada efisiensi regenerasi tanaman dan biologi molekuler, khususnya dalam teknik isolasi, kloning, dan karakterisasi gen.
2. Kerja sama internasional dengan berbagai institusi pemerintah maupun swasta yang mempunyai kompetensi dalam teknologi rekayasa genetik.

DAFTAR PUSTAKA

- Ambarwati, A.D., A. Sisharmini, T.J. Santoso, dan M. Herman. 2005.** Optimasi parameter teknik transformasi dengan gen *gus* melalui penembakan partikel pada ubi jalar. *Penelitian Pertanian* 24(1):40-45.
- Arencibia, A., P. Molina, G. de la Riva, and G. Selmán-Housein. 1995.** Production of transgenic sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by intact cell electroporation. *Plant Cell Rep.* 14:305-309.
- Argudo, M.I., R.M. Ruiz-Vázquez, and M.J. Francisco. 1996.** The structure of an ECF- σ -dependent, light-inducible promoter from the bacterium *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* 30(4):883-893.
- Asano, Y., Y. Otsuki, and M. Ugaki, 1991.** Electroporation-mediated and silicon carbide whisker-mediated DNA delivery in *Agrostis alba* L. (Redtop). *Plant Sci.* 9:247-252.
- Altenbach, S.B., K.W. Pearson, G.G. Meeker, L.C. Staraci, and S.M. Sun. 1989.** Enhancement of the methionine content of seed proteins by the expression of a chimeric gene encoding a methionine-rich protein in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* 13:513-522.
- Beck, E., G. Ludwig, E.A. Auerswald, B. Reiss, and H. Schaller. 1982.** Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene* 19:327-336.
- Bennet, J. 1993.** Genes for crop improvements. *Genetic Engineering* 16:93-113.
- Bower, R. and R.G. Birch, 1992.** Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. *Plant J.* 2:409-416.
- Butelli, E., L. Titta, M. Giorgio, H.P. Mock, A. Matros, S. Peterek, E.G.W.M. Schijlen, R.D. Hall, A.G. Bovy, J. Luo, and C. Martin. 2008.** Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. *Nature Biotechnology*, Published online: 26 October 2008. doi:10.1038/nbt.1506.
- Cheng, J., M.G. Bolyard, R.C. Saxena, and M.B. Sticklen. 1992.** Production of insect resistant potato by genetic transformation with a δ -endotoxingene from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Plant Sci.* 1:83-91.
- Callis, J., M. Fromm, and V. Walbot. 1988.** Heat inducible expression of a chimeric maize hsp70CAT gene in maize protoplasts. *Plant Physiol.* 88(4):965-968.
- Cheng, M., J.E. Fry, S.Z. Pang, H.P. Zhou, C.M. Hironaka, D.R. Duncan, W. Conner, and Y.C. Wan. 1997.** Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* 115:971-980.
- Christensen, A.H. and P.H. Quail. 1996.** Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Research* 5(3):213-218.
- Dale, E.C. and D.W. Ow. 1991.** Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88(23):10558-10562.
- Damayanti, D. 2005.** Introduksi gen *antisense* ACC oksidase untuk menunda pemasakan buah pepaya (*Carica papaya* L.) melalui penembakan partikel. Tesis Magister Sains. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.

- Darzins, A., L.L. Nixon, R.I. Vanags, and A.M. Chakrabarty. 1985.** Cloning of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* phosphomannose isomerase genes and their expression in alginate-negative mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 161(1):249-257.
- D'Halluin, K., E. Bonne, M. Bossut, and R. Le Page. 1999.** Transformation of maize via tissue electroporation. Methods Mol. Biol. 111:367-73.
- Dhir, S.K, S. Dhir, M.A. Savka, F. Belanger, A.L. Kriz, S.K. Farrand, and J.M. Widholm. 1992.** Regeneration of transgenic soybean (*Glycine max*) plants from electroporated protoplasts. Plant Physiol. 99(1):81-88.
- Eimert, K. and F. Siegemund. 1992.** Transformation of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*)-an experimental survey. Plant Mol. Biol. 19(3):485-90.
- Enríquez-Obregón, G.A., R.I. Vázquez-Padrón, D.L. Prieto-Samsónov, M. Pérez, and G. Selman-Housein. 1997.** Genetic transformation of sugarcane by *Agrobacterium tumefaciens* using antioxidants compounds. Biotecnología Aplicada 14:169-174.
- Enríquez-Obregón, G.A., R.I. Vázquez-padrón, D.L. Prieto-sansonov, G.A. de la Riva, and G. Selman-Housein. 1998.** Herbicide resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. Planta 206:20-27.
- Enriquez-Obregon, G.A., D.L. Prieto-Samsonov, G.A. de la Riva, M. Perez, G. Selman-Housein, and R.I. Vazquez-Padron. 1999.** *Agrobacterium*-mediated Japonica rice transformation: A procedure assisted by an anti-necrotic treatment. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 59:159-168.
- Fernández, D.S.R. 2003.** Establishment of a genetic transformation method of coffee (*Coffea arabica* cv. *Catimor*) and incorporation of bar gene for ammonium glufosinate resistance. Acta Cient Venez. 54(4):284-287.
- Fromm M.E., 1994.** Production of transgenic maize plants by microprojectile-mediated gene transfer. In Freelin, M. and V. Walbot (Eds.). The Maize Handbook, Springer-Verlag. New York p. 677-684.
- Frame, B.R., P.R. Drayton, S.V. Bagnall, C.J. Lewnau, W.P. Bullock, H.M. Wilson, J.M. Dunwell, J.A. Thompson, and K. Wang, 1994.** Production of fertile transgenic maize plants by silicon carbide whisker-mediated transformation. Plant J. 6:941-948.
- Fromm, M.E., L.P. Taylor, and V. Walbot. 1986.** Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. Nature 319:791-793.
- Genetically Engineered Organisms-Public Issues Education Project (GEO-PIE). 2003.** How does genetically engineered herbicide resistance work? Genetically Engineered Organisms. Cornell Cooperative Extension. Department of Communication. Kennedy Hall. Cornell University, Ithaca, NY 14853. Available <http://www.geo-pie.cornell.edu/traits/herbres.html>.
- Greenberg, B.M. and B.R. Glick. 1993.** The use of recombinant DNA technology to produce genetically modified plants. In Gierson, D. (Ed.). Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology. CRC Press, Inc. New York. p. 1-10.
- Haldrup, A., M. Noerremark, and F.T. Okkels. 2001.** Plant selection principle based on xylose isomerase. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 37:114-119.
- Hautea, D.M., V.M. Aquino, P.M. Magdalita, L.M. Dolores, H.F. Galvez, L.D. Valencia, T.B. de Leon, and A.O. Canama. 2003.** *Agrobacterium*-mediated transformation of Philippine papaya for PRSV resistance. Technical and Coordination Meeting for the Papaya Biotechnology Network of Southeast Asia. Bangkok, 15-16 December 2003. ISAAA.
- Herman, M. 1996.** Rekayasa genetik untuk perbaikan tanaman. Buletin AgroBio 1(1): 24-34.

- Herman, M. 2008.** Aplikasi bioteknologi dalam pengelolaan sumber daya genetik. Materi disampaikan pada Diskusi Panel "Pengelolaan Sumber Daya Genetik Pertanian untuk Mendukung Ketahanan Pangan". Komisi Nasional Sumber Daya Genetik. Cianjur, 7 Agustus 2008.
- Herman, M., E. Sofiari, E. Suryaningsih, A.D. Ambarwati, E. Listanto, S. Wijayanti, and H. Purwanti. 2007.** Annual report of product development of late blight resistant (LBR) potato in Indonesia. USAID/ABSP II. Cornell University. Ithaca, NY. USA 2007.
- Hernandez, G., F. Cannon, and M. Cannon. 1986.** The effect of presumptive polyadenylation signals on the expression of the CAT gene in transgenic tobacco. *Plant Cell Rep.* 8(4):195-198.
- Hideo, K. and S. Hiroaki. 2005.** Expression of the firefly Luciferase gene. *Transgenic Plants Journal of Memoirs of Fukui University of Technology* 35:191-196.
- Hinchee, M.A.W., D.V. Connor-Ward, C.A. Newell, R.E. MC. Donell, S.J. Sato, C.S. Gasser, D.A. Fischhoff, D.B. Re, R.T. Fraley, and R.B. Horsch. 1988.** Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium* mediated DNA transfer. *Bio/Technol.* 6:915-922.
- Hinchee, M.A.U., S.R. Padgett, G.M. Kishore, X. Delannay, and R.T. Fraley. 1993.** Herbicide tolerant crops. *In* Kung, S.D. and R. Wu (Eds.). *Transgenic Plants. Engineering and utilization.* Acad. Press. New York NY. 1:243-263.
- Hoffman, M.P., F.G. Zalom, L.T. Wilson, J.M. Smilananick, L.D. Malyj, J. Kiser, V.A. Hider, and W.M. Barnes. 1992.** Field evaluation of transgenic tobacco containing a *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein gene. *J. Economic Entomol.* 85(5):1651-1659.
- Ishida, Y., H. Saito, S. Ohta, Y. Hiei, T. Komari, and T. Kumashiro. 1996.** High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnol.* 4:745-750.
- James, C. 2007.** Global review of commercialized Biotech/GM crops: 2007. *ISAAA Brief No. 37.* ISAAA, Ithaca, NY.
- Jefferson, R.A. 1989.** The GUS reporter gene system. *Nature* 342:837-838.
- Jefferson, R.A, T. Kavanagh, and B.W. Bevan. 1987.** GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6:3901-3907.
- Jin, S.H., X.Y. Wong, N.Y. Wang, X.Q. Li, W.H. Mao, and D.A. Jiang. 2004.** Construction of expression vector with antisense Rubisco activase gene and its genetic transformation in rice. *Yi Chuan* 26(6):881-886.
- Jinjiang, D., W. Teng, W.G. Buchholz, and T.C. Hall. 1996.** *Agrobacterium*-mediated transformation of Javanica rice. *Mol. Breed.* 2(3):267-276.
- Joersbo, M. and J. Brunstedt. 1991.** Electroporation mechanism and transient expression, stable transformation and biological effects in protoplast. *Physiologia Plantarum* 81:256-264.
- Kaeppler, H.F. and D.A. Somers, 1994.** DNA delivery to maize cell cultures using silicon carbide fibers. *In* Freeling, M. and V. Walbot (Eds.). *The Maize Handbook.* Springer-Verlag, New York. p. 610-613.
- 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 Rep.* 9:415-418.
- Kaeppler, H.F., D.A. Somers, H.W. Rines, and A.F. Cockburn, 1992.** Silicon carbide fiber-mediated stable transformation of plant cells. *Theor. Appl. Genet.* 84:560-566.

- Kent, L. 2003.** The development of transgenic sweet potato resistant to Sweet Potato Feathery Mottle Virus. The Workshop on Agricultural Assessment in Indonesia: the Role for Biotechnology. Novotel Coralia Bogor, Indonesia. August 4-5, 2003.
- Klein, T.M., M. Fromm, A. Weissinger, D. Tomes, S. Scahaa, M. Sletten, and J. Sanford. 1988.** Transformation of maize cells using high velocity microprojectile. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4305-4309.
- Klein T.M., L. Kornstein, M.E. Fromm, and J.C. Sanford, 1989.** Genetic transformation of maize cells by particle bombardment. *Plant Physiol.* 91: 440-444.
- Kramer, M., R.E. Sheehy, and W.R. Hiatt. 1989.** Progress towards the genetic engineering of tomato fruit softening. *Trends Biotechnol.* 7:191-195.
- Krattiger, A.F. 1997.** Insect resistance in crops: A case study of *Bacillus thuringiensis* (Bt) and its transfer to developing countries. ISAAA Brief No. 2. ISAAA, Ithaca, NY.
- Lawton, R., S. Winfield, H. Danniell, A.S. Bhagsari, and S.K. Dhir. 2000.** Expression of green-fluorescent protein gene in sweet potato tissues. *Plant Mol. Biol. Rep.* 18:139a-139i.
- Lazzeri, P.A. 1995.** Stable transformation of barley via direct DNA uptake. Electroporation-and PEG-mediated protoplast transformation. *Methods Mol. Biol.* 49:95-106.
- Lesley, S.A., S.B. Jovanovich, Y.C. Tse-Dinh, and R.R. Burgess. 1990.** Identification of a heat shock promoter in the topA gene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 172(12):6871-6874.
- Levin, B. 1994.** *Genes V.* Oxford University Press and Cell Press. USA. 1272 p.
- Li, F., J. Weining, B. Weonhye, and I. Masayori. 1997.** Promoter-independent cold-shock induction of *cspA* and its derepression at 37°C by mRNA stabilization. *Mol. Microbiol.* 23(2):355-364.
- Lyznik, I.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.
- Mass, C. and W. Wir. 1989.** Mechanism and optimized conditions for PEG mediated DNA transfection into plant protoplast. *Plant Cell Rep.* 8:148-151.
- May, G.D., R. Afza, H.S. Mason, A. Wiecko, F.J. Novak, and C.J. Arntzen. 1995.** Generations of transgenic Banana (*Musa acuminata*) plants via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Bio/Technol.* 13:486-492.
- 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.
- 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/Technol.* 8:1041-1045
- Negrotto, D., M. Jolley, S. Beer, A.R. Wenck, and G. Hansen. 2000.** The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation. *Plant Cell Rep.* 19(8):798-803.
- Nitz, I., H. Berkefeld, P.S. Puzio, and F.M. Grundler. 2001.** Pyk10, a seedling and root specific gene and promoter from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.* 161(2):337-346.
- Ohta, T., K. Honda, K. Saito, H. Hayashi, H. Tano, T. Hamamoto, and Y. Kagawa. 1993.** Heat shock promoter of thermophilic chaperonin operon. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 19(2):550-557.

- Ow, D.W., J.R. de Wet, D. R. Helsinski, S.H. Howell, K.V. Wood, and M. Deluca. 1986. Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. *Science* 234(4778):856-859.
- Pardal, J.P., G.A. Wattimena, H. Aswidinnoor, dan M. Herman. 2005. Transformasi genetik kedelai dengan gen *proteinase inhibitorI* menggunakan teknik penembakan partikel. *Jurnal Agrobiogen* 1(2):53-61.
- Patent Lens (PL). 2007. Promoters used to regulate gene expression. <http://www.bios.net/daisy/promoters/242/g2/266.html>.
- 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 Rep.* 9:168-172.
- Perl, A., O. Lotan, M. Abu-Abied, and D. Holland. 1996. Establishment of an *Agrobacterium*-mediated transformation system for grape (*Vitis vinifera* L.): The role of antioxidants during the grape-*Agrobacterium* interactions. *Nature Biotechnol.* 14:624-628.
- Peter, J.M., Van den Elzen, J. Townsend, K.Y. Lee, and J.R. Bedbrook. 1985. Chimaeric hygromycin resistance gene as a selectable marker in plant cells. *Plant Mol. Biol.* 5(5):299-302.
- Poulsen, C., R. Fluhr, J.M. Kauffman, M. Boutry, and N.-H. Chua. 1986. Characterization of an *rbcs* gene from *Nicotiana plumbaginifolia* and expression of an *rbcs*-CAT chimeric gene in homologous and heterologous nuclear background. *Mol. Gen. Genet.* 205:193-200.
- Rao, K.V., K.S. Rathore, T.K. Hodges, X. Fu, E. Stoger, D. Sudhakar, S. Williams, P. Christou, M. Bharathi, D.P. Brown, K.S. Powell, J. Spence, A.M.R. Gatehouse, and J.A. Gatehouse. 1998. Expression of snowdrop lectin (GNA) in transgenic rice plants confers resistance to rice brown planthopper. *Plant J.* 15(4):469-477.
- Rasmussen, J.L., J.R. Kikkert, M.K. Roy, and J.C. Sanford. 1994. Biolistic transformation of tobacco and maize suspension cells using bacterial cells as microprojectiles. *Plant Cell Rep.* 13:212-217.
- Reed, J., L. Privalle, M.L. Powell, M. Meghji, J. Dawson, E. Dunder, J. Suttle, A. Wenck, K. Launis, C. Kramer, Y. Chang, G. Hansen, and M. Wright. 2001. Phosphomannose isomerase: An efficient selectable marker for plant transformation. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 37:127-132.
- Riggs, C.D. and B.W. Bates. 1986. Stable transformation of tobacco by electroporation: evidence for plasmid concatenation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83(15):5602-5606.
- Schuch, W., C.R. Bird, J. Ray, C.J. Smith, C.F. Watson, P.C. Morris, J.E. Gray, C. Arnold, G.B. Seymour, G.A. Tucker, and D. Grierson. 1989. Control and manipulation of gene expression during tomato fruit ripening. *Plant Mol. Biol.* 13:303-309.
- Siegemund, F. and K. Eimert. 1995. Electroporation of *Brassica*. *Methods Mol. Biol.* 55:109-120.
- Sisharmini, A., A.D. Ambarwati, T.J. Santoso, M. Herman, dan G.A. Wattimena. 2005. Optimasi transformasi genetik ubijalar melalui vektor *Agrobacterium tumefaciens*. *Penelitian Pertanian* 24(2):104-109.
- Sticklen, M.B. 1991. Direct somatic embryogenesis and fertile plants from rice root cultures. *Plant Physiol.* 138:577-580.
- Tanabe, H.J. Goldstein, M. Yang, and M. Inouye. 1992. Identification of the promoter region of the *Escherichia coli* major cold shock gene, *cspA*. *J Bacteriol.* 174(12):3867-3873.

- Uchimiya, H. 2001.** Annex II Genetic engineering for abiotic stress tolerance in plants. FAO Document Repository: Applications of Molecular Biology and Genomics to Genetic Enhancement of Crop.
- US Patent (USP). 2007.** Seed-specific promoter from the rice glutelin GluB-1 gene and uses thereof. <http://www.patentstorm.us/patents/7192774.html>.
- 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.
- Van Haaren, M.J. and C.M. Houck. 1993.** A functional map of the fruit-specific promoter of the tomato 2A11 gene. *Plant Mol. Biol.* 21(4):625-640.
- Vetten, Nick de. 2004.** Permohonan pengujian ubi kayu transgenik amilosa rendah dan toleran herbisida produk AVEBE Cooperative Co. Belanda. Presentasi dalam sidang Tim Teknis Keamanan Hayati dan Keamanan Pangan Kelompok Tanaman Desember 2004.
- Wang, K., P.R. Drayton, B.R. Frame, J.M. Dunwell, and J.A. Thompson, 1995.** Whisker-mediated plant transformation: An alternative technology. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 31(2):101-104.
- Watson, J.D., M. Gilman, J. Witkowski, and M. Zoller. 1992.** Recombinant DNA. Scientific American Book. New York. NY. 626 p.
- Whitworth, D.E., S.J. Bryan, A.E. Berry, S.J. McGowan, and D.A. Hodgson. 2004.** Genetic dissection of the light-inducible *carQRS* promoter region of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* 186(23):7836-7846.
- Winfield, S., R. Lawton, H. Daniell, and S.K. Dhir. 2001.** Transformation of sweet potato tissues with green-fluorescent protein gene. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 37(5):648-653.
- World Intellectual Property Organization (WIPO). 2006.** Root specific and xylem parenchyma specific promoter. <http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?wo=2006024291>.
- Ye, X., S. Al-Babili, A. Klöti, J. Zhang, P. Lucca, P. Beyer, and I. Potrykus. 2000.** Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 287:303-305.
- Zhang, J., N.Y. Klueva, Z. Wang, R. Wu, T.H. David Ho, and H.T. Nguyen. 2000.** Genetic engineering for abiotic stress resistance in crop plants. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 36(2):108-114.
- Zhong, H., C. Srinivasan, and M.B. Sticklen. 1991.** Plant regeneration via somatic embryogenesis in creeping bent grass (*Agrostis palustris* Huds.). *Plant Cell Rep.* 10:453-456.
- 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.
- Zhou, L.Y., D.G. Jiang, H. Wu, C.X. Zhuang, Y.G. Liu, and M.T. Mei. 2005.** Development of transformation system of rice based on transformation-competent artificial chromosome (TAC) vector. *Yi Chuan Xue Bao* 32(5):514-8.

Bab II. Rekayasa Genetik untuk Perbaikan Tanaman

Masalah utama yang dihadapi dalam usaha pertanian adalah terjadinya cekaman biotik dan abiotik, seperti serangga hama, nematoda parasit, dan penyakit tanaman; serta cekaman abiotik seperti kekeringan, pembekuan dan suhu rendah, salinitas, oksidatif, dan cekaman logam berat. Perakitan tanaman tahan hama atau penyakit secara konvensional dapat dilakukan melalui pemuliaan tanaman, tetapi sumber gen ketahanan terhadap cekaman tersebut terbatas atau sering tidak dijumpai dalam sumber daya genetik (SDG) yang tersedia. Bioteknologi melalui rekayasa genetik dapat membuka peluang untuk mengisolasi gen ketahanan dari organisme lain seperti bakteri, virus atau dari tanaman yang secara konvensional tidak dapat dilakukan. Gen eksogenous (dari luar spesies) yang sudah dikonstruksikan bisa dipindahkan ke dalam tanaman budi daya yang diinginkan.

Beberapa contoh gen yang dapat dimanfaatkan untuk perbaikan tanaman melalui rekayasa genetik adalah gen ketahanan terhadap cekaman biotik, toleran cekaman abiotik, gen toleran herbisida, dan gen untuk memodifikasi kualitas dari suatu produk tanaman (Bennet 1993). Penelitian rekayasa genetik untuk memproduksi tanaman tahan serangga hama, nematoda parasit, dan penyakit tanaman difokuskan pada protein-protein yang mengandung kode gen tunggal (Greenberg dan Glick 1993, Herman 1996, Herman 1997). Demikian pula penggunaan gen tunggal untuk memodifikasi kualitas dari suatu produk tanaman (Bennet 1993). Dalam bab ini akan dijelaskan peran teknologi rekayasa genetik untuk perbaikan tanaman baik untuk memperoleh ketahanan terhadap cekaman biotik, toleran terhadap cekaman abiotik, toleran herbisida, maupun untuk memodifikasi kualitas tanaman. Selain itu akan diuraikan tentang gen-gen interes (donor) yang digunakan dalam perakitan tanaman PRG dan tanaman PRG yang berhasil dirakit baik dalam taraf penelitian dan pengembangan (di rumah kaca, rumah kasa, dan atau lapangan terbatas), maupun tanaman PRG yang berhasil dikomersialkan. Secara lengkap perbaikan sifat atau karakter tanaman dengan teknik rekayasa genetik dan statusnya disajikan pada Tabel 1.

TAHAN TERHADAP CEKAMAN BIOTIK

Cekaman biotik yang dibahas dalam bagian ini adalah serangga hama, nematoda parasit tanaman, dan penyakit tanaman. Penyakit tanaman terdiri dari cendawan, bakteri, dan virus patogen. Kegiatan penelitian dengan tujuan merakit tanaman PRG tahan cekaman biotik telah dilakukan oleh beberapa kelompok peneliti (Rao *et al.* 1998, Quemada 1998, Urwin *et al.* 1998, Tabei *et al.* 1998, Vidya *et al.* 2000, Urwin *et al.* 2000a, Melchers dan Stuiver 2000, Datta *et al.* 2001, Urwin *et al.* 2002b, Atkinson *et al.* 2003, Grover dan Gowthaman 2003, Song *et al.* 2003, Chen *et al.* 2006, Huang *et al.* 2006).

Tahan Serangga Hama (TSH)

Beberapa gen yang digunakan dalam perakitan tanaman PRG TSH antara lain: Bt *endotoxins* (Cheng *et al.* 1992, Krattiger 1997); *proteinase inhibitor (pin)* (Ryan 1990,

REKAYASA GENETIK UNTUK PERBAIKAN TANAMAN

Table 1. Perbaikan sifat/karakter tanaman dengan teknik rekayasa genetik dan statusnya.

Perbaikan sifat/karakter tanaman	Contoh tanaman PRG	Status
Tahan cekaman biotik		
- TSH	Jagung Bt	Komersial
- TSH	Kapas Bt	Komersial
- TSH	Kentang Bt	Komersial atau litbang
- TSH	Padi Bt	Komersial atau litbang
- TNPT	Kentang PRG	Litbang
- TNPT	Tomat PRG	Litbang
- TNPT	Tembakau PRG	Litbang
- TCP	Kentang PRG	Litbang
- TCP	Padi PRG	Litbang
- TBP	Kentang PRG	Litbang
- TBP	Padi PRG	Litbang
- TVP	Pepaya PRG	Komersial atau litbang
- TVP	Labu PRG	Komersial
Toleran cekaman abiotik dan herbisida		
- TK	Padi PRG	Litbang
- TK	Gandum PRG	Litbang
- TS	Padi PRG	Litbang
- TS	<i>Arabidopsis</i> PRG	Litbang
- TO	Tembakau PRG	Litbang
- TO	<i>Arabidopsis</i> PRG	Litbang
- TP	Alfalfa PRG	Litbang
- TP	Tomat PRG	Litbang
- TLB	<i>Arabidopsis</i> PRG	Litbang
- TKA	Padi PRG	Litbang
- TKA	Jagung PRG	Litbang
- TH	Kedelai PRG	Komersial
- TH	Jagung PRG	Komersial
- TH	Kanola PRG	Komersial
- TH	Kapas PRG	Komersial
Modifikasi kualitas		
- PK	Tomat PRG	Komersial
- PK	Pepaya PRG	Litbang
- KALT	Kedelai PRG	Komersial
- KALT	Kapas PRG	Litbang
- KALT	Kanola PRG	Komersial
- PKVA	Padi emas	Litbang
- PWBP	<i>Carnation</i>	Komersial
- PWBP	Mawar biru	Litbang
- AR	Kentang	Komersial
- AR	Ubi kayu	Litbang
- TB/P	Terong	Litbang
- TB/P	Tomat	Litbang
- PKAA	Tembakau	Litbang
- PKA	Tomat ungu	Litbang

PRG = produk rekayasa genetik, TSH = tahan serangga hama, TNPT = tahan nematoda parasit tanaman, TCP = tahan cendawan patogen, TBP = tahan bakteri patogen, TVP = tahan virus patogen, TK = toleran kekeringan, TS = toleran salinitas, TO = toleran oksidatif, TP = toleran pembekuan, TLB = toleran logam berat, TKA = toleran keracunan Al, TH = toleran herbisida, PK = penundaan kemasakan, KALT = kandungan asam lemak tinggi, PKVA = peningkatan kandungan vitamin A, PWBP = perubahan warna pigmen bunga, AR = amilosa rendah, TB/P = tanpa biji/partenokarpi, PKAA = peningkatan kandungan asam amino, PKA = peningkatan kandungan *anthocyanin*, Litbang = penelitian dan pengembangan.

Johnson *et al.* 1989), *cowpea trypsin inhibitor* (Hoffman *et al.* 1992), *GNA*, yaitu gen yang mengkode *snowdrop lectin Galanthus nivalis* agglutinin (Rao *et al.* 1998), dan *amylose inhibitor* (Ishimoto *et al.* 1996, Schroeder *et al.* 1995, Shade *et al.* 1994). Tanaman PRG TSH yang telah dikomersialkan dan dalam taraf penelitian adalah tanaman TSH yang mengandung gen Bt. Sehubungan dengan itu pada bagian ini akan diuraikan dengan jelas perihal gen Bt.

1. Gen yang berasal dari *Bacillus thuringiensis*

a. Gen Bt atau *cry*

Gen Bt adalah hasil isolasi bakteri tanah *B. thuringiensis*. *B. thuringiensis* telah digunakan oleh petani di negara maju sebagai pestisida hayati yang aman sejak puluhan tahun yang lalu (Shadduck 1983, McClintock *et al.* 1995). Istilah populer *cry* (Held *et al.* 1982) merupakan singkatan dari *crystal* sebagai representasi gen dari strain Bt yang memproduksi protein kristal yang bekerja seperti insektisida (*insecticidal crystal protein*) yang dapat mematikan serangga hama (MacIntosh *et al.* 1990). Menurut Rajamohan dan Dean (1995), Krattiger (1997), Crickmore *et al.* (1998), sampai saat ini telah diisolasi gen Bt yang dimasukkan ke dalam delapan kelompok atau kelas *cry* (Tabel 2).

Kelas *cry* tersebut dikelompokkan berdasarkan virulensi yang spesifik terhadap kelompok serangga sasaran (Rajamohan dan Dean 1995, Krattiger 1997, Crickmore *et al.* 1998). Sebagai contoh *cry1*, *cry9*, dan *cry10* mematikan serangga golongan Lepidoptera. Kristal protein tersebut hanya akan bekerja secara aktif apabila bertemu sinyal penerima (*receptor*) di dalam usus serangga dari golongan yang sesuai dengan kelas virulensinya, misalnya *cry1* hanya bisa aktif dan beracun pada serangga golongan Lepidoptera (Van Rie *et al.* 1990). Oleh karena itu secara teori tanaman PRG yang

Tabel 2. Klasifikasi kristal protein (*cry*) *Bacillus thuringiensis* berdasarkan spesifikasi virulensinya terhadap serangga dan nematoda.

Kelas <i>cry</i>	Subklas	Contoh	Golongan serangga atau nematoda sasaran
1	A-G	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1Cb, cry1F</i>	Lepidoptera
2	A	<i>cry2A</i>	Lepidoptera dan Diptera
	B	<i>cry2B</i>	Lepidoptera
	C	<i>cry2C</i>	Lepidoptera
3	A	<i>cry3A</i>	Coleoptera
	B	<i>cry3B</i>	Coleoptera
	C	<i>cry3C</i>	Coleoptera
4	A-D	<i>cry4B, cry4C</i>	Diptera
5	-	<i>cry5</i>	Lepidoptera dan Coleoptera
6	-	<i>cry6</i>	Nematoda
9	-	<i>cry9</i>	Lepidoptera
10	-	<i>cry10</i>	Lepidoptera

Sumber: Rajamohan dan Dean (1995).

mengandung gen *cry1* tidak akan beracun terhadap serangga berguna atau hewan lainnya, kecuali terhadap serangga Lepidoptera.

Semua gen yang menyandi 130-140 kDa *protoxin* dan aktif terhadap larva Lepidoptera digolongkan ke dalam klas *cry1* yang selanjutnya dibagi dalam beberapa subklas A sampai G. Menurut Rajamohan dan Dean (1995), Krattiger (1997), Crickmore *et al.* (1998), berdasarkan pada identitas asam aminonya (>80%), subklas gen *cry1A* dibagi menjadi IA(a), IA(b), dan IA(c). Tipe gen subklas *cry2* yang memproduksi 66 kDa *protoxin* aktif terhadap Lepidoptera (*cry2B*) saja atau aktif pada larva Lepidoptera dan Diptera (*cry2A*). Gen *cry3* menghasilkan 73 kDa protein aktif terhadap larva Coleoptera. Secara umum, protein *cry1* bersifat meracuni hama serangga dari kelompok Lepidoptera (larva dan imago). Tetapi *cry1B(a)* juga dapat meracuni serangga dari kelompok Coleoptera, meskipun tingkat toksisitasnya terhadap *Colorado potato beetle* (*Leptinotarsa decemlineata* Say, CPB) masih lebih rendah dibandingkan dengan *cry3A(a)* (Bradley *et al.* 1995). Tailor *et al.* (1992) melaporkan bahwa *cry1I(a)* mempunyai daya meracuni lebih kuat terhadap CPB. Gen hibrida *SN19* adalah penggabungan *cry1B(a)* dengan *cry1I(a)*. Gen hibrida tersebut dikonstruksi oleh Naimov *et al.* (2001). Protein *cry1B(a)* *cry1I(a)* dilaporkan oleh Van Frankenhuyzen dan Nystrom (2002) mempunyai tingkat toksisitas tinggi terhadap *European corn borer* (*Ostrinia nubilalis*, ECB) dan *potato tuber moth* (*Phthorimaea operculella*, PTM).

Gen tipe *cry4* telah diisolasi dari subspecies *israelensis* dan menghasilkan 135, 128, 74, dan 72 kDa protein aktif terhadap larva Diptera. Gen baru telah diisolasi dari *B. thuringiensis* subsp. *thompsoni* dan diberi nama *cry5* (Rajamohan dan Dean 1995, Krattiger 1997, Crickmore *et al.* 1998). Gen tersebut menghasilkan toxin 80 kDa dan aktif terhadap Lepidoptera dan Coleoptera. Gen yang aktif terhadap nematoda dimasukkan ke dalam klas *cry6*.

Dari penelitian yang ada, umumnya tanaman tahan serangga yang berhasil ditransformasi berasal dari gen *cry* Bt yang bersifat meracuni hama serangga dari kelompok Coleoptera atau Lepidoptera (Barton *et al.* 1987, Cheng *et al.* 1992, Delannay *et al.* 1989, Perlak *et al.* 1993, Warren *et al.* 1992, Wilson *et al.* 1992). Kristal δ -endotoksin Bt adalah protein yang dapat berfungsi sebagai insektisida. Cara bekerja (*mode of action*) kristal δ -endotoksin Bt adalah sebagai berikut: protein (protoksin) tersebut akan diaktifkan oleh protease dalam usus tengah (*midgut*) larva serangga. Toksin yang sudah aktif berinteraksi dan menempel pada *receptor* di sel-sel *epithelial* usus tengah serangga yang menyebabkan terganggunya integritas membran dan membuat lubang sehingga terjadi kebocoran (Gill *et al.* 1992, Knowles *et al.* 1993).

Hasil penelitian Perlak *et al.* (1991), menunjukkan bahwa gen *cryBt* tipe liar (*wild type*) yang ditransformasi ke tanaman ternyata mengekspresikan ketahanan yang rendah terhadap serangga. Hal tersebut dihipotesiskan bahwa penggunaan *codon* dari gen *cryBt* (yang diisolasi dari bakteri) dikelabui oleh keharusan untuk meng-

ekspresikan dalam sel bakteri, sehingga ekspresinya tidak optimum dalam sel tanaman (Perlak *et al.* 1991). Kendala ini dipecahkan dengan mensintesis urutan (*sequence*) gen secara kimiawi untuk menghilangkan banyaknya urutan *adenin thymine* (AT)-rich. Banyaknya urutan (AT) menyebabkan tidak stabilnya mRNA dari tanaman PRG. Hasil percobaan tanaman PRG dengan gen Bt sintetis menunjukkan peningkatan ekspresi keefektifan ketahanan terhadap serangga antara 10-100 kali (Perlak *et al.* 1991).

Gen Bt *cry5* berhasil ditransformasikan ke dalam kentang dan menghasilkan kentang PRG tahan PTM (*potato tuber moth*, *P. operculella*) di *Michigan State University* (MSU), Amerika Serikat (Douches *et al.* 2002, Brenner 2004). Kentang PRG tahan PTM tersebut telah diuji ketahanannya terhadap PTM di lapangan uji terbatas di Mesir (Brenner 2004) dan di fasilitas uji terbatas di Indonesia (Fagi dan Herman 1998).

Naimov *et al.* (2003) mentransformasikan gen hibrida *SN19* (gabungan *cry1B*(a) dengan *cry1I*(a)) ke dalam genom kentang varietas Desiree. Kentang PRG tersebut ternyata menunjukkan ketahanan terhadap *Colorado potato beetle* (*L. decemlineata*) dan PTM.

b. Gen Vip

Selain gen Bt dari *B. thuringiensis* yang berupa gen *cry*, ada gen Vip (*vegetative insecticidal protein*) yang juga berfungsi sebagai insektisida. Gen Vip juga berasal dari *B. thuringiensis*, meskipun secara struktur dan fungsi berbeda dengan gen *cry* δ -endotoxins (Estruch *et al.* 1996, Yu *et al.* 1997, Warren 1997). Protein Vip disekresikan oleh *B. thuringiensis* pada waktu fase pertumbuhan vegetatif, sedangkan protein *cry* membentuk spora pada fase sporulasi *B. thuringiensis*. Racun Vip3A adalah protein yang berukuran 88 kDa. Protein tersebut disekresikan oleh *B. thuringiensis* ke medium kultur dan menunjukkan tingkat toksisitas yang tinggi terhadap berbagai serangga Lepidoptera (Estruch *et al.* 1996).

Lee *et al.* (2003) melakukan penelitian tentang cara bekerja racun Vip3A. Bioasai diperlakukan terhadap *European corn borer* (*O. nubilalis*), *black cutworm* (*Agrotis ipsilon*), *fall armyworm* (*Spodoptera frugiperda*), dan *Danaus plexippus* (Monarch butterfly). Hasil bioasai menunjukkan bahwa Vip3A paling beracun terhadap *A. ipsilon* dan *S. frugiperda*, tetapi tidak berdampak beracun terhadap *O. nubilalis* dan *D. plexippus* (Lee *et al.* 2003). Artinya *O. nubilalis* dan *D. plexippus* tahan terhadap racun Vip3A.

Seperti halnya pada gen *cry*, protein Vip3A akan diaktifkan oleh protease dalam usus tengah larva serangga. Vip3A menempel pada usus tengah yang berfungsi sebagai molekul sinyal penerima. Molekul *receptor* Vip3A tersebut berukuran 80 kDa dan 100 kDa yang berbeda dengan molekul *receptor*nya *cry1A*(b). *Cry1A*(b) menempel pada *receptor* molekul berukuran 120 kDa *aminopeptidase N* (APN)-like dan 250 kDa

cadherinlike (Lee *et al.* 2003). Vip3A dapat membuat lubang pada usus tengah *A. ipsilon* dan *S. frugiperda* sehingga terjadi kebocoran, tetapi Vip3A tidak dapat membentuk lubang pada usus tengah *O. nubilalis* dan *D. plexippus* yang tahan terhadap Vip3A (Lee *et al.* 2003).

c. Tanaman PRG TSH dengan gen Bt yang sudah dikomersialkan

Tanaman PRG TSH mengandung gen Bt yang dikomersialkan secara global adalah jagung Bt, kapas Bt, kentang Bt, dan padi Bt (James 2005, 2006).

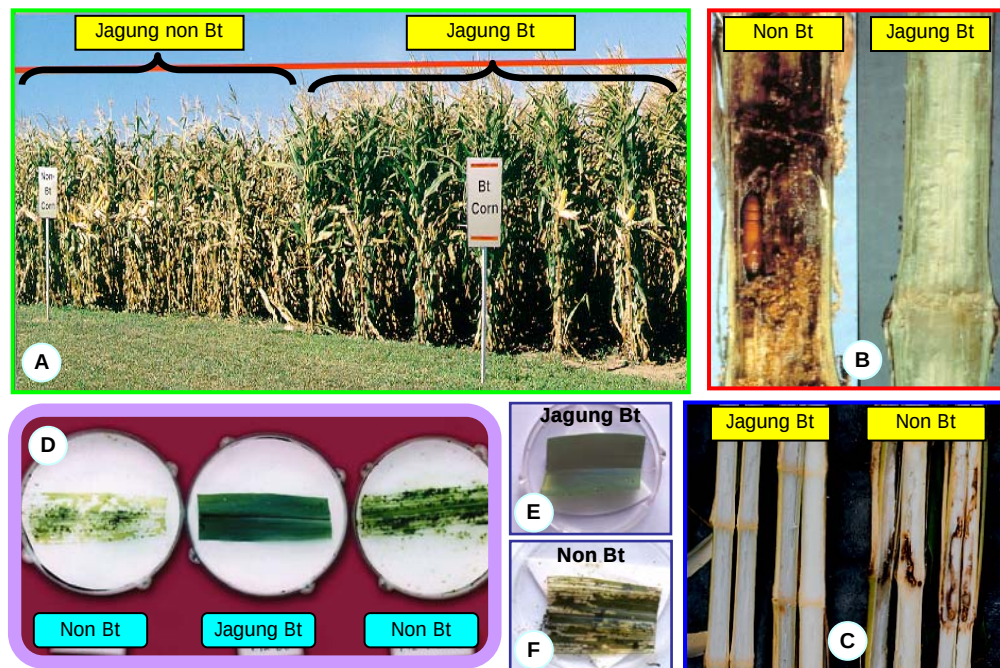
1) Jagung Bt

Menurut James (2003) tiga gen *cry* yang telah ditransformasikan ke tanaman jagung, yaitu *cry1A(b)*, *cry3B(b1)*, dan *cry1F(a2)*. Gen *cry1A(b)* diisolasi dari *B. thuringiensis* var. *kurstaki*; gen *cry3B(b1)* diisolasi dari *B. thuringiensis* var. *kumamotoensis*; dan gen *cry1F(a2)* diisolasi dari *B. thuringiensis* var. *aizawi*. Ketiga gen tersebut disetujui untuk digunakan pada jagung Bt untuk tujuan komersial (James 2003).

Jagung Bt ditujukan untuk mengendalikan serangga hama utama jagung. Hama utama tersebut adalah *Ostrinia furnacalis* (Asian corn borer = ACB), *O. nubilalis* (European corn borer = ECB), *Diabrotica* spp. (corn rootworm = CRW), *Helicoverva armigera* (corn earworm = CEW), *Spodoptera* spp. (armyworm = AW), *Agrotis* spp. (cutworm = CW), *Busseola fusca* (African stalk borer = ASB), dan *Chilo partellus* (spotted stem borer = SSB) (James 2003). Hasil pengujian jagung Bt di fasilitas uji terbatas (FUT) maupun lapangan terbatas menunjukkan ketahanan terhadap beberapa serangga hama utama (Gambar 1).

Pertama kali jagung Bt yang disetujui untuk dilepas dan dikomersialkan pada tahun 1995 adalah jagung Bt *event* 176 dengan nama dagang (ND) *knockout* yang mengandung gen *cry1A(b)* (James 2003). Tiga *event* jagung Bt yang mengandung gen *cry1A(b)*, yaitu MON810 dengan ND *yield gard* (R) *corn borer*, 176, dan Bt11 dengan ND *yield gard* (R) yang dikomersialkan secara global. Pada tahun 2002 dari ketiga *event* tersebut, *event* MON810 mendominasi pertanaman jagung Bt sampai 80% (James 2003).

Jagung Bt lain yang disetujui untuk dikomersialkan adalah *event* MON863 dengan ND *yield gard* (R) *rootworm* yang mengandung gen *cry3B(b1)* dan *event* TC1507 dengan ND *Herculex* (R) 1 (HX1) yang mengandung gen *cry1F(a2)*. Selain itu ada jagung Bt yang mengandung gen *cry* lain, yaitu *cry9C* yang berasal dari *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* (EPA 1998). Jagung Bt ini dikenal dengan ND Starlink dengan *event* CBH351. Jagung Bt tersebut ditujukan untuk mengendalikan ECB dan hanya disetujui di Amerika Serikat (AS) untuk digunakan sebagai pakan (EPA 1998).



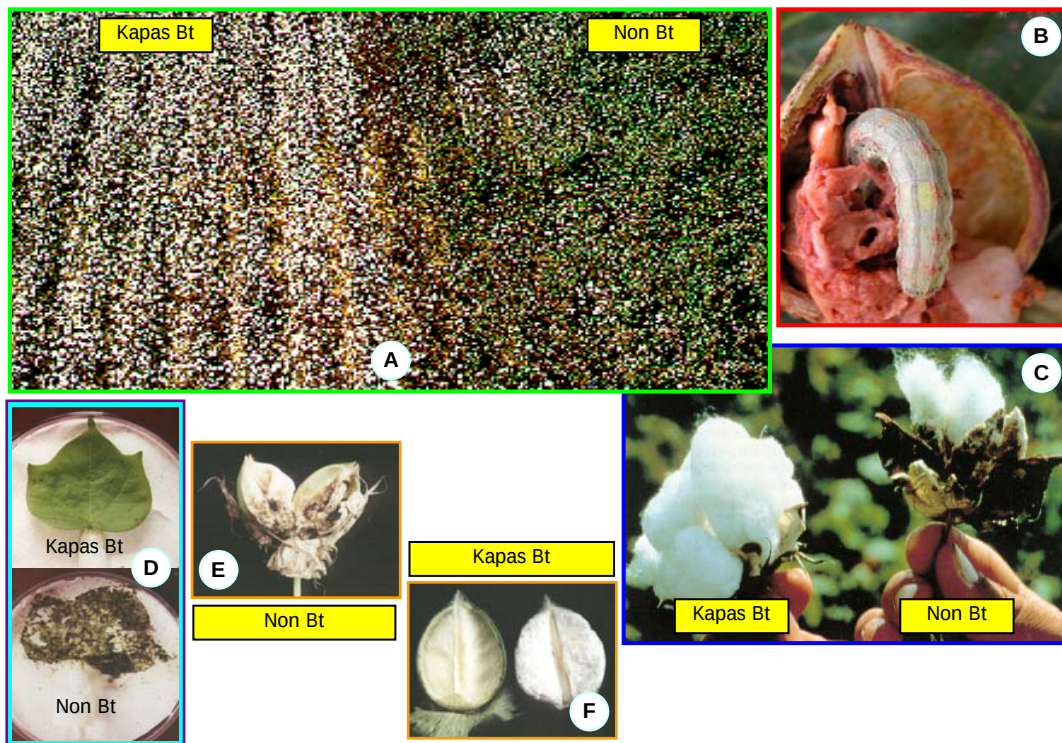
Gambar 1. Pengujian jagung Bt terhadap *European corn borer* (*O. nubilalis*) di lapangan uji terbatas (A) dan FUT (B dan C) di Amerika Serikat (Adiwilaga 1998); terhadap *O. furnacalis* (D) dan *H. armigera* (E dan F) di FUT di Indonesia (Herman et al. 2004).

2) Kapas Bt

Ada beberapa gen *cry* yang ditransformasikan ke kapas Bt dan disetujui untuk dikomersialkan, yaitu *cry1A(a)*, *cry1A(b)*, *cry1A(c)*, *cry1F*, dan *cry2A(b)* (Benedict dan Altman 2001, James 2002). Kapas Bt dengan *event* MON531 dan mengandung gen *cry1A(c)* dikenal dengan ND Bollgrad (James 2002). Kapas Bt ditujukan untuk mengendalikan serangga hama utama pada kapas, yaitu *H. armigera* (*cotton bollworm* = CBW), *Pectinophora gossypiella* (*pink bollworm* = PBW), *Earias* spp. (*spiny bollworm* = SPW), *Heliothis virescens* (*tobacco budworm* = TBW). Sebelum dilepas untuk tujuan komersialisasi kapas Bt telah diuji ketahanannya terhadap hama utama kapas khususnya CBW. Hasil bioasai di FUT dan di lapangan terbatas menunjukkan bahwa kapas Bt mempunyai ketahanan yang nyata terhadap CBW (Gambar 2).

3) Kentang Bt

Salah satu kendala utama pada produksi tanaman kentang adalah serangan hama. Hama utama pada tanaman kentang di AS adalah *potato tuber moth*, (*P. operculella*) dan *Colorado potato beetle* (*L. decemlineata*). Kentang PRG yang pernah ditanam secara komersial adalah kentang PRG yang mengandung gen



Gambar 2. Pengujian kapas Bt terhadap *Cotton boll worm* (*H. armigera*) di lapangan uji terbatas (A) di Amerika Serikat; serangan ulat *H. armigera* pada buah (B); kapas (C) (Adiwilaga 1998); pada daun (D); dan buah (E dan F) di FUT di Indonesia (Herman *et al.* 2004).

cry3A(a). Kentang Bt dengan gen *cry3A(a)* tersebut mempunyai ketahanan terhadap *Colorado potato beetle* (Perlak *et al.* 1993). Gen *cry3A(a)* berasal dari *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* (EPA 1995). Kentang Bt tersebut dikomersialkan di Amerika Serikat pada tahun 1998.

4) Padi Bt

Secara global, salah satu hama penting tanaman padi adalah penggerek batang padi. Penggerek batang padi (PBP) ada berbagai jenis, antara lain penggerek batang padi (PBP) putih (*Scirpophaga innotata* Wlk), PBP kuning (*S. incertulas* Wlk), PBP bergaris (*Chilo suppressalis*) (Pathak dan Khan 1994). Padi Bt dirakit untuk memperoleh ketahanan terhadap PBP. Padi Bt pertama kali dikomersialkan di Iran pada tahun 2005 (FAO 2007, Aguiba 2006, James 2006). Gen yang di-transformasikan ke genom padi adalah *cry1A(b)* untuk memperoleh ketahanan terhadap hama PBP (FAO 2007).

d. Tanaman PRG TSH dengan gen Bt generasi lanjut

Dalam rangka pengelolaan ketahanan serangga hama (*insect resistance management* = IRM), penggabungan dua gen *cry* (*stacked genes*) yang mempunyai cara bekerja (*mode of action*) telah dilakukan. Hal tersebut ditujukan untuk mencegah terjadinya kepatahan ketahanan atau resistensi dari tanaman PRG dengan gen Bt terhadap serangga target (James 2002, 2003). Dalam bagian ini dijelaskan dua contoh tanaman PRG TSH, yaitu jagung Bt dan kapas Bt, karena dua tanaman PRG tersebut telah dikomersialkan secara global di berbagai benua.

Tanaman PRG TSH generasi lanjut dengan *stacked genes* ada yang sudah dikomersialkan, tapi ada pula yang masih dalam taraf pengujian di lapangan terbatas untuk registrasi komersialisasi.

1) Jagung Bt

Jagung Bt generasi lanjut dikembangkan dengan menggabungkan dua gen Bt atau dengan memodifikasi gen Bt. Menurut James (2006), pada tahun 2004-2006, lima jagung Bt generasi lanjut telah siap dilepas. Salah satu di antaranya adalah jagung Bt dengan ND *yield gard* (R) plus. Jagung Bt yang dikembangkan oleh Monsanto ini mengandung gen *cry1A(b)* dan *cry3B(b1)* dan diharapkan dapat mengendalikan serangga hama penggerek batang jagung (*corn borer*) dan penggerek akar jagung (*corn root borer*). Jagung Bt lain adalah jagung *event* DAS-59122-7 yang mengandung gen *cry34A(b1)* dan *cry35A(b1)*, jagung Bt ini ditujukan untuk mengendalikan penggerek akar jagung dan toleran herbisida *glufosinate*. Jagung Bt ini dikembangkan oleh Dow AgroSciences dan bersama-sama dengan Pioneer Hi-Bred International/Dupont melepasnya pada tahun 2005 dengan ND Herculex RW (HXRW). Jagung tersebut digunakan sebagai alternatif pengendalian penggerek akar jagung, selain jagung Bt MON863 yang sudah beredar. Herculex (R) 1 (HX1) disilangkan dengan Herculex RW (HXRW) untuk memperoleh jagung Bt dengan *stacked gene* yang lain, yaitu Herculex XTRA (HXX) (James 2006).

Dua jagung Bt generasi lanjut yang lain dikembangkan oleh Syngenta (James 2003) dan dilepas pada tahun 2005-2006 (James 2006, 2007). Jagung Bt yang pertama mengandung gen *cry1A(b)* *full length* ditujukan untuk mengendalikan ECB yang dikenal dengan *event* Bt10. Jagung Bt kedua dengan *event* MIR604 mengandung gen baru, yaitu *cry3A(a)* *full length* yang telah dimodifikasi. Jagung Bt dengan *event* MIR604 ditujukan untuk mengendalikan penggerek akar jagung.

2) Kapas Bt

Bollgard generasi ke-II atau diberi nama Bollgard II telah dirakit dengan menggabungkan gen *cry1A(c)* dan *cry2A(b)* (James 2002). Bollgard II *event* 15985 dirakit dengan menembakkan gen *cry2A(b)* dengan sistem transformasi *particle bombardment* ke kapas DP50B yang telah mengandung gen *cry1A(c)* (Rahn *et al.*

2001). Kapas Bt lain yang menggabungkan dua gen Bt adalah WideStrike. Gen yang digabung dalam WideStrike adalah *cry1A(c)* dan *cry1F*. Bollgard II telah mendapatkan izin untuk komersialisasi di Amerika Serikat pada musim tanam 2003 (GKCCB 2003), sedangkan WideStrike dikomersialkan sejak tahun 2005 (Robinson 2006). Selain untuk IRM, penggabungan dua gen ditujukan untuk meningkatkan ketahanan Bollgard terhadap serangga hama utama. Bollgard II dan WideStrike ditujukan agar dapat mengendalikan serangga hama *cotton bollworm* (*H. armigera*) dan *tobacco budworm* (*H. virescens*) lebih ampuh dibandingkan dengan Bollgard (Stewart 2007). Percobaan lapangan yang ekstensif menunjukkan hasil bahwa Bollgard II dapat mengendalikan serangga hama utama kapas lebih baik dibandingkan dengan Bollgard saja (Catchot 2001, Norman dan Sparks 2001, Lorenz *et al.* 2001, Penn *et al.* 2001, Ridge *et al.* 2000).

Kapas Bt generasi lanjut lainnya adalah kapas Bt milik perusahaan multinasional dengan ND VipCot™ (Syngenta 2003b). Kapas Bt tersebut mengandung *stacked gene B. thuringiensis* Vip3A dan *cry1A(b)* (Kurtz *et al.* 2007). Kapas Bt VipCot tersebut milik Syngenta Biotechnology, Inc., yang sedang melakukan pengujian di lapangan terbatas mulai tahun 2003 untuk memperoleh izin komersialisasi (Syngenta 2003a, Kurtz *et al.* 2007). Hasil uji lapang terbatas menunjukkan ketahanan terhadap *Helicoverpa zea* and *H. virescens*. Diharapkan kapas Bt generasi lanjut ini mempunyai ketahanan durabel atau tahan lama terhadap hama utama kapas (Kurtz *et al.* 2007).

2. Gen *pin* (proteinase inhibitor) II

Pin (dari kentang) yang diintroduksi ke tembakau telah meningkatkan ketahanan tanaman PRG terhadap serangga *Manduca sexta* (Johnson *et al.* 1989). Gen lain yang ditransformasikan pada tembakau untuk memperoleh ketahanan terhadap *H. zea* adalah *cowpea trypsin inhibitor* (Hoffman *et al.* 1992).

3. Gen α -amylase inhibitor

Azuki bean PRG yang dimasuki gen α -amylase inhibitor yang diperoleh dari *common bean* (*Phaseolus vulgaris* L.), menunjukkan ketahanan terhadap hama kumbang *Bruchus* (Ishimoto *et al.* 1996). Penelitian lain oleh Schroeder *et al.* (1995) dan Shade *et al.* (1994) gen α -amylase inhibitor dari *common bean* berhasil ditransformasikan ke kacang kapri (*Pisum sativum* L.) dan menunjukkan ketahanan terhadap kumbang *Bruchus* (*Bruchus pisorum*).

4. Gen GNA

Galanthus nivalis agglutinin (GNA) merupakan *snowdrop lectin*. Hasil penelitian Powell *et al.* (1993) tentang bioasai dengan menggunakan pakan buatan dari *lectin* tanaman menunjukkan bahwa *lectin* beracun terhadap wereng coklat dan wereng hijau. Diban-

dingkan dengan *lectin* tanaman yang lain, *snowdrop lectin* dari GNA menunjukkan hasil paling beracun terhadap hama serangga tersebut, dengan menurunkan tingkat hidup wereng coklat sampai 50% pada konsentrasi 6 μ m. Padi PRG yang mengandung gen GNA telah dihasilkan melalui sistem transformasi penembakan partikel dari embrio muda dan elektroprasi dari protoplas (Rao *et al.* 1998). Dalam uji bioasai, padi PRG tersebut dapat menurunkan tingkat hidup, keperidian, dan memperlambat pertumbuhan wereng coklat (Rao *et al.* 1998).

Tahan Nematoda Parasit Tanaman

Di antara nematoda parasit tanaman, nematoda kista (*Heterodera* spp. dan *Globodera* spp.) dan nematoda buncak akar (NBA) atau *root knot nematode* (*Meloidogyne* spp.) adalah spesies nematoda yang paling penting dan banyak menimbulkan kerusakan pada berbagai tanaman pertanian (Sasser dan Freckman 1987). Nematoda tersebut adalah nematoda endoparasit obligat. Larva instar kedua nematoda menyerang dan melakukan penetrasi ke dalam jaringan akar tanaman dan membuat suatu struktur tempat khusus nematoda menghisap makanan (*specialized feeding structures*). Sekali struktur tempat khusus nematoda menghisap makanan terbentuk, mereka berkembang biak dan bertahan seumur hidup di dalam jaringan akar sampai berminggu-minggu. Akibatnya, pertumbuhan, kesehatan, dan hasil tanaman akan terganggu dan menurun secara drastis.

Saat ini pengendalian nematoda parasit tanaman belum memadai dan masih memerlukan integrasi dari kombinasi beberapa strategi pengendalian nematoda secara terpadu. Pengendalian dengan bercocok tanam telah diaplikasikan secara luas oleh petani, tetapi ada kendala pada rotasi tanaman, karena inang nematoda parasit tanaman seperti nematoda buncak akar (*Meloidogyne* spp.) sangat luas (Trudgill 1997). Cara pengendalian lain yang dilakukan oleh petani adalah penggunaan nematisida meskipun tidak ramah lingkungan. Dengan banyaknya nematisida dan fumigan tanah yang efektif seperti *methyl bromide* ditarik dari pasaran menyebabkan kurangnya ketersediaan nematisida yang efektif (Oka dan Cohen 2001). Sebagai pengendalian alternatif yang ramah lingkungan adalah penggunaan varietas tanaman tahan nematoda parasit tanaman (Holliday 1989).

Bioteknologi melalui rekayasa genetik menawarkan alternatif dan solusi berkelanjutan terhadap masalah pengendalian nematoda parasit tanaman (Atkinson *et al.* 2003). Pengendalian nematoda parasit dengan tanaman PRG terkait erat dengan hambatan pertumbuhan dan perkembangan nematoda, serta pola dan cara makan nematoda di dalam jaringan akar (Atkinson *et al.* 2003). Elemen yang digunakan dalam pengendalian nematoda parasit terkait dengan gen yang mengkode protein anti syaraf nematoda yang mengeluarkan sekresi untuk infeksi; peptida atau RNAi (*interfering*); dan kombinasi dengan promotor tertentu yang mengarahkan pola spesifik dari ekspresi anti syaraf nematoda (Atkinson *et al.* 2003). Dalam perakitan tanaman PRG tahan nematoda parasit tanaman, beberapa gen telah digunakan.

1. Gen CpTI (*cowpea trypsin inhibitor*)

Kentang PRG yang dirakit dengan mentransformasikan gen CpTI dapat menghambat pertumbuhan dan populasi nematoda parasit tanaman dari spesies *Globodera pallida* (Atkinson 1993, Hepher dan Atkinson 1992) dan mengurangi keperidian betina *Meloidogyne incognita* (Hepher dan Atkinson 1992, Urwin *et al.* 1998).

2. Gen Oc-I (*oryzacystatin-I*)

Gen Oc-I dari kelompok *cystein* protease inhibitor telah berhasil diisolasi dari padi dan diklon (Abe *et al.* 1987). Gen Oc-I D86 telah ditransformasikan ke tanaman tomat. Akar rambut tomat PRG ternyata dapat menghambat pertumbuhan *G. pallida* (Urwin *et al.* 1995).

Penelitian lain juga menggunakan gen Oc-I D86 dengan promoter CaMV35S yang ditransformasikan ke tanaman *Arabidopsis thaliana*. *A. thaliana* PRG dapat menekan pertumbuhan *Heterodera schachtii* dan *M. incognita*. Pengaruh penghambatan pertumbuhan dua spesies nematoda parasit tanaman tersebut dibedakan dalam dua hal: (a) betina yang bertelur pada tanaman PRG jumlahnya lebih sedikit dibandingkan dengan betina yang bertelur pada tanaman non PRG, dan (b) betina yang bertelur pada tanaman PRG ukuran tubuhnya lebih kecil dan mempunyai kepridian lebih kecil dibandingkan dengan betina pada tanaman non PRG. Hasil ini berkorelasi dengan berkurangnya aktivitas *cysteine protease* dalam usus *H. schachtii* setelah makan tanaman PRG (Urwin *et al.* 1997). Selain menunjukkan ketahanan terhadap *H. schachtii* dan *M. incognita*, *A. thaliana* PRG mempunyai ketahanan terhadap *Rotylenchulus reniformis* (Urwin *et al.* 2000b).

Penelitian lain yang menggunakan gen Oc-I D86 dengan promoter CaMV35S adalah penelitian Atkinson *et al.* (2003) pada pisang dan kentang. Pisang PRG menunjukkan ketahanan terhadap *Radophulus similis*, sedangkan pada kentang tahan terhadap *M. incognita* dan *Nacobbus aberrans*.

Percobaan di lapangan uji terbatas (LUT) telah dilakukan untuk menguji ketahanan kentang PRG yang mengandung gen Oc-I D86 dengan promoter CaMV35S terhadap *G. pallida*. Hasilnya menunjukkan kentang PRG tahan terhadap *G. pallida*. Jumlah telur *G. pallida* dalam tanah pada pascapanen lebih sedikit dibandingkan dengan jumlah sebelum tanam (Atkinson *et al.* 2003).

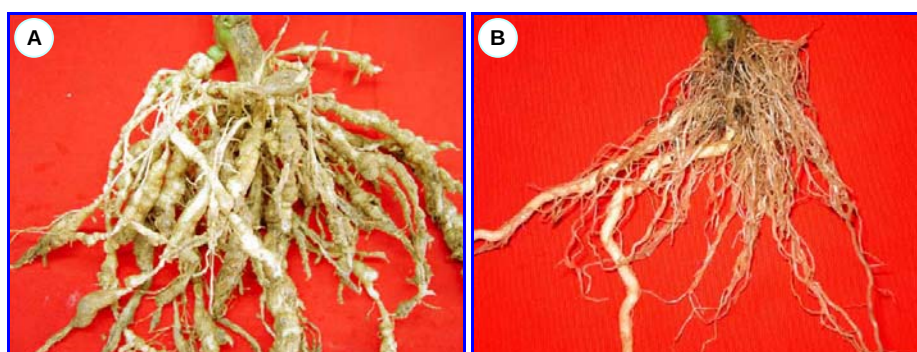
3. *Stack genes* Oc-I1D86 dengan CpTI

Penggunaan strategi *stack genes* juga diterapkan pada perakitan tanaman PRG tahan nematoda parasit tanaman. Penggabungan gen Oc-I1D86 dengan promoter CaMV35S dan CpTI dengan IRES (*internal ribosome entry site*) ditransformasikan ke tembakau. Tembakau PRG tersebut tahan terhadap *Globodera tabacum* (Urwin *et al.* 2000a, 2002b).

4. Gen *Mi*

Gen *Mi* adalah gen ketahanan terhadap NBA (*Meloidogyne* spp.) yang berasal dari tanaman tomat (*Lycopersicon esculentum* L.) yang tahan. Gen *Mi* diisolasi dari tanaman tomat tahan galur RN-1 (Chen *et al.* 2006). Gen *Mi* dengan plasmid pBMi ditransformasikan melalui mediasi vektor *Agrobacterium* ke tanaman tomat peka (rentan) varietas ZS-5 dan J-8. Sebagai pembanding tomat tahan galur RN-1 ditransformasi dengan RNAi vektor pHRMi. RNAi, pertama kali dikarakterisasi di dalam nematoda *Caenorhabditis elegans* dan diketahui terlibat dalam proses gen *silencing*, serta dijadikan sebagai sarana untuk menganalisis fungsi gen dalam berbagai organisme (Huang *et al.* 2006). Hasil analisis RT (*reverse transcription*) PCR menunjukkan bahwa tingkat ekspresi gen *Mi* bervariasi di antara beberapa galur tomat PRG hasil transformasi. Dua belas tomat PRG dengan gen *Mi* sense diseleksi ketahanannya terhadap NBA. Hasilnya menunjukkan delapan transforman mempunyai ketahanan sangat tinggi (Chen *et al.* 2006). Transforman yang mempunyai lebih dari tiga kopi *insert* T-DNA tidak menunjukkan peningkatan ketahanan. Sifat ketahanan tersebut diturunkan ke progeninya. Sedangkan empat dari tujuh transforman dari tomat galur tahan RN-1 yang ditransformasi dengan RNAi vektor pHRMi kehilangan ketahanan alamiahnya terhadap NBA (Gambar 3) (Chen *et al.* 2006).

Chen *et al.* (2007) berhasil mengisolasi calon gen tahan (*CaMi*) terhadap NBA dari tanaman cabe (*Capsium annuum* L.) tahan NBA galur PR 205. Gen *CaMi* kemudian ditransfer ke tanaman tomat peka NBA. Enam belas tomat PRG yang mengandung satu sampai lima kopi *insert* T-DNA dari gen *CaMi* berhasil dirakit. Analisis RT-PCR menunjukkan bahwa tingkat ekspresi gen *CaMi* bervariasi di dalam tanaman PRG. Bioasai dengan NBA menunjukkan bahwa terjadi peningkatan ketahanan terhadap NBA dibandingkan dengan non PRG. Sifat ketahanan tersebut diwariskan ke progeni selanjutnya. Hasil analisis *ultra-structure* pada tanaman non PRG, menunjukkan gejala terbentuknya *gall* kelihatan sekali pada sistem perakaran, sedangkan pada tanaman PRG banyak



Gambar 3. Bioasai nematoda buncak akar (*Meloidogyne incognita*). A = tomat yang ditransformasi dengan RNAi *Mi* menjadi peka terhadap *M. incognita* dan B = tomat PRG yang ditransformasi dengan *sense Mi* menjadi tahan *M. incognita* (Chen *et al.* 2006).

gejala reaksi hipersensitif dan adanya sel-sel nekrotik di sekitar nematoda (Chen *et al.* 2007).

5. Gen GNA

Galanthus nivalis agglutinin (GNA) merupakan *snowdrop lectin*. Gen GNA ini telah di-transformasikan ke tanaman kentang. Kentang PRG hasil transformasi tersebut menunjukkan ketahanan terhadap *G. pallida* (Burrow *et al.* 1998).

6. Gen 16D10

Dalam proses infeksi dan parasitisme tanaman, NBA (*Meloidogyne* spp.) mengeluarkan sekresi parasitisme yang berupa protein. Protein tersebut dikode oleh gen parasitisme yang diekspresikan di dalam sel-sel *esophageal gland* NBA. Gen parasitisme 16D10 mengkode *conserved* sekresi peptida NBA. Sekresi peptida tersebut merangsang pertumbuhan akar dan berfungsi sebagai *ligand* terhadap faktor transkripsi tanaman *putatif*. Gen 16D10 ditransformasikan ke *A. thaliana* melalui mediasi vektor *A. tumefaciens*. Bioasai *A. thaliana* PRG secara *in vitro* menunjukkan ketahanan terhadap empat spesies NBA, yaitu *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, dan *M. hapla* (Huang *et al.* 2006). Empat spesies *Meloidogyne* yang umum ditemukan menginfeksi tanah pertanian adalah *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, dan *M. hapla*, dengan *M. incognita* sebagai spesies yang paling penting. Empat spesies tersebut menginfeksi lebih dari 1.700 inang dan secara global merupakan nematoda parasit tanaman yang paling merusak (Hirschmann 1985, Sasser *et al.* 1983).

Tahan Cendawan Patogen Tanaman

Banyak tanaman, hewan, dan jasad renik yang menghasilkan protein yang beracun terhadap cendawan. Gen dari protein tersebut telah berhasil diklon dan digunakan dalam transformasi tanaman untuk meningkatkan ketahanan terhadap cendawan patogen. Laporan pertama kali mengenai tanaman PRG tahan cendawan patogen (TCP) adalah hasil penelitian Broglie *et al.* (1991). Laporan tersebut tentang tembakau PRG dan *Brassica napus* PRG yang mengandung gen *chitinase* dari tanaman sejenis kacang-kacangan (*bean*), yang menunjukkan peningkatan ketahanan terhadap *Rhizoctonia solani*. Beberapa gen yang digunakan untuk memproduksi tanaman PRG, yaitu *chitinase* (Broglie *et al.* 1991, Datta *et al.* 2001), *glucanase* (Lusso dan Kuc 1996) RIP (*ribosome in-activating protein*) (Logemann *et al.* 1992), dan gen RB (Song *et al.* 2003).

1. Gen *chitinase* dan *glucanase*

Chitinase dan β -1,3-*glucanase* merupakan enzim yang dapat mengkatalisis hidrolisis *chitin* dan β -1,3-*glucan*. *Chitin* dan β -1,3-*glucan* merupakan komponen major dinding sel dari kebanyakan cendawan (Wessels dan Sietsma 1981). Menurut Grover dan

Gowthaman (2003) chitinase dan β -1,3-glucanase termasuk sebagai salah satu grup *pathogenesis related protein* (PR). Menurut Kauffmann *et al.* (1987) β -1,3-glucanase termasuk protein PR2, sedangkan *chitinase* menurut Legrand *et al.* (1987) termasuk PR3. Protein PR muncul dengan adanya rangsangan antara lain oleh patogen, pelukaan, elisitor dinding sel cendawan, *ethylene*, sinar UV, dan adanya logam berat (Grover dan Gowthaman 2003). Protein PR akan terangsang selama proses respon *hypersensitive* (HR) dan *systemic acquired resistance* (SAR) (Grover dan Gowthaman 2003). Oleh karena itu dihipotesiskan bahwa protein PR mempunyai pertahanan alamiah atau ketahanan tanaman terhadap patogen.

a. Gen *chitinase*

Ada beberapa tanaman PRG yang berhasil dirakit dengan mentransformasikan gen *chitinase* ke dalam tanaman. Tanaman tersebut antara lain adalah tembakau (*Nicotiana tabacum*), kanola (*B. napus*), anggur (*Vitis vinifera* L.), kacang tanah (*Arachis hypogaea*), padi (*Oryza sativa*), dan mentimun (*Cucumis sativus* L.). Broglie *et al.* (1993) menemukan bahwa bibit tembakau PRG hasil transformasi dengan gen *chitinase* masih dapat hidup pada tanah yang diinfestasi *R. solani* dengan tingkat inokulum yang tinggi dibandingkan dengan tanaman yang non PRG. Hal tersebut disebabkan oleh *chitinase* yang bekerja sebagai perusak *chitin* yang berfungsi sebagai bahan penguat dinding sel cendawan (Schlumbaum *et al.* 1986). Gen *chitinase* tidak berfungsi baik jika diperlakukan terhadap *Pythium aphanidermatum* karena dinding sel patogen tersebut mengandung *chitin* sedikit sekali (Broglie *et al.* 1993). Tanaman kanola PRG yang mengandung gen *chitinase* juga menunjukkan ketahanan terhadap *R. solani* (Broglie *et al.* 1993).

Anggur PRG yang disisipi gen *chitinase* (dari padi) menghasilkan tanaman yang tahan terhadap serangan *Uncinula necator* dan dapat mengurangi jumlah bercak dari *Elisioe ampelina* (Yamamoto *et al.* 2000). Gen *chitinase* dari tembakau ditransformasi ke kacang tanah. Kacang tanah PRG ternyata dapat menunda perkembangan bercak dari patogen *Cercospora arachidicola* dan ukuran bercaknya menjadi lebih kecil (Rohini dan Rao 2001). Padi *japonica* PRG dirakit dengan mentransformasikan gen *chitanase* dari padi untuk meningkatkan ketahanan terhadap penyakit blas (*Magnaporthe grisea*) (Nishizawa *et al.* 1999). Studi yang dilakukan Datta *et al.* (2000, 2001) juga mentransformasikan gen *chitinase* dari padi ke tanaman padi *indica*. Padi *indica* PRG tersebut menjadi tahan terhadap *R. solani* dengan jumlah bercak yang lebih sedikit dan ukurannya lebih kecil dibandingkan dengan padi non PRG (Datta *et al.* 2000, 2001). Gen *chitinase* yang diisolasi dari padi telah berhasil ditransformasikan ke mentimun. Menurut laporan Tabei *et al.* (1998), mentimun PRG menunjukkan ketahanan terhadap *gray mold* (*Botrytis cinerea*).

b. Gen *glucanase*

Yoshikawa *et al.* (1993) telah melakukan penelitian perakitan tembakau PRG TCP dengan mentransformasikan gen *glucanase* dari kedelai. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ketahanan tembakau PRG tersebut meningkat dengan mengurangi perkembangan dari patogen *Phytophthora parasitica* dan *Alternaria alternata* (Yoshikawa *et al.* 1993). Tembakau PRG yang mengandung gen *glucanase* dari tembakau dapat mengurangi gejala penyakit yang disebabkan oleh *P. parasitica* dan *Peronospora tabacina* (Lusso dan Kuc 1996). Alfalfa (*Medicago sativa* L.) yang disisipi gen *glucanase* (juga dari alfalfa) menghasilkan alfalfa PRG yang dapat mengurangi perkembangan gejala penyakit yang disebabkan oleh *Phytophthora megasperma*, tetapi tidak ada pengaruhnya terhadap patogen *Stemphylium alfalfae* (Masoud *et al.* 1996).

Iglesias dan Meins (2000) melaporkan hasil studi mereka yang menunjukkan bahwa terjadi peningkatan ketahanan terhadap *tobacco mosaic virus* (TMV) dan *potato virus X* pada tembakau PRG yang mengandung β -1,3-*glucanase-deficient*. Sedangkan Beffa *et al.* (1996) melaporkan bahwa transformasi antisense yang mereka lakukan menghasilkan tembakau PRG dengan β -1,3-*glucanase-deficient*. Tembakau PRG yang mereka hasilkan menunjukkan terjadinya peningkatan deposisi *callose* dalam tanaman PRG sewaktu merespon adanya infeksi tanaman oleh TMV dan *tobacco necrosis virus*. Ketahanan dari tembakau PRG terhadap kedua virus patogen tersebut diekspresikan melalui gejala serangan dengan jumlah bercak infeksi virus lebih sedikit dibandingkan dengan yang non PRG (Beffa *et al.* 1996).

2. Gen RIP (*ribosome in-activating protein*)

RIP mempunyai aktivitas *N*-glycosidase dan dapat memindahkan residu adenine dari 28S rRNA. Sebagai konsekuensinya subunit 60S ribosomal tidak dapat menempel pada perpanjangan faktor 2 sehingga proses perpanjangan protein menjadi terhambat. RIP tanaman tidak dapat mengaktifkan ribosom asing ribosom dari spesies *distantly related* dan organisme *eukaryote* lain termasuk cendawan atau fungi (Grover dan Gowthaman 2003).

RIP *barley* (*Hordeum vulgare*) yang dimurnikan dapat menghambat pertumbuhan cendawan secara *in vitro* (Leah *et al.* 1991). Tembakau PRG yang mengandung gen RIP yang diperoleh dari *barley* dapat mengurangi serangan *R. solani* (Logemann *et al.* 1992). Demikian pula dengan tembakau PRG yang ditransformasi dengan gen RIP dari jagung, dapat mengurangi kerusakan oleh *R. solani* (Maddaloni *et al.* 1997). Tetapi padi PRG yang ditransformasi gen RIP dari jagung ternyata tidak berpengaruh terhadap serangan *M. grisea* atau *R. solani* (Kim *et al.* 1999). Tingkat ketahanan tembakau PRG meningkat ketika RIP dikombinasikan dengan PR2 atau PR3 (Jach *et al.* 1995). Sedangkan gandum

PRG yang mengandung RIP dari *barley* hanya menunjukkan ketahanan moderat atau tidak tahan terhadap *Erysiphe graminis* (Bieri *et al.* 2000).

3. Penggabungan gen (*stacked genes*) *chitinase*, *glucanase*, dan RIP

Penggunaan strategi *stacked genes* telah diterapkan pada perakitan tanaman PRG TCP. Terjadi peningkatan ketahanan tanaman wortel PRG terhadap beberapa penyakit seperti *Alternaria dauci*, *Alternaria radicina*, *Cercospora carotae*, dan *Erysiphe heraclei* setelah dua gen *chitinase* (dari tembakau) dan β -1,3-*glucanase* ditransformasikan ke genom wortel (Melchers dan Stuiver 2000). Demikian pula dengan penyisipan gen *chitinase* + RIP atau *chitinase* (dari barley) + β -1,3-*glucanase* ke tembakau dapat mengurangi serangan *R. solani* (Jach *et al.* 1995). Gen *chitinase* (dari padi) + *glucanase* (dari alfalfa) telah berhasil ditransformasikan ke tembakau. Tembakau PRG dengan *stacked genes* dapat mengurangi tingkat perkembangan dan jumlah bercak dari infeksi *Cercospora nicotianae* (Zhu *et al.* 1994). Tomat PRG yang mengandung *stack genes chitinase* (dari tembakau) + β -1,3-*glucanase* dapat mengurangi tingkat serangan *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Jongedijk *et al.* 1995, Van den Elzen *et al.* 1993). Dalam studi *in vitro* kombinasi perlakuan ganda antara RIP dan *chitinase* ternyata dapat menghambat pertumbuhan *Tricoderma reesei* dan *Fusarium sporotrichioides* secara sinergistik dibandingkan dengan perlakuan tunggal (Broglie *et al.* 1993).

4. Gen lain

Gen lain yang potensial digunakan dalam perakitan tanaman PRG TCP adalah gen *mitogen-activated protein kinase 1* (MK1).

Gen MK1 dari tanaman *Capsicum annuum* telah diklon dan dikarakterisasi (Lee *et al.* 2004). MK1 mempunyai asam amino 92% identik dengan *wound-inducible protein kinase* (WIPK) dari tembakau. Lee *et al.* (2004) mentransfer gen MK1 melalui mediasi *A. tumefaciens* ke genom tanaman padi. Transformasi tanaman padi tersebut menghasilkan tujuh galur padi PRG yang mengandung protein dan mRNA MK1, serta satu kopi insersi. Di dalam tanaman PRG yang mengandung gen MK1 dijumpai bahwa ekspresi gen-gen yang terkait dengan protein *wound-inducible pathogenesis-related* (PR), yaitu PR1a, PR1b dan PR10, meningkat atau lebih tinggi dibandingkan dengan padi non PRG (Lee *et al.* 2004). Peningkatan ekspresi dari protein PR tersebut dapat meningkatkan ketahanan tanaman padi terhadap serangan penyakit blas (*M. grisea*).

Tanaman PRG tahan cendawan patogen masih dalam taraf litbang, belum ada yang ditanam secara komersial.

Tahan Bakteri Patogen Tanaman

Perkembangan perakitan tanaman tahan bakteri patogen (TBP) melalui teknik rekayasa genetik, tidak secepat perakitan tanaman PRG tahan terhadap cekaman yang lain

seperti serangga hama, cendawan dan virus patogen, serta toleran herbisida (Sagi 2004). Gen avirulen pertama kali diklon dari bakteri dilakukan oleh Staskawicz *et al.* (1984). Sedangkan gen ketahanan dari tanaman tomat diklon pertama kali oleh dua grup peneliti (Martin *et al.* 1993, Salmeron *et al.* 1996) dan dari *Arabidopsis* oleh beberapa peneliti (Bent *et al.* 1994, Mindrinos *et al.* 1994, Grant *et al.* 1995) yang menunjukkan ketahanan khusus terhadap strain dari *Pseudomonas syringae*. Gen-gen yang pernah digunakan dalam penelitian perakitan tanaman PRG tahan terhadap bakteri patogen berasal dari berbagai materi seperti peptida anti bakteri, *lysozyme*, toksin dari bakteri, agensia antibakteri dari tanaman, antibodi, polisakarida dari bakteri, gen avirulen dari bakteri dan gen ketahanan penyakit tanaman (Sagi 2004). Dari berbagai materi asal gen ketahanan terhadap bakteri patogen tersebut, peptida anti bakteri yang paling banyak digunakan, kemudian disusul dengan *lysozyme*.

1. Peptida antibakteri

Gen ketahanan dari peptida antibakteri berhasil diisolasi dari berbagai organisme seperti binatang mamalia, katak, serangga, tanaman, dan jasad renik (Mourgues *et al.* 1998, Norelli 2000, Sagi 2004).

a. Berasal dari binatang

Gen sintesis anti jasad renik *cecropin* P1 (*cecP1*) merupakan peptida yang berasal dari binatang mamalia, dikonstruksikan ke suatu plasmid dengan promoter constitutive 35S RNA *cauliflower mosaic virus* (Zakharchenko *et al.* 2005). Gen tersebut ditransformasikan ke tembakau melalui vektor *Agrobacterium*. Keberadaan gen *cecP1* di dalam genom tembakau telah dikonfirmasi dengan PCR. Ekspresi gen *cecP1* di dalam tembakau PRG digambarkan dengan analisis Northern Blot. Tanaman PRG menunjukkan terjadi peningkatan ketahanan terhadap bakteri patogen *P. syringae*, *P. marginata*, dan *Erwinia carotovora* (Zakharchenko *et al.* 2005). Sifat ketahanan dari gen *cecropin* P1 dapat diturunkan ke progeni selanjutnya (Zakharchenko *et al.* 2005).

Beberapa jenis peptida anti bakteri seperti *magainin*, *brevinins*, *esculentin*, *rugosin*, dan *temporin* telah berhasil diisolasi dari binatang seperti katak (Bevins dan Zasloff 1990, Simmaco *et al.* 1994, Suzuki *et al.* 1995). Dari beberapa peptida tersebut, hanya analognya *magainin* dan *esculentin* yang sukses ditransfer ke tanaman untuk merakit tanaman TBP (Sagi 2004). Tembakau PRG yang mengandung analognya *magainin* (MSI-99 dan Myp30) menunjukkan ketahanan terhadap *P. syringae* pv. *tabaci* (DeGray *et al.* 2001) dan terhadap *E. carotovora* ssp. *Atroseptica* dalam tembakau PRG (Li *et al.* 2001). Ponti *et al.* (2003) mentransfer *esculentin* yang mutasi (M28L) ke tembakau dan menghasilkan tembakau PRG yang tahan terhadap *Pseudomonas aeruginosa* atau *P. syringae* pv. *tabaci* dengan tidak adanya pertumbuhan dan gejala serangan bakteri yang dapat dideteksi.

b. Berasal dari serangga

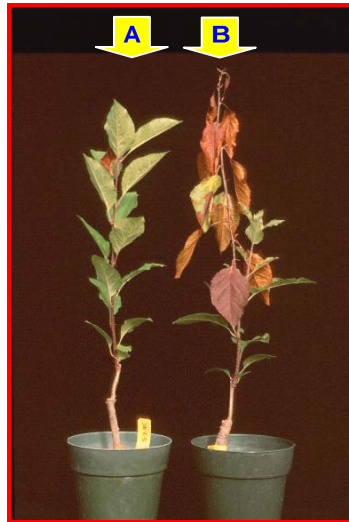
Gen *cecropins* yang merupakan peptida *lytic* anti bakteri, telah diisolasi dari ulat sutera raksasa atau *giant silk moth* (*Hyalophora cecropia*) dan ulat sutera atau *silkworm* (*Bombyx mori*), serta lalat *Drosophila* (Sagi 2004). Peptida tersebut diproduksi dan diakumulasi sebagai respon adanya infeksi. Ada beberapa jenis *cecropin*, yang asli adalah *cecropin B* merupakan peptida linear yang terdiri dari 31-39 asam amino (aa); yang mutan adalah SB37 = 38 aa dan MB39 = 39 aa; sedangkan yang sintetis adalah Shiva-1 = 38 aa dan D4E1 = 17 aa; selain itu ada jenis peptida *chimaeric* MsrA1 = 34-aa (Sagi 2004). Gen Shiva-1 dan SB-37 ditransformasikan dan diekspresikan ke tembakau PRG dan kentang PRG (Mourgues *et al.* 1998). Progeni tembakau PRG mengekspresikan gen *Shiva-1* dengan penundaan gejala penyakit dan pengurangan mortalitas tanaman setelah diinokulasi dengan *Ralstonia solanacearum* (penyebab penyakit bakteri layu) (Jaynes *et al.* 1993). Sedangkan tembakau PRG dengan gen *cecropin B* tidak menunjukkan ketahanan tanaman terhadap *R. solanacearum* atau *P. syringae* pv. *tabaci*. Hal tersebut merupakan hasil dari degradasi *cecropin* oleh proteases tanaman (Florack *et al.* 1995). Huang *et al.* (1997) melaporkan bahwa tembakau PRG yang mengandung gen MB39 (merupakan analog dari *cecropin* yang stabil) mengekspresikan ketahanan terhadap *P. syringae* pv. *tabaci* dengan tanpa gejala nekrosis.

Penelitian Mentag *et al.* (2003) melaporkan ekspresi gen sintetis *cecropin B* (D4E1) dari tanaman *poplar* PRG yang menghasilkan ketahanan terhadap bakteri patogen *A. tumefaciens* dan *Xanthomonas populi*, tetapi tidak tahan terhadap *Hypoxylon mammatum*. Ketahanan dengan tingkat yang tinggi terhadap *E. carotovora* diekspresikan umbi kentang PRG yang mengandung peptida *chimaeric* MsrA1 (Osusky *et al.* 2000). Gen Shiva di dalam tembakau PRG dilaporkan memberikan ketahanan tanaman terhadap *P. solanacearum* pv. *tabaci* (Xu *et al.* 1999) sedangkan gen SB37 menunjukkan aktivitas ketahanan dalam kentang PRG terhadap *E. carotovora* ssp. *atroseptica* (Arce *et al.* 1999).

Gen *attacin* yang merupakan kelas lain dari peptida *lytic* juga diisolasi dari ulat sutera raksasa, meskipun cara kerjanya belum dimengerti dengan jelas. Gen *attacin E* telah ditransfer ke tanaman apel dan menghasilkan apel PRG yang tahan terhadap *Erwinia amylovora*, penyebab penyakit hawar api (*fire blight*) (Norelli *et al.* 1994). Bioasai apel PRG dibandingkan dengan apel tetuanya yang non PRG di rumah kaca, menunjukkan bahwa apel PRG tahan terhadap *E. amylovora* (Gambar 4). Salah satu galur apel PRG tersebut menunjukkan terjadinya pengurangan gejala serangan sampai 50% setelah diinokulasi di lapangan (Norelli 2000).

c. Berasal dari tanaman

Sekurang-kurangnya ada 11 gen ketahanan tanaman yang telah diklon dan dapat meningkatkan ketahanan terhadap bakteri patogen. Menurut laporan Martin *et al.*



Gambar 4. Pengujian ketahanan apel PRG terhadap *Erwinia amylovora*. A = apel PRG yang tahan dan B = apel non PRG yang peka (Norelli 2000).

(1993), Bent *et al.* (1994), Mindrinos *et al.* (1994), Grant *et al.* (1995), Song *et al.* (1995), Salmeron *et al.* (1996), Yoshimura *et al.* (1998), Warren *et al.* (1998), Gassmann *et al.* (1999), Tai *et al.* (1999), Swiderski dan Innes (2001), Deslandes *et al.* (2002) gen ketahanan yang diisolasi dari berbagai tanaman antara lain RPS2, RPS4, RPS5, PBS1, RPM1, dan RRS1-R (dari *Arabidopsis*); *Xa21* dan *Xa1* (dari padi); *Bs2* (dari *pepper*); dan *Prf* dan 66 protein kinase (dari tomat).

Contoh paling sukses dari gen ketahanan bakteri patogen, yang diisolasi dari tanaman padi adalah gen *Xa21* (Song *et al.* 1995). Gen tersebut telah ditransformasikan ke tanaman padi varietas IR72 dan lima varietas Cina melalui *Agrobacterium*. Padi PRG menunjukkan ketahanan terhadap semua ras *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Ketahanan tersebut telah diuji di laboratorium maupun di lapangan (Tu *et al.* 1998, Tu *et al.* 2000, Zhai *et al.* 2000, Zhai *et al.* 2002).

d. Berasal dari jasad renik

Gen yang mengkode *glucose oxidase* telah diisolasi dari jasad renik *Aspergillus niger*. Gen tersebut ditransformasikan ke tanaman kentang. Kentang PRG hasil transformasi menunjukkan ketahanan terhadap *E. carotovora* ssp. *Carotovora* (Wu *et al.* 1995). Gen yang mengkode *glucose oxidase* mengkatalisis proses oksidasi *glucose* menjadi asam *gluconic* dan *hydrogen peroxide*. Hasil pengamatan menunjukkan terjadinya kenaikan tingkat *hydrogen peroxide* bersamaan dengan peningkatan ketahanan terhadap *E. carotovora* ssp. *carotovora* (Wu *et al.* 1995). Gen yang sama ditransformasikan ke tanaman kubis yang menghasilkan tanaman tahan terhadap *Xanthomo-*

nas campestris pv. *campestris* (Lee *et al.* 2002). Pada kedua tanaman PRG yang mengandung gen dari *A. niger* dan tahan bakteri patogen menunjukkan terjadinya peningkatan aktivitas *glucose oxidase* di dalam daun. Kenaikan tingkat *hydrogen peroxide* juga dijumpai pada umbi kentang PRG yang tahan terhadap bakteri patogen *E. carotovora* ssp. *Atroseptica* yang pada saat bersamaan terjadi penurunan aktivitas protein transporter plastidic ATP/ADP AATP1 (Linke *et al.* 2002).

2. Lysozyme

Sumber lain dari protein anti bakteri adalah *lysozyme*, yang bisa diperoleh dari *bacteriophage* atau telur ayam (Sagi 2004). Gen *lysozyme* dari *bacteriophage* T7 telah digunakan dalam kontruksi vektor ekspresi untuk transformasi tanaman (Huang *et al.* 1994). Awal penelitian yang menggunakan *lysozyme* dari putih telur ayam (HEWL atau *hen egg white lysozyme*) untuk ketahanan terhadap bakteri patogen dengan hasil yang tidak begitu sukses (Trudel *et al.* 1992) karena tingkat sekresi yang rendah. Tetapi penelitian Trudel *et al.* (1992) tiga tahun kemudian menghasilkan tembakau PRG mengeluarkan sekresi *extracellular* dari HEWL yang tinggi dan menunjukkan penghambatan pertumbuhan dari bakteri patogen *Clavibacter michiganense* dan *Micrococcus luteus* pada bioasai di laboratorium (Trudel *et al.* 1995). Serrano *et al.* (2000) melakukan transformasi kentang dengan gen HEWL dan menghasilkan kentang PRG yang tahan terhadap *E. carotovora* ssp. *Atroseptica*. Hasil percobaan lapang dari beberapa grup peneliti, menunjukkan bahwa *lysozyme* tidak berpengaruh terhadap bakteri tanah (Heuer dan Smalla 1999, Lottmann *et al.* 1999, Heuer *et al.* 2002), juga tidak berpengaruh terhadap bakteri tanah antagonistik (Lottmann *et al.* 1999, 2000, Lottmann dan Berg 2001). Dapat disimpulkan bahwa pengaruh *lysozyme* hanya pada bakteri patogen yang menyerang daun tetapi tidak berpengaruh terhadap bakteri patogen tanah (Sagi 2004).

3. Gen lain

Gen lain yang digunakan dalam perakitan tanaman PRG TBP adalah gen *homeobox* yang mengkode protein HD-Zip (*homeodomain leucine zipper*). Gen HD-Zip H52 dari tomat ditransformasikan ke genom tanaman tomat melalui mediasi *A. tumefaciens* (Iannacone *et al.* 2004). Tomat PRG yang mengandung gen HD-Zip H52 ternyata menunjukkan ketahanan terhadap bakteri patogen *P. syringae* (Iannacone *et al.* 2004).

Tahan Virus Patogen Tanaman

Virus patogen 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 dari serangan *strain* virulen 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 (*cross protection*).

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 (Hemmenway *et al.* 1987). Ketahanan terhadap infeksi virus dapat diperoleh melalui rekayasa genetik tanaman dengan mengintroduksi gen asing (Beachy 1990).

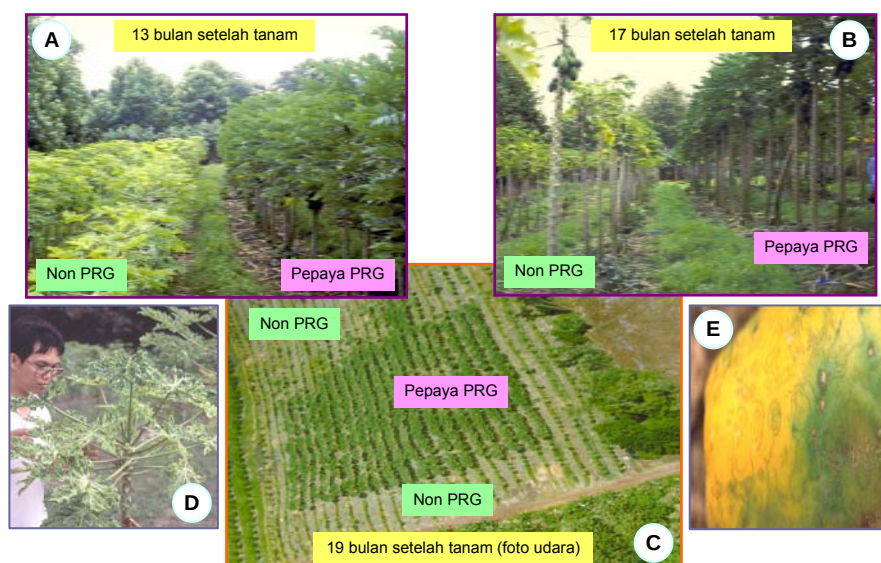
Untuk merakit tanaman PRG tahan virus patogen (TVP) biasanya menggunakan strategi *pathogen-derived resistance* (Lius *et al.* 1997). *Pathogen-derived resistance* (PDR) adalah strategi ketahanan dengan memanfaatkan elemen genetik virus yang berupa gen utuh atau bagian gen dari genom virus kemudian diklon dan diintroduksi ke tanaman. Contoh PDR adalah gen *replicase* dan *coat protein* (CP) dari virus (Quemada 1998, Vidya *et al.* 2000). Pemanfaatan gen *replicase* atau CP dalam tanaman PRG akan mempengaruhi satu atau beberapa tahap penting dalam siklus hidup virus.

Pada kasus virus benang (*strand*) RNA positif, pengaruh proteksi yang mirip dengan proteksi silang dapat dijumpai pada tanaman PRG yang ditransformasi dengan gen CP virus (Kaniewski *et al.* 1990, Powell *et al.* 1986). Gen yang digunakan dalam tipe transformasi tersebut adalah benang ganda cDNA yang berasal dari RNA virus. Tingkat ekspresi yang tinggi dari CP sangat diperlukan untuk memperoleh pengaruh proteksi silang dalam tanaman PRG (Hemmenway *et al.* 1987). Telah diperoleh tanaman TVP hasil rekayasa genetik melalui *Agrobacterium* dari virus RNA benang negatif atau yang lebih dikenal sebagai gen *RNA-binding protein*. Metode proteksi silang pada tanaman PRG telah dikembangkan melalui transformasi dengan DNA benang ganda yang diperoleh dari satelit RNA (McGarvey dan Kaper 1993). Tembakau PRG yang mengandung cDNA dengan kode TMV *protein replicase* merupakan tanaman tahan TMV yang dihasilkan lewat transformasi dengan *Agrobacterium* (Golemboski *et al.* 1990).

Beberapa tanaman PRG sudah berhasil dirakit melalui teknologi rekayasa genetik untuk memperoleh ketahanan terhadap virus patogen (Beachy 1990, McGarvey dan Kaper 1993, Dasgupta *et al.* 2003). Beberapa tanaman PRG TVP sudah berhasil dirakit dengan menggunakan gen *replicase* atau CP. Tanaman PRG tersebut ada yang masih dalam skala litbang dan ada yang telah ditanam secara komersial.

Pada tahun 1986, CP dari *papaya ring spot virus* (PRSV) dapat diklon, kemudian ditransformasikan ke genom tanaman pepaya (*Carica papaya*) melalui penembakan partikel oleh Fitch *et al.* (1990). Pada tahun 1992 dilakukan pengujian pepaya PRG tahan PRSV di lapangan terbatas di Hawaii (Gonsalves 2004). Pada percobaan di lapang, pepaya PRG tahan PRSV terbukti menunjukkan ketahanannya di lapang (Gambar 5) (Perry 2003, Gonsalves 2004).

Litbang pepaya PRG tahan PRSV juga dilakukan oleh beberapa negara seperti Australia, Bangladesh, Brazil, Filipina, Jamaica, Malaysia, Tanzania, Thailand, Uganda, Venezuela, dan Vietnam (Lines *et al.* 2002, Souza dan Gonsalves 1998, Gonsalves 2004,

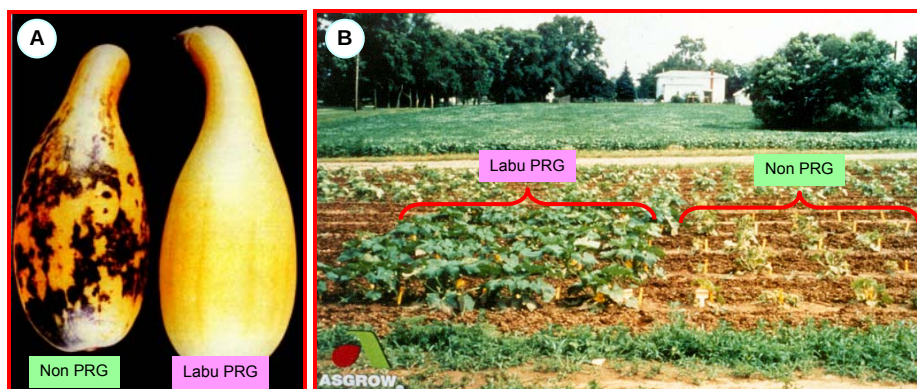


Gambar 5. Pengujian ketahanan papaya PRG terhadap PRSV di LUT tahun 1996-1997 di Hawaii, PRSV = *papaya ring spot virus* (A, B, C) (Perry 2003) dan gejala serangan PRSV pada daun dan buah (D dan E) (Manshardt *et al.* 2003).

Magdalita *et al.* 2004a, Habibuddin *et al.* 2005, Romyanon *et al.* 2005, Fermin *et al.* 2004, Binh *et al.* 2002). Pepaya PRG tahan PRSV telah diuji ketahanannya di LUT di Filipina, Thailand, dan Vietnam (Magdalita *et al.* 2007, Chowpongpan *et al.* 2003, Hung *et al.* 2007), serta di rumah kaca di Malaysia (Habibuddin *et al.* 2007).

Gen CP dari *watermelon mosaic virus2* (WMV2) dan *zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) telah diklon. Gen CP dengan promotor 35S ditransformasikan ke genom tanaman labu (*Curcubita pepo* L.) melalui mediasi vektor *A. tumefaciens* (Quemada 1998) dan menghasilkan labu PRG event ZW-20. Event lain labu PRG adalah CZW-3 yang dihasilkan dari transformasi CP tiga virus *cucumber mosaic virus* (CMV), WMV2, dan ZYMV melalui vektor *A. tumefaciens* (Quemada 1998). Hasil pengujian lapang menunjukkan bahwa labu PRG tahan terhadap virus patogen target, yaitu WMV2 dan ZYMV (Gambar 6) (Quemada 1998).

Tanaman PRG TVP yang lain masih dalam taraf litbang. Tanaman PRG tersebut adalah tomat tahan *golden mosaic virus* (Day *et al.* 1991), tomat tahan virus *cucumber mosaic virus* (Kaniewski *et al.* 1999), tomat tahan virus gemini *tomato leaf curl virus* (Raj *et al.* 2005), kentang tahan virus X dan virus Y (Hemmenway *et al.* 1987, Kaniewski *et al.* 1990), alfalfa tahan *alfalfa mosaic virus* (Hill *et al.* 1991). Selain itu, ada penelitian yang menggabungkan (*stacked genes*) gen *replicase PLRVrep* untuk ketahanan terhadap *potato leafroll virus* dengan *cry3A(a)* untuk ketahanan terhadap *Colorado potato beetle* (Lawson *et al.* 2001, Thomas *et al.* 2000).



Gambar 6. Pengujian ketahanan labu PRG terhadap WMV2 (A) dan ZYMV di LUT (B), WMV2 = *watermelon mosaic virus 2*, ZYMV = *zucchini yellow mosaic virus* (Quemada 1998).

Tanaman buah-buahan plum (*Prunus domestica*) ditransformasi dengan gen CP dari *plum pox virus* (PPV) melalui mediasi *A. tumefaciens* (Ravelonandro *et al.* 2000). Plum PRG klon C-5 yang mengandung gen CP PPV telah diuji di dalam rumah kaca dan LUT serta menunjukkan ketahanan yang tinggi terhadap PPV (Hily *et al.* 2004). Plum PRG tahan PVP telah memperoleh izin untuk dikomersialkan di Amerika Serikat (AgBios 2007).

TOLERAN TERHADAP CEKAMAN ABIOTIK

Cekaman abiotik terdiri atas kekeringan dan suhu tinggi, salinitas, oksidatif (*oxidative*), pembekuan dan suhu rendah, cekaman logam berat, intensitas penyinaran yang tinggi, dan keracunan (Zhang *et al.* 2000, Uchimiya 2001). Kegiatan penelitian dengan tujuan merakit tanaman PRG toleran cekaman abiotik telah dilakukan oleh beberapa kelompok peneliti (McKersie *et al.* 1993, De la Fuente *et al.* 1997, McKersie *et al.* 1999, Kumar dan Minocha 1998, Ezaki *et al.* 2000, Zhang *et al.* 2000, Uchimiya 2001, Jiban 2001, Hsieh *et al.* 2002, Capell 2004, Kasuga *et al.* 2004, Oh *et al.* 2005, Eapen dan D'Souza 2005, Sharma 2006, Rodrigues *et al.* 2006, Karim *et al.* 2007, Zhao *et al.* 2007). Tanaman PRG toleran cekaman abiotik yang akan dibahas antara lain toleran terhadap kekeringan, salinitas, oksidatif, pembekuan dan suhu rendah, logam berat, serta keracunan aluminium.

Toleran Kekeringan

Kekeringan merupakan salah satu kendala cekaman abiotik yang sering terjadi. Setiap tahun di beberapa negara selalu dilanda masalah kekeringan, bahkan dapat mencapai intensitas yang serius sehingga tanaman menjadi puso. Sehubungan dengan itu, beberapa tim peneliti secara global melakukan penelitian dibidang rekayasa genetik untuk merakit tanaman toleran cekaman kekeringan dan yang terkait dengannya, yaitu suhu tinggi. Strategi pendekatan yang dilakukan adalah mempelajari *pathway* metabolisme tanaman

(Jiban 2001). *Pathway* metabolisme melibatkan sintesis dari metabolit yang berbeda, antara lain *trehalose*, *polyamine*, *proline*, *glycine betaine*, *carbohydrate* (Jiban 2001). Metabolit tersebut telah menunjukkan berasosiasi dengan toleransi kekeringan.

1. Gen yang Mengkode Sintesis *Trehalose*

Trehalose masuk kelompok gula sederhana yang secara alamiah diproduksi oleh berbagai organisme seperti bakteri, *yeast*, fungi (termasuk *mushrooms*), tanaman, dan banyak invertebrata (khususnya serangga). Dalam keadaan normal, akumulasi *trehalose* dalam tanaman hanya sedikit jumlahnya. Tapi ada perkecualian pada tanaman yang dapat tumbuh di gurun pasir. Tanaman tersebut disebut dengan *resurrection*, yaitu tanaman yang dapat bertahan hidup lama di gurun pasir pada kondisi kekeringan yang berkepanjangan. Tanaman kelihatan seperti mati, tetapi akan tampak hidup kembali apabila tersedia kelembaban yang cukup. Pada keadaan terjadinya cekaman, kebanyakan organisme secara alamiah akan mengakumulasi *trehalose* dan memproduksi gula melalui dua step proses. Proses tersebut adalah bekerjanya enzim *trehalose-6-phosphate synthase* (TPS) dan enzim *trehalose-6-phosphate phosphatase* (TPP).

Tim peneliti di *Cornell University*, AS melaporkan telah berhasil menyisipkan gen yang berfungsi untuk sintesis gula *trehalose* ke padi *indica* (USAID 2004). Di samping itu, mereka berhasil merakit padi Pusa Basmati yang mengandung gen *trehalose*. Dibandingkan dengan padi non PRG yang akumulasi kandungan *trehalosenya* sangat rendah, pertumbuhan padi PRG jauh lebih baik, segar, dan sehat pada kondisi cekaman kekeringan (USAID 2004).

Tim peneliti lain, yaitu Karim *et al.* (2007) melakukan perakitan tanaman PRG toleran kekeringan dengan ekspresi berlebihan (*over-expressing*) dari TPS. Tanaman PRG dengan ekspresi berlebih TPS tersebut menunjukkan terjadinya peningkatan toleran terhadap kekeringan, meskipun akumulasi *trehalose* hanya sedikit. Dalam penelitian tersebut dilaporkan tentang kesuksesan mereka mencapai tiga strategi. Strategi pertama: konstruksi gen ganda yang mengandung gen *TPS1* dan *TPS2* (yang mengkode TPP) dari *Saccharomyces cerevisiae* berhasil ditransformasikan ke tanaman tembakau. Kedua gen tersebut diregulasi oleh promotor *Arabidopsis* RuBisCO dari gen *AtRbcS1A* yang dapat memproduksi konstitutif dari kedua enzim tersebut. Strategi kedua: melibatkan terjadinya ekspresi gen yang terpicu adanya cekaman kekeringan dengan melakukan fusi daerah *coding downstream ScTPS1* dari *drought-inducible* promotor *Arabidopsis AtRAB18*. Biosintesis *trehalose* pada tembakau PRG yang mengandung konstruksi genetik dengan satu gen *ScTPS1*, atau dengan kombinasi dua gen *ScTPS1* dan *ScTPS2*, hanya terjadi apabila tanaman mengalami cekaman kekeringan. Strategi ketiga: melibatkan penggunaan promotor *AtRbcS1A* bersama dengan peptida transit di depan daerah *coding* sekuens *ScTPS1*, yang mengarahkan enzim ke kloroplas.

2. Gen yang Terkait dengan *Pathway Polyamine*

Dengan makin meningkatnya ilmu pengetahuan dibidang bioteknologi, maka penelitian tentang manipulasi *pathway* metabolisme tanaman melalui genetika molekuler, sekarang ini menjadi suatu kegiatan yang memungkinkan (Kumar dan Minocha 1998). Capell (2004) memilih *pathway polyamine* sebagai model dalam studinya. *Pathway polyamine* terdapat di dalam organisme hidup. *Polyamine* adalah molekul *polycationic* yang mempunyai bobot molekul (*molecular weight*) rendah dan diduga mempunyai peranan penting dalam beberapa proses fisiologi dan perkembangan organisme (Capell 2004). Pada hewan dan fungi, *diamine putrescine* (*precursor* dari *polyamine spermidine* dan *spermine*) disintesis langsung dari *ornithine* oleh enzim *ornithine decarboxylase* (ODC). Tanaman mempunyai rute atau jalan alternatif dalam proses produksi *putrescine* yang dikatalisis oleh *arginine decarboxylase* (ADC). Reaksi selanjutnya adalah perubahan *putrescine* menjadi *spermidine* dan *spermine*. Reaksi tersebut dikatalisis oleh enzim *spermidine* dan *spermine synthase*, yang digenerasi oleh *S-adenosylmethionine decarboxylase* (SAMDC). Pada kondisi cekaman abiotik seperti kekeringan dan salinitas, *polyamine* berakumulasi di dalam tanaman (Capell 2004). Peningkatan konsentrasi *polyamine* dalam tanaman dipertimbangkan sebagai indikator bahwa tanaman tersebut dalam keadaan tercekam (*stress*). Hasil dari beberapa penelitian menunjukkan bahwa *polyamine* khususnya *spermidine* dan *spermine* terlibat dalam regulasi ekspresi gen yang terkait dengan perlindungan osmotik sel tanaman dalam kondisi defisit air (Capell 2004). Kandungan akumulasi *putrescine* dalam padi PRG yang mengandung ADC cDNA dari tanaman *oat* (*Avena sativa*), 10 kali lebih besar dibandingkan dengan padi non PRG (Capell 2004).

3. Gen *GmTP55*

Gen *GmTP55* adalah gen homolog dengan *antiquitin* kedelai yang termasuk dalam kelompok ALDH7. Gen tersebut terkait erat dengan cekaman dehidrasi dan salinitas (Rodrigues *et al.* 2006). Tembakau (*N. tabacum*) dan *Arabidopsis* (*A. thaliana*) berhasil ditransformasi dengan gen *GmTP55* (Rodrigues *et al.* 2006). Pada uji ekspresi gen *GmTP55*, tembakau PRG dan *Arabidopsis* PRG menunjukkan toleran terhadap defisit air selama pertumbuhan tanaman (Rodrigues *et al.* 2006). Demikian pula pada kondisi cekaman kekeringan yang ekstrim, turgiditas tunas tembakau PRG menunjukkan tetap pada tingkat yang normal, tetapi sebaliknya kondisi yang kontras terjadi pada tanaman non PRG, yaitu terjadinya layu pada daun (Rodrigues *et al.* 2006).

4. Gen *DREB1A*

NAL (2005) melaporkan hasil penelitian peneliti biologi sel dari CIMMYT di Meksiko, yaitu Alessandro Pellegrineschi dan tim berhasil mengisolasi gen *DREB1A* dari tanaman *A. thaliana* dan mentransformasikan ke tanaman gandum. Gen *DREB1A* diketahui se-

bagai gen yang berperan dalam toleran tanaman terhadap kekeringan, suhu rendah, dan salinitas. Percobaan bioasai gandum PRG yang mengandung gen *DREB1A* terhadap cekaman kekeringan dilakukan di rumah kaca. Hasilnya menunjukkan bahwa gandum non PRG (kontrol) mulai kelihatan gejala kekeringan, setelah 10 hari dalam kondisi cekaman kekeringan, sedangkan gandum PRG tetap sehat sampai lima hari kemudian sebelum gejala kekeringan muncul. Setelah periode kekeringan berakhir, gandum PRG memberikan respon lebih baik terhadap penyiraman dengan cepat kembali ke kondisi sehat dibandingkan dengan gandum non PRG (NAL 2005).

Penelitian perakitan tanaman PRG toleran kekeringan juga dilakukan di ICRISAT, India. Tanaman *chickpea* ditransformasi dengan gen *DREB1A* dengan promotor *inducible rd29A* melalui mediasi vektor *Agrobacterium* (Sharma 2006). Pada percobaan bioasai kekeringan di rumah kaca, *chickpea* (*Cicer arietinum*) PRG menunjukkan toleransi yang tinggi terhadap kekeringan dibandingkan dengan tanaman non PRG. Demikian pula pengamatan efisiensi transpirasi, aktivitas fotosintesis, *conductance* stomata, dan transpirasi total pada tanaman PRG menunjukkan kondisi yang superior dibandingkan dengan non PRG (Sharma 2006).

Penelitian lain pada tanaman tembakau ditransformasi dengan kombinasi gen *DREB1A* dengan promotor *inducible rd29A* melalui *Agrobacterium* dilakukan oleh Kasuga *et al.* (2004). Tembakau PRG tersebut toleran terhadap kekeringan. Penelitian lain pada padi dilakukan oleh Oh *et al.* (2005) dengan menggunakan gen *CBF3/DREB1A* dan *ABF3* dari *Arabidopsis*. Padi PRG yang mengandung gen-gen tersebut menunjukkan peningkatan toleransi terhadap kekeringan tanpa terjadinya hambatan pertumbuhan (Oh *et al.* 2005).

Al-Abed *et al.* (2007) melakukan penelitian dengan mentransformasikan konstruk faktor transkripsi dari *Arabidopsis CBF* dengan promotor *inducible rd29A* dan marka seleksi *hygromycin phosphotransferase*, ke eksplan *split-seed* tanaman jagung, dengan penembakan partikel. *Over-ekspresi* dari *CBF3* pada jagung PRG menunjukkan terjadinya peningkatan toleransi kekeringan dan salinitas (Al-Abed *et al.* 2007).

Zhao *et al.* (2007) melaporkan bahwa konstruk gen *DREB1A/CBF3* yang berasal dari *Arabidopsis* dengan promotor *inducible rd29A* telah ditransformasikan ke tanaman *tall fescue* (*Schedonorus arundinaceus*) melalui *A. tumefaciens* strains *AGL1*. Sewaktu *tall fescue* PRG dikondisikan pada cekaman kekeringan, hasilnya menunjukkan adanya peningkatan toleran tanaman terhadap kekeringan. Di samping itu, terjadi akumulasi *proline* pada tingkat yang tinggi (Zhao *et al.* 2007). Keadaan tersebut menunjukkan kemampuan gen *CBF3* terkait dengan respon *tall fescue* PRG terhadap cekaman kekeringan. Aktivitas fotosintesis dan penutupan stomata lebih tinggi pada tanaman PRG dibandingkan dengan non PRG.

5. Gen *P5CSF129A*

P5CSF129A adalah gen yang mengkode *pyrroline-5-carboxylate synthetase*. Sharma (2006) dari ICRISAT, mentransformasi gen *P5CSF129A* dengan promotor CaMV 35S ke tanaman *chickpea* (*Cicer arietinum*) melalui mediasi vektor *Agrobacterium*. *Chickpea* PRG lebih toleran terhadap kekeringan dibandingkan dengan *chickpea* non PRG pada percobaan rumah kaca (Sharma 2006). Demikian pula, aktivitas fotosintesis dan penutupan stomata lebih tinggi pada tanaman PRG dibandingkan dengan non PRG (Sharma 2006).

6. Gen *CBF1*

Hsieh *et al.* (2002), melakukan penelitian perakitan tanaman PRG toleran kekeringan. Gen yang mereka gunakan adalah *CBF1* (*C repeat/dehydration-responsive element binding factor 1*) dari *Arabidopsis* dengan terminator *nos* dan promotor *cauliflower mosaic virus* 35S. Gen *CBF1* ditransformasikan ke genom tanaman tomat (*L. esculentum*). Tomat PRG menunjukkan lebih toleran terhadap cekaman defisit air dibandingkan dengan yang non PRG. Pada kondisi cekaman defisit air, stomata tomat PRG menutup lebih cepat dan tingkat kandungan prolin lebih tinggi dibandingkan dengan tomat non PRG. Sebaliknya konsentrasi *hydrogen peroxide* menurun dan aktivitas katalase meningkat pada tomat PRG dibandingkan dengan tomat non PRG dengan atau tanpa perlakuan cekaman defisit air. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa gen *CBF1* dari *Arabidopsis* dapat menyebabkan tomat PRG toleran terhadap cekaman defisit air.

7. Gen *HVA1*

Suatu gen toleran kekeringan berhasil diisolasi dari tanaman *barley* (*Hordeum vulgare*). Gen tersebut disebut *HVA1*. Gen *HVA1* telah ditransformasikan ke tanaman gandum oleh peneliti dari *Cairo's Agricultural Genetic Engineering Research Institute* (AGERI), Mesir. Gandum PRG yang mengandung gen *HVA1* ternyata toleran kekeringan dan dapat hidup di gurun pasir (NAL 2005). Pada Oktober 2004, tim peneliti AGERI mengumumkan telah melakukan uji gandum PRG di LUT. Hasilnya menunjukkan bahwa gandum PRG hanya memerlukan satu kali pengairan sedangkan yang non PRG perlu delapan kali (NAL 2005).

8. Gen-gen Lain

Gen-gen lain yang digunakan dalam perakitan tanaman PRG toleran kekeringan antara lain *betA*, *betB*, *SacB*, *SOD*. Gen *betA* mengkode *choline dehydrogenase* dan gen *betB* mengkode *betaine aldehyde dehydrogenase* yang terlibat dalam biosintesis *glycine betaine*. Gen *betB* dari *Escherichia coli* ditransformasikan ke tanaman tembakau. Tembakau PRG tersebut menunjukkan terjadinya akumulasi *glycine betaine* dan toleran terhadap kekeringan (Jiban 2001). Gen *SacB* berasal dari bakteri *Bacillus subtilis* yang mengkode *levan sucrase* dan terlibat dalam sintesis *fructan*. Tembakau PRG yang me-

ngandung gen *SacB* menunjukkan pertumbuhan lebih baik dibandingkan dengan non PRG pada kondisi cekaman kekeringan. Gen *SOD* (*superoxide dismutase*) yang berasal dari kacang kapri (*Pisum sativum* L.) berhasil disisipkan ke tanaman tembakau dan menunjukkan toleran terhadap kekeringan (Jiban 2001).

Kasukabe *et al.* (2004) menggunakan gen *spermidine synthase* dari tanaman *figleaf gourd* (*Cucurbita ficifolia*). Gen *spermidine synthase* dengan promoter *cauliflower mosaic virus* 35S kemudian ditransformasikan ke tanaman *A. thaliana*. Tanaman PRG menunjukkan terjadinya peningkatan signifikan aktivitas *spermidine synthase* dan kandungan *spermidine* dalam daun, serta terjadi peningkatan yang nyata pada toleransi tanaman PRG terhadap cekaman kekeringan.

Gen *CAP2* yang mengkode faktor transkripsi AP2 (APETALA2) diisolasi dari tanaman *chickpea* (*Cicer arietinum*) oleh Rakesh *et al.* (2006). Gen *CAP2* dengan promoter 35S ditransformasikan ke tanaman tembakau dengan *A. tumefaciens*. Tembakau PRG yang mengandung gen *CAP2* menunjukkan toleransi lebih tinggi terhadap cekaman kekeringan dan salinitas, dibandingkan dengan dengan tembakau non PRG (Rakesh *et al.* 2006).

Perakitan tanaman PRG toleran kekeringan dilakukan juga oleh Dai *et al.* (2007). Gen yang digunakan adalah *OsMYB3R-2* dan ditransformasikan ke *Arabidopsis* (*A. thaliana*). Dibandingkan dengan tanaman non PRG, *Arabidopsis* PRG mengekspresikan berlebihan (*over-expressing*) gen *OsMYB3R-2* dan menunjukkan peningkatan toleransi terhadap kekeringan.

Toleran Salinitas

Telah ditemukan banyak substansi dengan bobot molekul rendah berfungsi melindungi cekaman salinitas yang terakumulasi di dalam sel organisme hidup (Greenberg dan Glick 1993). Kasus pada tanaman, berbagai spesies mengakumulasi *glycine betaine*, *proline*, dan gula alkohol seperti *mannitol* dan *sorbitol*. Gen *mt1D* yang mengkode *mannitol-1-phosphate dehydrogenase* yang berasal dari *E. coli* dengan promoter CaMV 35S dan *terminator nos* telah diintroduksi ke tanaman tembakau untuk ketahanan terhadap cekaman salinitas (Bennet 1993) melalui mediasi vektor *Agrobacterium*. Dalam *E. coli* fungsi utama dari enzim yang *reversibel* tersebut adalah mengoksidasi *mannitol-1-phosphate* menjadi *fructose-6-phosphate*. Di dalam tembakau PRG, 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 PRG dibandingkan dengan tembakau kontrol dalam hal toleransi terhadap 25 mM NaCl, maka akumulasi *mannitol* secara nyata dapat melindungi tanaman PRG dewasa sampai pembungaan dan pembentukan biji. Tanaman kontrol (non PRG) mati sebelum pembungaan (Greenberg dan Glick 1993).

Gen *GmTP55* digunakan untuk merakit tanaman PRG toleran salinitas. Tembakau PRG dan *Arabidopsis* PRG yang mengandung gen *GmTP55* menunjukkan toleran salinitas selama fase germinasi (Rodrigues *et al.* 2006). Dalam kondisi cekaman salinitas, efisiensi germinasi biji tembakau PRG, dan *Arabidopsis* PRG secara nyata lebih tinggi dibandingkan dengan tanaman non PRG (Rodrigues *et al.* 2006). Gen lain yang digunakan untuk merakit tanaman PRG toleran salinitas adalah *choline oxidase* (cod A) dari *Arthrobacter globiformis* dan *choline dehydrogenase* (bet A) dari *E. coli* (Uchimiya 2001). Penelitian perakitan padi PRG dilakukan oleh Oh *et al.* (2005) dengan menggunakan gen *CBF3/DREB1A* dan *ABF3* dari *Arabidopsis*. Padi PRG yang mengandung gen tersebut menunjukkan peningkatan toleransi terhadap salinitas tinggi (Oh *et al.* 2005).

A. thaliana PRG yang mengandung gen *spermidine synthase* dari *C. ficifolia* telah dirakit oleh Kasukabe *et al.* (2004). *Arabidopsis* PRG menunjukkan terjadinya peningkatan signifikan aktivitas *spermidine synthase* dan kandungan *spermidine* dalam. Di samping itu, terjadi peningkatan yang nyata pada toleransi tanaman PRG terhadap cekaman salinitas (Kasukabe *et al.* 2004).

Gen *OsMYB3R-2* oleh Dai *et al.* (2007) ditransformasikan ke *Arabidopsis* (*A. thaliana*). *Arabidopsis* PRG mengekspresikan berlebihan (*over-expressing*) *OsMYB3R-2* dan menunjukkan peningkatan toleransi terhadap cekaman salinitas. Germinasi biji tanaman PRG lebih toleran terhadap *abscisic acid* atau NaCl dibandingkan dengan kontrol (non PRG) (Dai *et al.* 2007).

Toleran Oksidatif (*oxidative*)

Beberapa cekaman abiotik seperti cekaman osmotik, logam berat, suhu yang sangat tinggi, intensitas penyinaran matahari yang sangat kuat, beberapa jenis herbisida, polusi gas (SO_2 dan SO_3), dan racun cendawan tertentu mendorong terjadinya produksi berlebih dari *reactive oxygen intermediates* (ROI) termasuk H_2O_2 . Kondisi demikian dapat menyebabkan kerusakan tingkat selular yang ekstensif dan hambatan pada proses fotosintesis (Uchimiya 2001). Selain itu 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 enzimatik (*catalase*, *peroxidase*, dan *super-oxide dismutase*) untuk menangani molekul tersebut. Enzim-enzim itu dapat diproduksi pada berbagai cekaman abiotik. Fungsi mereka adalah menahan pemindahan elektron untuk fotosintesis pada intensitas sinar sedang sampai tinggi.

Kegiatan perakitan tanaman PRG toleran cekaman oksidatif telah banyak dilakukan oleh beberapa grup peneliti. Beberapa gen telah ditemukan dan dimanfaatkan dalam perakitan tanaman PRG toleran cekaman oksidatif.

1. Gen Mn-SOD

Bowler *et al.* (1991) menemukan bahwa tanaman tembakau yang ditransformasi dengan gen Mn-SOD (*superoxide dismutase*) dan *promoter* CaMv 35S 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*.

Penelitian lain dengan menggunakan gen yang sama (Mn-SOD) dilakukan pada tanaman alfalfa (*M. sativa*) oleh McKersie *et al.* (1999). Penelitian ini untuk menguji hipotesis bahwa peningkatan toleransi tanaman terhadap cekaman oksidatif akan memperbaiki daya tahan hidup tanaman di musim dingin. Percobaan di LUT di Ontario, Kanada. Setelah melewati satu musim dingin, tanaman PRG mempunyai tingkat daya tahan dan hasil lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol (non PRG).

2. Gen GmTP55

Rodrigues *et al.* (2006) melaporkan bahwa biji tembakau PRG dan *Arabidopsis* PRG yang mengandung gen *GmTP55* menunjukkan terjadi peningkatan toleran terhadap H₂O₂- dan cekaman oksidatif yang disebabkan oleh *paraquat*. Demikian pula biji kedua tembakau PRG dan *Arabidopsis* PRG yang mengandung gen *GmTP55* berkecambah secara efisien di dalam medium yang mengandung H₂O₂, sedangkan biji tanaman non PRG secara drastis germinasinya terhambat (Rodrigues *et al.* 2006).

3. Gen-gen lain

Beberapa gen lain yang telah digunakan dalam perakitan tanaman PRG toleran oksidatif antara lain *AtBCB*, *parB*, *AtPox*. Gen *AtBCB* adalah *blue-copper-binding protein* dari *Arabidopsis*; *parB* yang mengkode *glutathione S-transferase* dari tembakau; dan *AtPox* mengkode *peroxidase* dari *Arabidopsis*. Galur galur tanaman PRG yang mengandung ketiga gen tersebut menunjukkan peningkatan toleran oksidatif (Ezaki *et al.* 2000).

Toleran Pembekuan dan Suhu Rendah

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 mengandung kode protein *alaninerich anti freeze* yang berasal dari ikan (Greenberg dan Glick 1993). Meskipun protein dari golongan tersebut belum dapat dideteksi 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.

Gen Mn-SOD cDNA dari *Nicotiana plumbaginifolia* dengan promotor *cauliflower mosaic virus* 35S ditransformasikan melalui vektor *A. tumefaciens* ke tanaman alfalfa (*M. sativa* L.) (McKersie *et al.* 1993). Progeni tanaman PRG yang mengandung Mn-SOD mempunyai pertumbuhan kembali (*regrowth*) lebih cepat setelah melewati cekaman pembekuan dibandingkan dengan non PRG (McKersie *et al.* 1993). Pada tahun 1999 penelitian dilanjutkan oleh McKersie *et al.* (1999) dan diuji di lapang. Tingkat *survival* (daya tahan hidup) dan hasil dari 33 tanaman PRG dibandingkan dengan non PRG pada percobaan lapang di Elora, Ontario Kanada di musim dingin. Setelah melewati satu musim dingin tingkat *survival* dan hasil *herbage* (daun dan tangkai) tanaman PRG lebih tinggi dibandingkan dengan non PRG, bahkan ada galur tanaman PRG yang mencapai 100% *survival* (McKersie *et al.* 1999). Tingkat kerusakan akibat pembekuan pada daun juga diamati. Meskipun banyak tanaman PRG mempunyai tingkat *survival* dan hasil *herbage* lebih tinggi dibandingkan dengan non PRG, ternyata tidak ada perbedaan pada tingkat kerusakan tanaman akibat pembekuan (McKersie *et al.* 1999) sehingga dapat disimpulkan bahwa sifat toleran pembekuan tidak terkait dengan tingkat kerusakan tanaman akibat pembekuan (McKersie *et al.* 1999).

Kasukabe *et al.* (2004) melaporkan telah mengkloning *spermidine synthase* cDNA dari *C. ficifolia*. Gen *spermidine synthase* dengan promotor *cauliflower mosaic virus* 35S kemudian ditransformasikan ke *A. thaliana*. Transgen terintegrasi ke genom *Arabidopsis* dengan stabil. Dibandingkan dengan tanaman non PRG, tanaman PRG generasi 2 (T₂) dan 3 (T₃) menunjukkan terjadinya peningkatan signifikan aktivitas *spermidine synthase* dan kandungan *spermidine* dalam daun. Selain terjadi peningkatan yang nyata pada toleransi tanaman PRG terhadap cekaman suhu dingin dan pembekuan. Selama mengalami cekaman suhu dingin 5°C, tanaman PRG menunjukkan peningkatan yang nyata pada aktivitas *arginine decarboxylase* dan kandungan *spermidine* dalam daun dibandingkan dengan kontrol (non PRG) (Kasukabe *et al.* 2004).

Penelitian lain tentang perakitan tanaman PRG toleran terhadap cekaman suhu rendah telah dilakukan oleh Kasuga *et al.* (2004). Mereka menggunakan gen *DREB1A* dengan promotor *inducible rd29A*. Gen tersebut ditransformasikan ke tanaman tembakau. Penelitian perakitan tanaman PRG menghasilkan tembakau PRG yang toleran terhadap cekaman suhu rendah (Kasuga *et al.* 2004).

Dai *et al.* (2007) melakukan penelitian transformasi dengan gen *OsMYB3R-2* pada tanaman *Arabidopsis* (*A. thaliana*). *Arabidopsis* PRG mengekspresikan berlebih (*over-expressing*) gen *OsMYB3R-2* dan menunjukkan peningkatan toleransi terhadap dingin atau suhu rendah dibandingkan dengan tanaman non PRG.

Apabila tanaman tomat dikondisikan pada cekaman pembekuan, terjadi akumulasi mRNA dari *glycerol-3-phosphate acyltransferase* dalam tanaman tomat tersebut. Demikian

pula tingkat ekspresi yang tinggi dalam daun terjadi apabila tanaman tomat dikondisikan pada suhu 4°C selama empat jam (Sui *et al.* 2007). Gen *glycerol-3-phosphate acyltransferase* (*LeGPAT*) telah diisolasi dari tomat (*L. esculentum* Mill.) (Sui *et al.* 2007). Gen *LeGPAT* tersebut dengan promotor 35S-CaMV telah ditransformasikan ke genom tanaman tomat. Meskipun tanaman tomat dikenal dan diketahui sebagai tanaman yang peka terhadap suhu dingin dan cekaman pembekuan, tetapi tomat PRG yang mengekspresikan gen *LeGPAT* berlebihan (*over-expression*) dapat mentolerir suhu pembekuan. Dibandingkan dengan tanaman non PRG, tomat PRG mempunyai tingkat penurunan *leakage* ion dan fotosintesis lebih rendah, serta sembuh dari cekaman pembekuan lebih cepat (Sui *et al.* 2007).

Toleran Logam Berat

Pertumbuhan optimum dan produktivitas tanaman sangat dipengaruhi tingkat kandungan logam berat di dalam tanah seperti *copper* (Cu), *sodium* (Na), *cadmium* (Cd), *zink* (Zn), Pb, Ni, (Uchimiya 2001). Contoh pertama dari tanaman PRG yang stabil dan toleran terhadap cekaman abiotik dari jenis logam berat (Cd) adalah tanaman *B. napus* dan tembakau yang ditransformasi dengan gen *metallothionein-II* melalui vektor *Agrobacterium* (Riazuddin 1994). Promoter yang digunakan adalah CaMV35S dengan terminator nos. Pertumbuhan akar dan tunas dari bibit PRG ternyata tidak dipengaruhi oleh peningkatan CaCl₂ sampai 0,1 mM, sedangkan bibit kontrol (non PRG) menunjukkan penghambatan yang serius pada pertumbuhan akar, tunas, dan daun menjadi klorosis.

Penelitian lain untuk merakit tanaman PRG toleran terhadap cekaman logam berat adalah penelitian Ezaki *et al.* (2000). Penelitian dilakukan pada tanaman *Arabidopsis* dengan menggunakan gen yang mengkode *glutathione S-transferase* (*parB*) yang berasal dari tembakau (*N. tabacum* L.). *Arabidopsis* PRG yang mengandung gen *parB* menunjukkan toleran logam berat Cu dan Na (Ezaki *et al.* 2000). Gen lain yang digunakan untuk tanaman PRG toleran Cu adalah *Metallothionein-like* (PsMTA) yang berasal dari kacang kapri (Uchimiya 2001). Gen yang digunakan Eapen dan D'Souza (2005) dalam perakitan tanaman PRG toleran logam berat adalah *metallothionein* (MT) dan *phytochelatin* (PC). Tanaman PRG dapat mendetoksifikasi *cadmium*, *lead*, *mercury*, *arsenic*, dan *selenium* (Eapen dan D'Souza 2005).

Toleran Keracunan Aluminium (Al)

Aluminium (Al) adalah salah satu jenis logam yang keberadaanya di dunia dalam jumlah besar dan produknya dapat dijumpai di dalam lingkungan hidup manusia seperti kaleng minuman, peralatan dapur, dan bahan pesawat terbang. Meskipun demikian, aluminium (Al³⁺) adalah bahan kimia yang paling tidak bersahabat bagi pertanian karena dapat merusak sel-sel perakaran tanaman yang berakibat terganggunya pertumbuhan akar dan penyerapan unsur hara dalam tanaman (ISB 1997). Di dunia, lebih dari sepertiga tanah yang dapat digunakan untuk budi daya tanaman adalah tanah asam dan mengalami ke-

racunan Al (ISB 1997). Masalah tersebut kebanyakan terdapat pada daerah tropis dan lembab. Tanaman seperti jagung, kedelai, dan kapas tidak dapat tumbuh dengan baik pada tanah asam. Jagung yang tumbuh pada tanah asam dapat menderita kehilangan hasil sampai 80% (ISB 1997). Petani seluruh dunia menggunakan pengapuran untuk mengatasi kendala tersebut.

Sehubungan dengan itu, para peneliti mencoba merakit tanaman toleran Al dengan teknik rekayasa genetik (Herman 1996). Pada awal penelitian perakitan tanaman PRG toleran keracunan Al, gen yang digunakan dalam penelitian tersebut adalah *citrate synthase* (CSb). Gen CSb diisolasi dari bakteri *P. aeruginosa* (De la Fuente *et al.* 1997). Penelitian awal dilakukan oleh Barinaga (1997) dengan mentransformasikan gen CSb ke tanaman padi dan jagung sehingga menjadi toleran terhadap keracunan Al. Gen tersebut kemudian dimasukkan ke dalam genom pepaya dan tembakau (ISB 1997, Uchimiya 2001). Strategi tersebut didasari oleh fakta bahwa tanaman yang toleran Al melepaskan asam sitrat yang akan mengikat logam sehingga sulit masuk ke dalam akar. Enzim dari gen *citrate synthase* yang berasal dari *Pseudomonas*, ditemukan di dalam sitoplasma tanaman PRG (De la Fuente *et al.* 1997, Uchimiya 2001). Beberapa galur tembakau PRG mengekspresikan gen CSb dengan memproduksi 10 kali lipat sitrat di dalam jaringan akar dan salah satu galur melepaskan ekstraseluler sitrat empat kali lipat dibandingkan tanaman non PRG, sedangkan peningkatan produksi asam sitrat dalam pepaya PRG hanya dua sampai tiga kali lipat (De la Fuente *et al.* 1997, ISB 1997, Uchimiya 2001). Apabila tanaman PRG ditumbuhkan pada kandungan Al sangat tinggi dan kondisi asam, maka tanaman PRG yang mengandung gen CSb mengalami hambatan pertumbuhan akar secara substansial lebih rendah dibandingkan dengan tanaman kontrol (non PRG) (De la Fuente *et al.* 1997, ISB 1997). Apabila biji tanaman non PRG dikecambahkan pada kondisi Al tinggi akan gagal berakar, sedangkan tanaman PRG menunjukkan perakaran normal (De la Fuente *et al.* 1997, ISB 1997). Akar tanaman PRG ternyata mengandung Al yang kurang atau lebih sedikit dalam jaringan akarnya, hal tersebut kemungkinan disebabkan *citrate synthase* yang diproduksi oleh tanaman PRG, menghalangi pengambilan Al. Grup peneliti lain (Delhaize *et al.* 2001) melakukan penelitian yang sama dengan menggunakan tanaman tembakau dan gen *citrate synthase* (CSb) dari bakteri *P. aeruginosa*. Ternyata grup peneliti tersebut tidak berhasil mengulangi hasil penelitian De la Fuente *et al.* (1997).

Ezaki *et al.* (2000) melakukan penelitian perakitan PRG toleran keracunan Al pada tanaman *Arabidopsis*. Beberapa gen digunakan dalam penelitian tersebut, yaitu gen *blue-copper-binding protein* (*AtBCB*) dari *Arabidopsis*; gen *glutathione S-transferase* (*parB*) dari tembakau; gen *peroxidase* (*NtPox*) dari tembakau, dan gen *GDP-dissociation inhibitor* (*NtGDI1*) juga dari tembakau. Tanaman *Arabidopsis* PRG yang mengandung empat gen tersebut menunjukkan toleransi terhadap keracunan Al (Ezaki *et al.* 2000). Kandungan Al di dalam akar empat galur tanaman PRG yang masing-masing mengandung *AtBCB*, *parB*, *tPox*, dan *NtGDI1* berkurang dibandingkan dengan non PRG (Ezaki *et al.* 2000). Dari laporan

Ezaki *et al.* (2000) disimpulkan bahwa empat gen *AtBCB*, *parB*, *tPox*, dan *NtGDII* dapat digunakan sebagai gen untuk merakit tanaman PRG toleran keracunan Al.

TOLERAN HERBISIDA

Gulma tumbuh dalam lahan yang sama dengan tanaman pertanian, dan dapat mengurangi hasil tanaman secara signifikan, karena gulma berkompetisi dengan tanaman dalam hal unsur hara, air, dan sinar matahari (GEO-PIE 2003a). Gulma dapat mengurangi hasil tanaman sampai 20% (Hinchee *et al.* 1993). Herbisida sintesis sering digunakan dalam pengendalian gulma di pertanian (GEO-PIE 2003a). Di negara maju seperti AS penggunaan herbisida sebagai bahan pengendali gulma sudah sangat intensif, karena kerugian yang diakibatkan oleh gulma setahun mencapai tiga sampai empat miliar dolar AS. Herbisida diklasifikasikan berdasarkan jenis gulma yang dikendalikan (GEO-PIE 2003a). Herbisida yang mempunyai daya aktivitas berspektrum luas (*broad-spectrum*) sering dan banyak diaplikasikan pada saat sebelum tanaman tumbuh (*pre-emergence*) untuk mematikan gulma (GEO-PIE 2003a). Setelah tanaman tumbuh (*post emergence*), gulma yang ada di lahan pertanian tidak dapat dikendalikan hanya oleh herbisida, oleh karena itu gulma dikendalikan secara mekanis baik dengan penyiangan, traktor maupun dengan pencangkulan. Beberapa dekade terakhir, dengan adanya peningkatan adopsi praktek *zero tillage* atau *no-till farming* (untuk mengurangi erosi tanah) dan banyaknya pengembangan herbisida *post-emergence* baru, sekarang banyak petani mengendalikan gulma dengan menyemprot langsung ke tanaman pertanian (GEO-PIE 2003a). Sebab umumnya herbisida *post-emergence* mempunyai daya aktivitas mematikan gulma yang lebih berspektrum sempit (*narrow spectrum*), jika tidak mematikan gulma mereka juga akan mematikan tanaman pertanian (GEO-PIE 2003a). Sehubungan dengan itu banyak petani mengendalikan gulma *post-emergence* dengan mencampur beberapa herbisida. Sebagai contoh, petani tanaman sereal sering mengaplikasikan beberapa herbisida untuk mematikan gulma berdaun lebar (*broad leaves*) atau sejenis tanaman dikotil sepanjang musim tanam (GEO-PIE 2003a).

Dengan perkembangan teknologi DNA rekombinan yang makin maju, para peneliti mulai mencoba merakit tanaman toleran herbisida (TH) khususnya herbisida berspektrum luas, melalui rekayasa genetik (Herman 1996). Melalui teknik rekayasa genetik, gen asing dapat dimasukkan ke genom tanaman, sehingga dapat menghilangkan pengaruh racun herbisida (Mazur dan Falco 1989). Dengan tanaman TH, pengelolaan gulma di lahan pertanian akan menjadi lebih sederhana dengan mengaplikasikan herbisida tunggal tanpa harus khawatir mematikan tanaman pertanian, sehingga akan mengurangi jumlah aplikasi herbisida (GEO-PIE 2003a). Seperti halnya penelitian perakitan tanaman PRG tahan cekaman biotik dan toleran cekaman abiotik, perakitan tanaman PRG TH juga telah dilakukan oleh beberapa grup peneliti (Comai *et al.* 1985, Della-Cioppa *et al.* 1987, Mazur dan Falco 1989, Van de Krol *et al.* 1990, Hinchee *et al.* 1993).

Dalam perakitan tanaman PRG TH biasanya menerapkan satu atau kombinasi dua strategi agar tanaman dapat toleran terhadap herbisida tertentu:

1. Tanaman PRG memproduksi protein baru yang dapat mendetoksifikasi herbisida; atau
2. Protein di dalam tanaman yang menjadi target dari kerja herbisida digantikan oleh protein baru yang tidak terpengaruh oleh herbisida tersebut atau dengan kata lain menjadi toleran terhadap herbisida tersebut (GEO-PIE 2003b).

Ada beberapa gen yang telah ditransformasikan ke tanaman untuk memperoleh tanaman TH:

1. **Gen EPSPS** (“3-enolpyruvylshikimate-5-phosphate synthase”) dan gen GOX (*glyphosate oxidoreductase*) untuk toleransi terhadap herbisida *glyphosate*.

Pada awal penelitian perakitan tanaman PRG TH dilakukan dengan menggunakan gen *aro* yang mengandung kode 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) yang toleran terhadap herbisida *glyphosate* (Della-Cioppa *et al.* 1987). EPSPS adalah hasil isolasi dari bakteri *Klebsiella pneumoniae*. Mutan EPSPS toleran *glyphosate* telah diisolasi dari *Salmonella typhimurium* dan dipetakan pada lokus *aroA* EPSPS (Comai *et al.* 1985). Enzim mutan tersebut menunjukkan toleran terhadap *glyphosate* sampai dua kali lipat sewaktu gen *aroA* diklonkan di *E. coli*. *E. coli* yang telah mengalami transformasi mampu hidup dan tumbuh pada media dengan *glyphosate* 200 mg/ml. Melalui mediasi vektor *Agrobacterium* gen *aroA* telah ditransformasikan pada tanaman tembakau yang hasilnya menunjukkan bahwa tembakau PRG dapat tumbuh 70% pada 20 hari setelah penyemprotan *glyphosate* dengan dosis 0,5 kg/ha dibandingkan dengan hanya 10% tanaman kontrol (non PRG) (Comai *et al.* 1985).

Grup peneliti lain telah mengisolasi gen EPSPS dari bakteri tanah (*Agrobacterium* sp.) yang juga mengkode toleransi terhadap herbisida *glyphosate* (GEO-PIE 2003b). Untuk meningkatkan toleransi terhadap herbisida *glyphosate* ada tambahan gen GOX yang diisolasi dari bakteri *Achromobacter* (GEO-PIE 2003b). Gen GOX ini dapat mendetoksifikasi *glyphosate*. Dalam proses rekayasa genetik gen GOX digunakan sebagai marka penyeleksi (*selectable marker*).

Beberapa tanaman PRG TH *glyphosate* seperti kapas, jagung, kedelai, dan kanola telah berhasil dirakit melalui teknik rekayasa genetik dan dikomersialisasikan di pasaran global. Di pasaran, tanaman tersebut disebut dengan ND *Roundup Ready* (GEO-PIE 2003b). Perusahaan multinasional yang merakit dan memasarkan tanaman PRG TH tersebut juga berhasil merakit gula bit (*sugar beet*) TH *glyphosate* (GEO-PIE 2003b).

Tanaman PRG TH *glyphosate* seperti kapas, jagung, dan kedelai sudah diuji di Indonesia. Bioasai tiga tanaman PRG TH *glyphosate* tersebut telah dilakukan di FUT BB-Biogen dan di LUT (Gambar 7). Hasil bioasai menunjukkan bahwa tanaman PRG TH memang toleran *glyphosate* (TTKH 1999a, 1999b, 1999c, 1999d, 1999e, 1999f).



Gambar 7. Bioasai jagung TH glifosat di FUT, BB-Biogen (A) dan di LUT, Sulawesi Selatan (B) (TTKH 1999a, 1999b).

2. Gen PAT (*phosphinothricin acetyltransferase*) untuk toleransi terhadap herbisida *glufosinate*

Pendekatan alternatif adalah mengintroduksi gen *bar* mengandung kode untuk *phosphinothricin acetyl transferase* (PAT) diisolasi dari *Streptomyces hygroscopicus*. Gen *bar* selain digunakan sebagai gen marka untuk menyeleksi sel atau jaringan yang ter-transformasi juga digunakan untuk diintroduksi ke tanaman supaya TH (Hinchee *et al.* 1993). Kentang, tembakau, dan tomat PRG yang mengandung gen *bar* dengan *promoter* CaMV 35S dapat mentolerir herbisida dengan dosis empat sampai 10 kali lebih besar daripada dosis normal di lapang (Hinchee *et al.* 1993). PAT dapat mendetoksifikasi herbisida *glufosinate* yang berbahan aktif *phosphinothricin* dan melindungi dari bloking enzim *glutamine synthase* (GEO-PIE 2003b).

Tanaman PRG TH *glufosinate* yang berhasil dirakit adalah jagung, kedelai, kanola, padi, dan gula bit (GEO-PIE 2003b). Tapi padi PRG dan gula bit PRG TH *glufosinate* tidak dilanjutkan untuk dikomersialkan. ND tanaman PRG TH *glufosinate* adalah *LibertyLink* (GEO-PIE 2003b).

3. **Gen BXN** (*Bromoxynil nitrilase*) untuk toleransi terhadap herbisida *bromoxynil*

Gen BXN diisolasi dari bakteri *K. pneumoniae*. Gen BXN dapat mendetoksifikasi herbisida *bromoxynil* sehingga menjadi toleran terhadap herbisida tersebut (GEO-PIE 2003b). Tanaman yang sudah berhasil dirakit adalah kapas PRG TH *bromoxynil*.

4. **Gen ALS** (*acetolactate synthase*) untuk toleransi terhadap herbisida *sulfonylurea*

Gen ALS diisolasi dari tanaman tembakau. Gen ALS dapat membentuk versi baru dari ALS dalam tanaman PRG TH sehingga menjadi toleran terhadap herbisida *sulfonylurea* (GEO-PIE 2003b). Tanaman PRH TH *sulfonylurea* yang berhasil dirakit adalah *flax* (*Linum usitatissimum* L.), kapas, dan sorgum (GEO-PIE 2003b, KSU 2008).

MODIFIKASI KUALITAS TANAMAN

Modifikasi kualitas tanaman melalui rekayasa genetik yang telah dilakukan antara lain penundaan kemasakan, perubahan pigmen warna bunga, perubahan komposisi lemak, perubahan komposisi asam amino, perubahan kandungan vitamin, perubahan kandungan *anthocyanin*, perubahan kandungan gula, penurunan kandungan amilosa, dan buah tanpa biji (partenokarpi). Gen-gen yang telah digunakan dalam perbaikan tanaman untuk memodifikasi kualitas tanaman antara lain: *polygalacturonase* dan *ACC oxidase* untuk penundaan kemasakan; gen *chalcone synthase*, gen *delphinidin F3'5'H*, gen DFR, dan gen *hairpin RNAi* untuk perubahan pigmen warna bunga; *acyl-carrier protein thioesterase* (ACPT) untuk perubahan komposisi lemak; *chimeric gene encoding a methioninerich protein* untuk perubahan komposisi asam amino; *phytoene synthase* (*psy*) dan gen yang mengkode *phytoene desaturase* (*crt I*) untuk peningkatan kandungan vitamin A; gen *pall* untuk peningkatan kandungan gula, *inverted repeat cassava GBSS cDNA* untuk penurunan kandungan amilosa, gen *defH9-iaaM* untuk buah tanpa biji (Schuch *et al.* 1989, Kramer *et al.* 1989, Van de Krol *et al.* 1990, Greenberg dan Glick 1993, Altenbach 1989, Ye *et al.* 2000, Vetten 2004, Butelli *et al.* 2008, CSIRO 2005, Katsumoto *et al.* 2007, Börnke *et al.* 2002, Zhang dan Zhang 2002, Rotino *et al.* 2005).

Penundaan Kemasakan

Salah satu kendala dalam transportasi buah-buahan adalah cepat masakannya buah yang diangkut. Proses pemasakan buah dimulai dari perubahan dinding buah yang menjadi lunak, diiringi dengan produksi komponen warna, perubahan kandungan gula, *flavor*, dan aroma. Pada kebanyakan buah seperti tomat dan pepaya, proses pemasakan dimulai apabila buah memproduksi *volatile compound* yang disebut *ethylene*. Apabila buah tomat atau pepaya sedang masak akan melepaskan gas *ethylene* ke udara. Kondisi tersebut akan mempercepat proses pemasakan buah-buahan tomat atau pepaya lain yang disimpan dalam kantong atau kotak yang sama. *Ethylene* adalah pemicu utama terjadinya pemasakan buah. Sehubungan dengan itu para peneliti melakukan percobaan untuk merakit tanaman

PRG yang pemasakan buahnya dapat ditunda. Strategi yang mereka pakai adalah mengurangi atau menghalangi produksi *ethylene*. Dalam bagian ini akan dibahas mengenai penundaan kemasakan (PK) pada tomat PRG dan pepaya PRG.

1. Tomat PRG

Ada tiga strategi yang telah digunakan dalam proses perakitan tomat PRG yang pemasakan buahnya dapat ditunda. Strategi tersebut terkait dengan pengurangan produksi *ethylene*:

a. Pengurangan ACC *synthase*

ACC *synthase* adalah enzim di dalam buah tomat yang bertanggung jawab dalam tahapan sintesis *ethylene* dalam buah. Pengurangan tingkat ACC *synthase* secara dramatis mengurangi produksi *ethylene*. Para peneliti menemukan bahwa dengan mentransformasikan gen *antisense* ACC *synthase* ke genom tanaman tomat, produksi *ethylene* dalam buah tanaman menjadi terhambat dan pemasakan buahnya dapat ditunda (GEO-PIE 2004b). Tomat PRG tersebut dikembangkan oleh perusahaan DNA Plant Technologies dan dipasarkan dengan nama *Endless Summer* (GEO-PIE 2004b).

b. Penambahan ACC *deaminase*

Para peneliti telah mentransformasikan gen yang berasal dari bakteri tanah *Pseudomonas chlororaphis* (GEO-PIE 2004b). Gen tersebut mengkode enzim ACC *deaminase*, yang dapat memecahkan salah satu *precursor* sintesis *ethylene* (ACC). Pengurangan tingkat *precursor* dapat menyebabkan pengurangan produksi *ethylene* dan menunda proses kemasakan (GEO-PIE 2004b). Salah satu perusahaan bioteknologi swasta, yaitu Monsanto mengembangkan tomat PRG dengan sifat PK, tetapi tidak sampai dikomersialkan (GEO-PIE 2004b).

c. Penambahan SAM *hydrolase*

Gen lain yang digunakan dalam perakitan tomat PRG yang pemasakan buahnya dapat ditunda adalah SAM *hydrolase*. Gen tersebut berasal dari *bacteriophage* bakteri *E. coli* T₃ (GEO-PIE 2004b). Gen tersebut juga dapat memecahkan salah satu *precursor* sintesis *ethylene* (SAM). Teknologi ini telah dikembangkan oleh suatu perusahaan bioteknologi Agritope, Inc. dan diaplikasikan pada tomat varietas Cherry (GEO-PIE 2004b).

d. Strategi lain

Kramer *et al.* (1989) juga menggunakan pendekatan gen *antisense* untuk menunda pelunakan buah tomat. Tetapi dalam kasus mereka, konstruksi gen *antisense* yang digunakan menghasilkan RNA yang berkomplemen dengan mRNA yang mengandung kode *L-amino-cyclopropane L-carboxylate* (ACC) *oxidase*, yaitu enzim yang bertanggung jawab dalam proses oksidasi ACC menjadi *ethylene*. Telah diketahui bah-

wa *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* dan gen yang mengandung kode *ACC synthase*.

Strategi lain yang digunakan adalah merubah satu aspek khusus dalam pemasakan buah, yaitu pelunakan dinding buah. *Polygalacturonase* adalah satu dari beberapa enzim kunci (penting) dalam proses pelunakan selama pemasakan buah (Grierson *et al.* 1985). Schuch *et al.* (1989) mendemonstrasikan bahwa pendekatan dengan gen *antisense* dapat merendahkan tingkat *polygalacturonase*, dalam buah tomat PRG dan dapat memperpanjang waktu penyimpanan tanpa terjadi pelunakan buah.

Salah satu perusahaan swasta bioteknologi Calgene telah merakit tomat PRG dengan sifat PK. Gen *antisense polygalacturonase* (PG) dengan promoter CaMV 35S dan gen penanda ketahanan antibiotik *neo* (yang mengkode enzim *neomycin phosphotransferase* II atau NPTII), ditransformasikan melalui mediasi vektor *A. tumefaciens* ke genom tanaman tomat. Gen PG hasil isolasi dari *elementransposon* Tn5 bakteri *E. coli*. Tomat PRG dengan sifat PK tersebut dikenal dengan ND *Flavr Savr*. Menurut Agbios (2001a) tomat *Flavr Savr* telah memperoleh keamanan lingkungan pada tahun 1992 di Amerika Serikat, 1995 di Meksiko, dan 1996 di Jepang. Selain itu memperoleh ketetapan keamanan pangan dan pakan pada tahun 1994 di Amerika Serikat, dan 1995 di Meksiko, serta keamanan pangan saja pada tahun 1995 di Inggris, 1997 di Kanada dan pada tahun 1997 di Jepang (AgBios 2001a, GEO-PIE 2004a). Setelah memperoleh status keamanan lingkungan, keamanan pangan dan atau keamanan pakan, tomat PRG *Flavr Savr* dipasarkan di lima negara tersebut. Dalam pengembangan tomat PRG *Flavr Savr* mengalami masalah teknis dalam produksi, sehingga pada Maret tahun 1997 sudah tidak ada lagi tomat PRG di pasaran (GEO-PIE 2004a).

2. Pepaya PRG

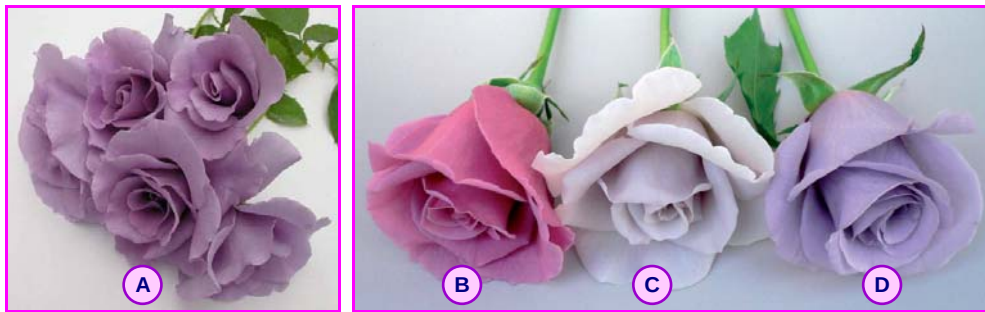
Kloning dan karakterisasi gen *ACC synthase* dan *ACC oxidase* dari pepaya (*Carica papaya* L.) telah dilakukan oleh Neupane *et al.* (1996) dan Varona *et al.* (2002). Teknik kloning gen tersebut telah diikuti oleh banyak peneliti. Gen *ACC synthase* telah digunakan dalam perakitan pepaya PRG yang mempunyai sifat PK (Magdalita *et al.* 2001, 2003). *ACC oxidase*, yaitu enzim yang bertanggung jawab dalam proses oksidasi ACC menjadi *ethylene*. Gen *antisense ACC oxidase* juga digunakan dalam perakitan pepaya PRG yang mempunyai sifat PK. Litbang pepaya PRG telah dilakukan oleh beberapa negara ASEAN antara lain Filipina, Indonesia, Malaysia, dan Thailand (Magdalita *et al.* 2004b, Damayanti 2005, Muda *et al.* 2003, Burns *et al.* 2004). Teknik transfer gen yang digunakan peneliti ASEAN dalam perakitan pepaya PRG adalah penembakan partikel (Damayanti 2005) dan vektor *Agrobacterium* (Magdalita *et al.* 2004b). Di Malaysia, pepaya PRG telah diuji di lapangan terbatas (Muda *et al.* 2003).

Perubahan Pigmen Warna Bunga

Pendekatan *antisense* telah digunakan oleh Van de Krol *et al.* (1990) untuk mengubah pola pigmentasi bunga petunia. Konstruksi gen yang digunakan dalam penelitian mengandung orientasi terbalik dari gen *chalcone synthase*, satu dari enzim awal dalam proses produksi *flavonoids* dari *phenylalanine*. Penelitian lain (Meyer *et al.* 1987) 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. Analisis *Northern Blot* pada RNA tanaman PRG menunjukkan bahwa gen pigmen yang diisolasi dari jagung benar-benar telah diekspresikan.

Gen DFR yang mengkode enzim *dihydroflavonol reductase* telah diisolasi dari tanaman petunia (*Petunia hybrida*). Gen lain yang mengkode enzim *flavonoid 3', 5'-hydroxylase* (F3',5'H) juga diisolasi dari tanaman pansy hitam (*Viola tricolor*). Gen DFR dan gen F3',5'H ditransformasikan ke tanaman hias *carnation* (*Dianthus caryophyllus*) dengan vektor *A. tumefaciens* (AgBios 2001b). Dua gen tersebut berfungsi dalam biosintesis *anthocyanin pigment delphinidin* sehingga menghasilkan warna bunga yang unik, yaitu ungu gelap pada *carnation* PRG, sedangkan bunga *carnation* non PRG berwarna putih (AgBios 2001b). *Event carnation* PRG yang memperoleh izin komersial adalah 959A, 988A, 1226A, 1351A, 1363A, dan 1400A (AgBios 2001c). Dua gen yang sama juga ditransformasikan ke *carnation* dengan *A. tumefaciens* menghasilkan *carnation* PRG dengan warna bunga *violet/mauve* dengan empat *event*, yaitu 4, 11, 15, dan 16 (AgBios 2001b).

Perakitan tanaman PRG untuk merubah warna bunga juga dilakukan pada bunga mawar agar berwarna biru (GMOC 2008). Penelitian tersebut dilakukan oleh peneliti dari *Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization* yang bekerjasama dengan peneliti dari perusahaan *Japanase Suntory* (CSIRO 2005, SQ 2005). Gen DFR dalam bunga mawar sangat berperan dalam pembentukan pigmen merah, tetapi tidak dapat menghasilkan warna biru. Untuk merubah pembentukan pigmen merah menjadi biru, peneliti dari CSIRO mulai melakukan penelitian untuk mencari *gene silencing* atau *hairpin RNA interference* (RNAi) pada tahun 1997. Ternyata gen tersebut dapat menghentikan pembentukan warna merah pada bunga mawar (CSIRO 2005). Secara alami, bunga mawar tidak mempunyai kelompok warna biru dari *anthocyanin (delphinidin)*, karena tidak ada enzim kunci yang diperlukan dalam sintesis *flavonoid 3',5'-hydroxylase* (F3'5'H). Gen *delphinidin* (F3'5'H, berasal dari pansy hitam, *V. tricolor*), gen DFR (berasal dari Iris, *Iris hollandica*), gen yang mengkode enzim *anthocyanin 5-acyltransferase* (berasal dari *Torenia hybrida*), dan gen *hairpin* RNAi (yang memblokir gen DFR dari mawar) ditransformasikan ke tanaman mawar melalui vektor *A. tumefaciens* (CSIRO 2005). Mawar PRG hasil transformasi me-



Gambar 8. Warna ungu muda pada bunga mawar PRG menggunakan teknologi RNAi *gene-knockout* hasil penelitian CSIRO (A) dan Katsumoto *et al.* 2007 (D); warna merah muda (*pink*) dan putih adalah mawar non PRG (B dan C).

nunjukkan warna ungu muda (Gambar 8A). Penelitian Katsumoto *et al.* (2007) yang menggunakan gen yang sama juga menghasilkan mawar berwarna ungu muda (Gambar 8B) dengan kandungan *delphinidin* yang tinggi.

Perubahan Komposisi Lemak

Gen *acyl-carrier protein thioesterase* (ACPT) yang berasal dari tanaman *oilseed* California bay (*Umbellularia californica*) telah ditransfer ke tanaman *Arabidopsis* (Greenberg dan Glick 1993). Kegiatan ini ditujukan untuk mengubah sintesis rantai asam lemak dari molekul C16 atau C18 menjadi C12 *laurate*. Untuk menjamin *thioesterase* bekerja aktif di dalam biji *Arabidopsis* pada saatnya memproduksi *triacyl glycerol*, maka gen ACPT digabungkan dengan promotor dari gen *napin*. *Napin* adalah protein *seed storage* dari *B. napus*. Tanaman PRG hasil transformasi menunjukkan produksi biji yang mengandung C12 *laurate* sebagai suatu bagian besar dari asam lemak dalam *triacyl glycerol*.

Dalam rangka memodifikasi kandungan asam lemak dalam tanaman PRG, kopi kedua (*second copy*) gen *fatty acid desaturase* (*GmFad2-1*) yang berasal dari kedelai (*G. max*) dengan menggunakan promotor spesifik biji, telah ditransformasikan ke genom tanaman kedelai dengan teknik penembakan partikel. *Fatty acid desaturase* bertanggung jawab dalam sintesis asam linoleat (*linoleic acid*). Dengan adanya kopi kedua gen *fatty acid desaturase* menyebabkan terjadinya *gene silencing* sehingga dua kopi gen *fatty acid desaturase* menjadi *switched off*. Keadaan tersebut menghalangi terjadinya sintesis asam linoleat dan menyebabkan terjadinya akumulasi asam oleat (*oleic acid*) dalam perkembangan biji kedelai (AgBios 2001d, HC 2000). Melalui transformasi tanaman kedelai tersebut, telah dihasilkan tiga *event* kedelai PRG (G94-1, G94-19, dan G168) yang mengandung asam oleat tinggi, yaitu dari 20% menjadi 80% (AgBios 2001d, HC 2000, GEO-PIE 2004c).

Perakitan tanaman PRG dengan kandungan asam oleat tinggi juga dilakukan pada tanaman kapas, *Gossypium hirsutum* (Chapman *et al.* 2001, Liu *et al.* 2002) dan kacang tanah, *A. hypogea* (Yin *et al.* 2007). Gen *oleate desaturase* (*FAD2*) ditransformasikan ke

genom tanaman kacang tanah melalui mediasi *A. tumefaciens*. Dari transformasi tersebut dihasilkan kacang tanah PRG dengan kandungan asam oleat tinggi (70%) dibandingkan dengan non PRG yang hanya mengandung 37,93% (Yin *et al.* 2007). Gen *FAD2* juga digunakan oleh Chapman *et al.* (2001) untuk mentransformasi kapas melalui mediasi *A. tumefaciens*. Chapman *et al.* (2001) memperoleh kapas PRG dengan kandungan asam oleat 47% sedangkan kapas non PRG hanya mengandung 15%. Kegiatan lain perakitan kapas PRG dengan kandungan asam oleat tinggi dilakukan oleh Liu *et al.* (2002). Gen *Hairpin RNA* (HP) ditransformasikan ke genom tanaman kapas lewat mediasi *A. tumefaciens*. Gen HP menekan dua gen kunci asam lemak *desaturase*, yaitu *ghSAD-1* dan *ghFAD2-1* (Liu *et al.* 2002). Gen *GhSAD-1* yang mengkode *stearoyl-acyl-carrier protein Δ 9-desaturase* dan gen *ghFAD2-1* yang mengkode *oleoyl-phosphatidylcholine ω 6-desaturase*. Kapas PRG yang diperoleh mengandung asam stearat (*stearic acid*) 40% dibandingkan dengan non PRG 2-3%, sedangkan kandungan asam oleat mencapai 77% pada kapas PRG dan sekitar 15% pada non PRG (Liu *et al.* 2002).

Perakitan kanola PRG mengandung asam laurat (*lauric acid*) tinggi telah menghasilkan dua *event* kanola PRG 23-198 dan 23-18-17 (AgBios 2005). Gen TE yang mengkode *thioesterase* telah diisolasi dari pohon *California bay* (*U. californica*). Gen tersebut dengan promoter spesifik biji ditransfer ke genom tanaman kanola (*B. napus*) melalui teknik transformasi mediasi *A. tumefaciens* (HC 1999).

Perubahan Komposisi Asam Amino

Protein yang terkandung dalam biji umumnya mengandung asam amino terbatas yang tersusun dalam unit struktur yang terulang (Shutov dan Vaintraub 1987). Dari jumlah tersebut, sering kekurangan satu atau lebih asam amino yang penting untuk *diet* manusia, sehingga mengakibatkan terbatasnya potensi nilai makanan yang terbuat dari biji tanaman tersebut.

Untuk mensintesis protein, manusia dan hewan memanfaatkan komplemen penuh dari 20 asam amino. Meskipun hewan mampu mensintesis beberapa bahan dari siklus asam sitrat, ada 10 asam amino penting (*arginine*, *histidine*, *isoleucine*, *leucine*, *lysine*, *methionine*, *phenylalanine*, *threonine*, *tryptophan*, dan *valine*) yang harus diperoleh dalam *diet* baik secara langsung maupun tidak langsung dari sumbernya, yaitu tanaman.

Akhir-akhir ini, telah berkembang usaha untuk mengubah komposisi asam amino dalam protein biji sehingga dapat mengandung spektrum asam amino yang lebih baik. Penelitian Altenbach *et al.* (1989) yang menggunakan gen *chimeric* yang mengandung kode *methionine rich seed protein* dari kacang Brasil untuk meningkatkan 30% kandungan *methionine* dan protein biji tembakau. Penelitian Shane dan Galli (1992) menunjukkan bahwa kandungan *lysine* tanaman tembakau telah ditingkatkan jumlahnya dengan diekspresikannya *bacterial dihydropicolinate synthase* dalam kloroplas. *Dihydropicolinate synthase* adalah enzim pertama dari *biosynthetic pathway lysine*.

Perubahan Kandungan Vitamin

Secara alamiah padi mensintesis β -carotene di dalam jaringan vegetatif, tetapi tidak di dalam bulir padi. *Pathway* biosintesis β -carotene (provitamin A) dapat dilakukan di dalam endosperma padi melalui rekayasa genetik (Al-Babili *et al.* 2001, Beyer *et al.* 2002). Kegiatan perakitan padi PRG yang mengandung β -carotene sudah dimulai pada tahun 1999 (Ye *et al.* 2000, GRP 2006). Padi PRG yang mengandung β -carotene dikenal dengan nama populer padi emas (*golden rice*). Padi emas merupakan hasil litbang dari kolaborasi antara Peter Beyer dan Ingo Potrykus (Ye *et al.* 2000, GRP 2006). Padi emas dihasilkan dari mentransformasi gen yang mengkode *phytoene synthase* (*psy*) dan gen yang mengkode *phytoene desaturase* (*crt I*) dengan promotor 35S melalui vektor *A. tumefaciens* ke dalam genom tanaman padi. Gen *psy* berasal dari *daffodil*, sedangkan gen *crt I* berasal dari bakteri *Erwinia uredovor*. Dengan menambahkan dua gen *psy* dan *crt I*, maka *pathway* pembentukan β -carotene dapat dirubah sehingga β -carotene dapat berakumulasi di dalam endosperma, yang merupakan bagian dalam bulir padi. Akibat akumulasi dari β -carotene (provitamin A) dan *xanthophyll*, endosperma padi emas berwarna kuning (Schaub *et al.* 2005), sehingga berasnya berwarna kuning (Gambar 9). Dengan dihasilkan padi emas generasi 1 (*golden rice 1* atau GR1), sudah dapat dibuktikan suatu konsep bahwa dengan mentransformasikan gen *psy* dan *crt I*, β -carotene dapat berakumulasi di endosperma. Dua gen tersebut diekspresikan hanya di endosperma padi. Tingkat kandungan *carotenoid* yang diperoleh di rumah kaca hanya 1-2 $\mu\text{g/g}$, tetapi hasil produksi di lapang akumulasi *carotenoid* dapat mencapai 6 $\mu\text{g/g}$. Kandungan *carotenoid* sebanyak 6 $\mu\text{g/g}$ diharapkan dapat memenuhi kebutuhan vitamin A yang direkomendasikan untuk anak-anak.

Padi emas generasi selanjutnya atau generasi 2 (GR2) diusahakan untuk dapat meningkatkan kandungan *carotenoid* lebih tinggi lagi. Untuk itu dilakukan beberapa kegiatan untuk memperoleh gen *psy* dari beberapa sumber. Hasil penelitian Paine *et al.* (2005) yang mencoba mencari gen *psy* dari sumber lain, menemukan gen *psy* yang berasal dari jagung dan padi adalah terbaik di antara sumber-sumber yang lain. Akumulasi *carotenoid* dalam padi emas GR2 dapat mencapai 37 $\mu\text{g/g}$ dan 31 $\mu\text{g/g}$ β -carotene. Kandungan β -carotene tersebut cukup tinggi (32 kali) kalau dibandingkan dengan kandungan β -carotene dari padi

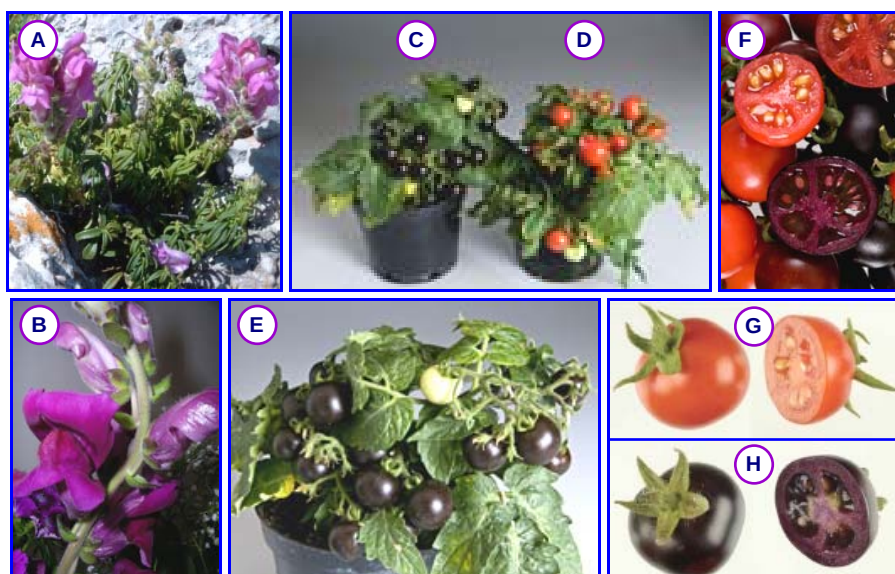


Gambar 9. Biji padi yang berasal dari padi non PRG (*wild type*) (A dan D), biji dari padi emas generasi 1 (*golden rice 1*) (B), dan biji dari padi emas generasi 2 (*golden rice 2*) (C dan E) (GRP 2006, Wikipedia 2007).

emas generasi 1 (GR1) yang hanya 1,6 $\mu\text{g/g}$ (Paine *et al.* 2005). Menurut Barry (2008) padi emas GR1 dan GR2 telah disilangkan dengan padi varietas IR64, IR36, dan BR29 (varietas populer dari Bangladesh). Pada April 2008, progeni hasil persilangan IR64 dengan GR1 telah ditanam di LUT IRRI, Filipina.

Perubahan Kandungan *Anthocyanin*

Secara alami, buah kaya dengan pigmen antioksidan berupa *anthocyanin* yang telah diketahui sebagai bahan penghambat pertumbuhan sel-sel kanker. Kandungan *anthocyanin* yang tinggi hanya dijumpai dalam buah *blackberry*, *cranberry*, dan *chokeberry*, tetapi tidak dalam buah tomat. Tanaman tomat diketahui juga mengandung antioksidan *lycopene* dan *flavonoids* yang tinggi. Peneliti pada lembaga penelitian *John Innes Centre* di Inggris telah berhasil merakit tomat PRG yang mengandung *anthocyanin* tinggi (Butelli *et al.* 2008). Tomat PRG yang mengandung *anthocyanin* tinggi dirakit dengan mentransformasi tanaman tomat dengan dua gen (*del* dan *Ros1*) faktor transkripsi (*transcription factor genes*) melalui mediasi vektor *A. tumefaciens* (Butelli *et al.* 2008). Gen *del* dan *Ros1* berasal dari bunga tanaman *snapdragon* (*Antirrhinum majus*) *Della* dan *Roseal* (Gambar 10A dan 10B). Buah tomat PRG dengan kandungan *anthocyanin* tinggi menunjukkan warna ungu (Gambar 10C dan 10E). Daging buah tomat PRG juga berwarna ungu (Gambar 10 F dan 10H).



Gambar 10. Bunga tanaman *snapdragon* (A dan B), buah berwarna ungu pada tomat PRG dengan kandungan *anthocyanin* tinggi (C, E, dan H), buah berwarna merah pada tomat non PRG (D dan G), dan potongan buah tomat PRG warna ungu dan non PRG warna merah (F) (Butelli *et al.* 2008, Xie 2008, GM 2008, SB 2008, BBCN 2008, JIC 2008).

Perubahan Kandungan Gula

Bakteri *Erwinia rhapontici* mampu merubah sukrosa menjadi isomaltulose (palatinose, 6-O- α -D-glucopyranosyl-D-fructose) dan trehalulose (1-O- α -D-glucopyranosyl-D-fructose) melalui aktivitas sucrose isomerase (Börnke et al. 2001). Pada tahun 2001, Börnke et al. untuk pertama kalinya mengkloning dan mengkarakterisasi gen palatinosa (*pall*) dari *E. rhapontici*. Gen *pall* yang diisolasi dari *E. rhapontici* tersebut dengan promoter spesifik umbi telah ditransformasikan ke tanaman kentang melalui mediasi vektor *A. tumefaciens* (Börnke et al. 2002). Umbi kentang PRG yang mengandung gen *pall* dijadikan sebagai bioreaktor dari produksi palatinosa (Börnke et al. 2002). Gen *pall* juga berhasil diisolasi dari bakteri tanah *Klebsiella* sp. strain LX3 dan diklon, serta dikarakterisasi (Zhang dan Zhang 2002). Gen tersebut mengkode sintesis isomaltulose, dengan merubah sukrosa menjadi isomaltulose, trehalulose, dan sejumlah glukosa dan fruktosa (Zhang dan Zhang 2002).

Gen *sucrose isomerase* (*si*) diisolasi dari bakteri *Pantoea dispersa* UQ68J dan diklon dan dikarakterisasi oleh Wu dan Birch (2005). Gen *si* mengkode enzim *sucrose isomerase* dan merubah sukrosa menjadi *isomaltulose* (Wu dan Birch 2005). Gen *si* juga diperoleh dari *Klebsiella planticola* UQ14S dan *E. rhapontici* WAC2928 (Wu dan Birch 2005). Gen *si* tersebut diklon dan diekspresikan di *E. coli*. Gen *si* dan *nptII* ditransformasikan ke kalus tanaman tebu varietas Q117, melalui metode penembakan partikel (Bower dan Birch 1992, Bower et al. 1996). Tebu PRG tersebut telah mendapatkan izin GMAC (*Genetic Modification Advisory Committee*) pemerintah Australia untuk ditanam di LUT (AG 2005). Tebu PRG dengan gen *si* mengandung sukrosa dua kali lebih besar dibandingkan dengan tebu non PRG (Wu dan Birch 2007).

Tanaman Tanpa Biji (Partenokarpi)

Kegiatan penelitian perakitan tanaman PRG tanpa biji (partenokarpi) dilakukan oleh Rotino et al. (1997) pada tanaman tembakau dan terong. Gen yang digunakan adalah *DefH9-iaaM*. Gen *iaaM* berasal dari *P. syringae* pv. *savastanoi*, sedangkan gen *DefH9* berasal dari *A. majus*. Penelitian perakitan tanaman PRG tanpa biji juga berhasil dilakukan pada berbagai tanaman lain seperti tomat, *strawberry*, dan *raspberry*. Uraian secara lengkap dibahas dalam Bab III tentang status penelitian tanaman PRG di Indonesia.

Kandungan Amilosa Rendah

Kegiatan perakitan tanaman PRG untuk menurunkan kandungan amilosa telah dilakukan pada gandum, kentang, ubi jalar, dan ubi kayu. Hampir semua perakitan tanaman PRG yang mengandung amilosa rendah menggunakan gen *granule-bound starch synthase* (GBSS). GBSS bertanggung jawab dalam sintesis komponen amilosa dalam pati dan juga dapat berkontribusi dalam sintesis amilopektin. Seperti halnya dengan kegiatan perakitan tanaman PRG tanpa biji, tanaman PRG dengan kandungan amilosa rendah juga dijelaskan secara lengkap dalam bab III tentang status penelitian tanaman PRG di Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- Abe, K., Y. Emori, H. Kondo, K. Suzuki, and S. Arai. 1987.** Molecular cloning of a cysteine protease inhibitor of rice (*Oryzacystatin*). *J. Biol. Chem.* 262:16793-97.
- Adiwilaga, K. 1998.** Permohonan pengkajian keamanan hayati tanaman transgenik (jagung Bt, jagung RR, kapas Bt, kapas RR, dan kedelai RR) produk PT. Monagro Indonesia. Presentasi dalam sidang Tim Teknis Keamanan Hayati Kelompok Tanaman Maret 1998.
- AgBios. 2001a.** Transgenic tomato Flavr Savr. Agbios GM Data Base. Last modified on Friday, August 12, 2001. Available at <http://www.agbios.com/dbase.php?action=ShowProd&data=FLAVR%20SAVR>.
- AgBios. 2001b.** *Dianthus caryophyllus* (Carnation) (4, 11, 15, 16). AgBios GM Database. Last modified on Monday, September 03, 2001. Available at <http://www.agbios.com/dbase.php?action=ShowProd&data=4%2C+11%2C+15%2C+16>.
- AgBios. 2001c.** *Dianthus caryophyllus* (Carnation) (959A, 988A, 1226A, 1351A, 1363A, 1400A). AgBios GM Database. Last modified on Wednesday, September 05, 2001. Available at <http://www.agbios.com/dbase.php?action=ShowProd&data=959A%2C+988A%2C+1226A%2C+1351A%2C+1363A%2C+1400A>.
- AgBios. 2001d.** High oleic soybean (G94-1, G94-19, G168). AgBios GM Database. Last modified on Thursday, December 20, 2001. Available at <http://www.agbios.com/dbase.php?action=Submit&hstlDXCode=8&trCode=OLEIC>
- AgBios. 2005.** High laurate canola (23-18-17, 23-198). AgBios GM Database. Last modified on Tuesday, August 30, 2005. Available at <http://www.agbios.com/dbase.php?action=Submit&gType=FA&AbbrCode=TE>.
- AgBios. 2007.** Plum pox virus (PPV) resistance *Prunus domestica* [ARS-PLMC5-6 (C5)]. AgBios GM Database. Last modified on Friday, November 09, 2007. Available at <http://www.agbios.com/dbase.php?action=Submit&evidx=529>.
- Aguiba, M.M. 2006.** Iran releases world's first Bt rice. Agrifood Awareness Australia (AFAA). http://www.afa.com.au/news/n_news-1698.asp.
- Al-Abed, D., P. Madasamy, R. Talla, S. Goldman, and S. Rudrabhatla. 2007.** Genetic engineering of maize with the Arabidopsis DREB1A/CBF3 gene using split-seed explants. *Crop Sci* 47:2390-2402.
- Al-Babili, S., X. Ye, P. Lucca, I. Potrykus, and P. Beyer. 2001.** Biosynthesis of beta-carotene (provitamin A) in rice endosperm achieved by genetic engineering. *Novartis Found Symp* 236:219-232.
- Altenbach, S.B., K.W. Pearson, G.G. Meeker, L.C. Staraci, and S.M. Sun. 1989.** Enhancement of the methionine content of seed proteins by the expression of a chimeric gene encoding a methionine-rich protein in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* 13:513-522.
- Arce, P., M. Moreno, M. Gutierrez, M. Gebauer, P. Dell'Orto, H. Torres, I. Acuna, P. Oliger, A. Venegas, X. Jordana, J. Kalazich, and L. Holuigue. 1999.** Enhanced resistance to bacterial infection by *Erwinia carotovora* subsp *atroseptica* in transgenic potato plants expressing the attacin or the cecropin SB-37 genes. *Amer. J. Potato Res.* 76:169-177.
- Atkinson, H.J., P.E. Urwin, and M.J. McPherson. 2003.** Engineering plants for nematode resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41:615-39.

- Atkinson, H.J. 1993.** Opportunities for improved control of plant parasitic nematodes via plant biotechnology. *In* Beadle, D.J., D.H.L. Bishop, L.G. Copping, G.K. Dixon, and D.W. Holloman (Eds.). Opportunities for Molecular Biology in Crop Production. Bracknell, UK: Br. Crop Prot. Council. p. 257-66.
- Australian Government (AG). 2005.** Field trials to evaluate genetically modified sugarcane lines expressing sucrose isomerase by the University of Queensland. Department of Health and Ageing. Office of the Gene Technology Regulator. DIR 051/2004. Risk Assessment and Risk Management Plan. Application for licence for dealings involving an intentional release into the environment.
- Barinaga, M. 1997.** Making plants aluminum tolerant. *Science* 276:1497.
- Barry, G. 2008.** Up date on golden rice. *Media workshop* Manfaat Bioteknologi dalam Mengatasi Krisis Pangan. IndoBIC, CropLife, dan PBPI. Jakarta, 28 Agustus 2008.
- Barton, K.A., H.R. Whiteley, and N.S. Yang. 1987.** *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to Lepidopteran insects. *Plant Physiol.* 85:1103-1109.
- Beachy, R.N. 1990.** Plant transformation to confer resistance against virus infection. *In* Gustafson, J.P. (Ed.). Gene Manipulation In Plant Improvement. Plenum Press, New York. p. 305-311.
- BBC News (BBCN). 2008.** Purple tomato 'may boost health'. BBC News 26 October 2008. Available at <http://news.bbc.co.uk/2/hi/health/7688310.stm>.
- Beffa, R.S., R.-M. Hofer, M. Thomas, and F. Meins Jr. 1996.** Decreased susceptibility to viral disease of β -1,3-glucanase-deficient plants generated by antisense transformation. *Plant Cell* 8:1001-1011.
- Benedict, J. and D.W. Altman. 2001.** Commercialization of transgenic cotton expressing insecticidal crystal protein. *In* Jenkins, J. and S. Saha (Eds.). Genetic Improvement of Cotton: Emerging Technologies. Science Publications, Enfield. New Hampshire, USA. 8:137-201.
- Bennet, J. 1993.** Genes for crop improvements. *Genetic Engineering* 16:93-113.
- Bent, A.F., B.N. Kunkel, D. Dahlbeck, K.L. Brown, R. Schmidt, J. Giraudat, J. Leung, and B.J. Staskawicz. 1994.** RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: A leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science* 265:1856-1860.
- Bevins, C.L. and M. Zasloff. 1990.** Peptides from frog skin. *Annu. Rev. Biochem.* 59:395-414.
- Beyer, P., S. Al-Babili, X. Ye, P. Lucca, P. Schaub, R. Welsch, and I. Potrykus. 2002.** Golden Rice: Introducing the beta-carotene biosynthesis pathway into rice endosperm by genetic engineering to defeat vitamin A deficiency. *J. Nutr.* 132:506S-510.
- Bieri, S., I. Potrykus, and J. Fütterer. 2000.** Expression of active barley seed ribosome-inactivating protein in transgenic wheat. *Theor. Appl. Genet.* 100:755-763.
- Binh, L.T., L.D. Nhan, L.Q. Lien, and D.T. Phong. 2002.** Progress report of the PRSV and DR papaya projects in Vietnam. Technical Coordination Meeting. Papaya Biotechnology Network of Southeast Asia. ISAAA. 7-9 October, 2002. Port Dickson, Malaysia.
- Börnke, F., M. Hajirezaei, and U. Sonnewald. 2001.** Cloning and characterization of the gene cluster for palatinose metabolism from the phytopathogenic bacterium *Erwinia rhapontici*. *J. Bacteriol.* 183(8):2425-2430.
- Börnke, F., M. Hajirezaei, and U. Sonnewald. 2002.** Potato tubers as bioreactors for palatinose production. *J. Biotechnol.* 96:119-124.

- Bower, R. and R.G. Birch, 1992.** Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. *Plant J.* 2:409-416.
- Bowler, C., L. Siooten, S. Van-der-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.
- Bower, R., A.R. Elliott, B.A.M. Potier, and R.G. Birch. 1996.** High-efficiency, microprojectile-mediated cotransformation of sugarcane, using visible or selectable markers. *Mol. Breed.* 2:239-249.
- Bradley, D., M.A. Harkey, M.K. Kim, K.D. Biever, and L.S. Bauer. 1995.** The insectidal *cryIB* crystal protein of *Bacillus thuringiensis* ssp. *thuringiensis* has dual specificity to Coleopteran and Lepidopteran larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 65:162-173.
- Brenner, C. 2004.** Telling transgenic technology tales: Lessons from the Agricultural Biotechnology Support Project (ABSP) experience. ISAAA Brief No. 31. ISAAA, Ithaca, NY.
- Broglie, R., K. Broglie, D. Roby, and I. Chet. 1991.** Production of transgenic plants with enhanced resistance to microbial pathogens. *In* Kung, S.D. and R. Wu (Eds.). *Engineering and Utilization. Transgenic Plants* 1:265-276.
- Broglie, K., R. Broglie, N. Benhamou, and I. Chet. 1993.** The role of cell wall degrading enzymes in fungal disease resistance. *In* Wu, R. (Ed.). *Biotechnology in plant disease control*. Willy-Liss, Inc. New York. p. 139-156.
- Burns, P., O. Kumdee, and S. Bandee. 2004.** Progress report of papaya delayed ripening project in Thailand 2004. ISAAA Papaya Biotechnology Network of Southeast Asia: Delayed Ripening Project Meeting Mines Beach Resort Hotel, Seri Kembangan, Selangor, Malaysia, 23-24 July 2004.
- Burrow, P.R., A.D.P. Barker, C.A. Newell, and W.D.O. Hamilton. 1998.** Plant-derived enzyme inhibitors and lectins for resistance against plant-parasitic nematodes in transgenic crops. *Pestic. Sci.* 52:176-83.
- Butelli, E., L. Titta, M. Giorgio, H.P. Mock, A. Matros, S. Peterek, E.G.W.M. Schijlen, R.D. Hall, A.G. Bovy, J. Luo, and C. Martin. 2008.** Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. *Nature Biotechnology*, Published online: 26 October 2008. doi:10.1038/nbt.1506.
- Capell, T. 2004.** Enhanced drought tolerance in rice. Information Systems for Biotechnology (ISB). ISB News Report. August 2004. <http://www.isb.vt.edu/news/2004/news04.Aug.html>.
- Catchot, A.L. 2001.** Bollgard II cotton efficacy summary-Midsouth. Proceeding of the Beltwide Cotton Conference 2:835.
- Chapman, K.D., S.A. Brown, S.A. Sparace, A.J. Kinney, K.G. Ripp, I.L. Pirtle, and R.M. Pirtle. 2001.** Transgenic cotton plants with increased seed oleic acid content. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 7(8):941-947.
- Chen, R.G., L.Y. Zhang, J.H. Zhang, W. Zhang, X. Wang, B. Ouyang, H.X. Li, and Z.B. Ye. 2006.** Functional characterization of *Mi*, a root-knot nematode resistance gene from tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *J. Integrative Plant Biol.* 48(12):1458-1465.
- Chen, R., H. Li, L. Zhang, J. Zhang, J. Xiao, and Z. Ye. 2007.** *CaMi*, a root-knot nematode resistance gene from hot pepper (*Capsium annuum* L.) confers nematode resistance in tomato. *Plant Cell Rep.* 26(7):895-905.

- Cheng, J., M.G. Bolyard, R.C. Saxena, and M.B. Sticklen. 1992.** Production of insect resistant potato by genetic transformation with a δ -endotoxingene from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. Plant Sci. 1:83-91.
- Chowpongpan, S., N. Warin, A. Bhunchotch, R. Rodaree, N. Pironrit, and S. Attathom. 2003.** PRSV resistance and yield of transgenic papaya in the small scale field trial. Technical and Coordination Meeting for the Papaya Biotechnology Network of Southeast Asia. Bangkok, 15-16 December 2003. ISAAA.
- Comai, L., D. Faccioli, W.R. Hiatt, G. Thompson, R.E. Rose, and D.M. Stalker. 1985.** Expression in plants of *aroA* gene from *Salmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosate. Nature 317:741-744.
- Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO). 2005.** World's first blue rose. CSIRO Plant Industry Commercialisation Group Publication. Available at <http://www.csiro.au/files/files/p29z.pdf>.
- Crickmore, N., D.R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. van Rie, D. Lereclus, J. Baum, and D. Dean. 1998.** Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:807-813.
- Dai, X., Y. Xu, Q. Ma, W. Xu, T. Wang, Y. Xue, and K. Chong. 2007.** Overexpression of an R1R2R3 MYB gene, *OsMYB3R-2*, increases tolerance to freezing, drought, and salt stress in transgenic Arabidopsis. Plant Physiol. 143:1739-1751.
- Damayanti, D. 2005.** Introduksi gen *antisense* ACC oksidase untuk menunda kemasakan buah pepaya (*Carica papaya* L.) melalui penembakan partikel. Tesis Magister Sains. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Dasgupta, I., V.G. Malathi, and Mukherjee. 2003.** Genetic engineering for virus resistance. Curr. Sci. 8(3):341-354.
- Datta, K., Z. Koukoliková-Nicola, N. Baisakh, N. Oliva, and S.K. Datta. 2000.** *Agrobacterium*-mediated engineering for sheath blight resistance of indica rice cultivars from different ecosystems. Theor. Appl. Genet. 100:832-839.
- Datta, K., J. Tu, N. Oliva, I. Ona, R. Velazhahan, T.W. Mew, S. Muthukrishnan, and S.K. Datta. 2001.** Enhanced resistance to sheath blight by constitutive expression of infection-related rice chitinase in transgenic elite indica rice cultivars. Plant Sci. 160:405-414.
- 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. 88:6721-6725.
- DeGray, G., K. Rajasekaran, F. Smith, J. Sanford, and H. Daniell. 2001.** Expression of an antimicrobial peptide via the chloroplast genome to control phytopathogenic bacteria and fungi. Plant Physiol. 127:852-862.
- De la Fuente, J.M., V. Ramírez-Rodríguez V., J.L. Cabrera-Ponce, and L. Herrera-Estrella. 1997.** Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. Science 276:1566-1568.
- Delannay, X.B., J. Laveille, R.K. Proksch, R.L. Fuschs, S.R. Sims, J.T. Greenplat, 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*. Plant Sci. 1:83-91.

- Delhaize, E., D.M. Hebb, and P.R. Ryan. 2001.** Expression of a *Pseudomonas aeruginosa* citrate synthase gene in tobacco is not associated with either enhanced citrate accumulation or efflux. *Plant Physiol.* 125:2059-2067.
- 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/Technol.* 5:579-584.
- Deslandes, L., J. Olivier, F. Theulier, J. Hirsch, D.X. Feng, P. Bittner-Eddy, J. Beynon, and Y. Marco. 2002.** Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive RRS1-R gene, a member of a novel family of resistance genes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 99:2404-2409.
- Douches, D.S., W. Li, K. Zarka, J. Coombs, W. Pett, E. Grafius, and T. El-Nasr. 2002.** Development of *Bt-cry5* insect resistant potato lines Spunta-G2 and Spunta-G3. *Hortscience* 37(7):1103-1107.
- Eapen, S. and S.F. D'Souza. 2005.** Prospects of genetic engineering of plants for phytoremediation of toxic metals. *Biotechnol. Advances* 23(2):97-114.
- Environmental Protection Agency (EPA). 1995.** Pesiticide fact sheet: Plant pesticide *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* δ -endotoxin and its controlling sequences in potato. Issued May 5, 1995.
- Environmental Protection Agency (EPA). 1998.** Pesiticide fact sheet: *Bacillus thuringiensis* subspecies *tolworthi* *Cry9c* protein and the genetic material necessary for its production in corn. Issued May 1998.
- Estruch, J.J., G.W. Warren, M.A. Mullins, G.J. Nye, J.A. Craig, and M.G. Koziel. 1996.** Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:5389-5394.
- Ezaki, B., R.C. Gardner, Y. Ezaki, and H. Matsumoto. 2000.** Expression of aluminum-induced genes in transgenic *Arabidopsis* plants can ameliorate aluminum stress and/or oxidative stress. *Plant Physiol.* 122:657-666.
- Fagi, A.M. and M. Herman. 1998.** Current status of research on agricultural biotechnology in Indonesia. In Ives, C. and B. Bedford (Eds.). *Agricultural Biotechnology. International Development. Biotechnology in Agriculture Series* 21:35-48.
- Fermin, G., V. Inglessis, C. Garboza, S. Rangel, M. Dagert, and D. Gonsalves. 2004.** Engineered resistance against papaya ringspot virus in Venezuelan transgenic papayas. *Plant Disease* 88(5):516-522.
- Fitch, M.M., R.M. Manshardt, D. Gonsalves, J.L. Slightom, and J.C. Sanford. 1990.** Stable transformation of papaya via microprojectile bombardment. *Plant Cell Rep.* 9(4):189-194.
- Florack, D., S. Allefs, R. Bollen, D. Bosch, B. Visser, and W. Stiekema. 1995.** Expression of giant silkworm cecropin B genes in transgenic tobacco. *Transgenic Res.* 4:132-141.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2007.** Iran releases world's first Bt rice. *Agriculture News.* Available at <http://agriculturenews.net/index.aspx?Type=Briefnews&ID=1896>.
- Gassmann, W., M.E. Hinsch, and B.J. Staskawicz. 1999.** The *Arabidopsis* RPS4 bacterial-resistance gene is a member of the TIR-NBS-LRR family of disease resistance genes. *Plant J.* 20:265-277.

- Genetic Maize (GM). 2008.** Purple tomatoes. Genetic Maize-Navigating the maze of GMOs. Research Blogging October 26th, 2008. Available at <http://www.geneticmaize.com/2008/10/purple-tomatoes/>.
- Genetically Engineered Organisms-Public Issues Education Project (GEO-PIE). 2003a.** Why genetically engineer herbicide resistance? Genetically Engineered Organisms. Cornell Cooperative Extension. Department of Communication. Kennedy Hall. Cornell University, Ithaca, NY 14853. Available at <http://www.geo-pie.cornell.edu/traits/herbres.html>.
- Genetically Engineered Organisms-Public Issues Education Project (GEO-PIE). 2003b.** How does genetically engineered herbicide resistance work? Genetically Engineered Organisms. Cornell Cooperative Extension. Department of Communication. Kennedy Hall. Cornell University, Ithaca, NY 14853. Available <http://www.geo-pie.cornell.edu/traits/herbres.html>.
- Genetically Engineered Organisms-Public Issues Education Project (GEO-PIE). 2004a.** The rise and fall of GE tomatoes. Genetically Engineered Organisms. Cornell Cooperative Extension. Department of Communication. Kennedy Hall. Cornell University, Ithaca, NY 14853. Available at <http://www.geo-pie.cornell.edu/crops/tomato.html>.
- Genetically Engineered Organisms-Public Issues Education Project (GEO-PIE). 2004b.** Delayed fruit ripening. Genetically Engineered Organisms. Cornell Cooperative Extension. Department of Communication. Kennedy Hall. Cornell University, Ithaca, NY 14853. Available at <http://www.geo-pie.cornell.edu/traits/fruitrip.html>.
- Genetically Engineered Organisms-Public Issues Education Project (GEO-PIE). 2004c.** Altered oil content. Genetically Engineered Organisms. Cornell Cooperative Extension. Department of Communication. Kennedy Hall. Cornell University, Ithaca, NY 14853. Available at <http://www.geo-pie.cornell.edu/traits/altoil.html>.
- Gill, S.S., E.A. Cowles, and P.V. Pietrantonio. 1992.** The mode of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.* 37:615-636.
- Global Knowledge Center on Crop Biotechnology (GKCCB). 2003.** Monsanto receives clearance for GM cotton. *Crop Biotech Update*: January 10, 2003. ISAAA SEAsia-Center and CAB International.
- GMO Compass (GMOC). 2008.** Genetic engineering of cut flowers. *GMO Compass*. May 4, 2008. Available at http://www.gmo-compass.org/eng/news/stories/350.genetic_engineering_cut_flowers.html.
- Golden Rice Project (GRP). 2006.** The science behind golden rice. Available at http://www.goldenrice.org/Content2-How/how1_sci.html.
- 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.* 87:6311-6318.
- Gonsalves, D. 2004.** Transgenic papaya in Hawaii and beyond. *AgBioForum* 7(1-2):36-40.
- Grant, M.R., L. Godiard, E. Straube, T. Ashfield, J. Lewald, A. Sattler, R.W. Innes, and J.L. Dangl. 1995.** Structure of the Arabidopsis RPM1 gene enabling dual specificity of disease resistance. *Science* 269:843-846.
- Greenberg, B.M. and B.R. Glick. 1993.** The use of recombinant DNA technology to produce genetically modified plants. In Gierson, D. (Ed.). *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*. CRC Press, Inc. New York. p. 1-10.

- Grierson, D., A. Slaten, J. Spiers, and G.A. Tucker. 1985.** The appearance of polygalacturonase mRNA in tomatoes: One of a series of changes in gene ex-pression during development and ripening. *Planta* 163:263-269.
- Grover, A. and R. Gowthaman. 2003.** Strategies for development of fungus-resistant transgenic plants. *Curr. Sci.* 84(3):330-340.
- Habibuddin, H., V. Pillai, U.K. AbuBakar, C.S. Tan, C.A. Ong, Y.K. Chan, and M.D. Hassan. 2005.** Progress on the screening of transgenic eksotika papaya for resistance against the papaya ringspot virus in Malaysia. Papaya Biotech Network of SEAsia Coordination Meeting, Genting Highland, Malaysia. November 20, 2005.
- Habibuddin, H., U.K. AbuBakar, C.S. Tan, C.A. Ong, V. Pillai, and A. NoorSuhana. 2007.** Evaluation of the transgenic eksotika papaya lines for resistance against the papaya ringspot virus in Malaysia. Papaya Biotechnology Network of SEAsia Coordination Meeting, Manila, Philippines. June 14-15, 2007.
- Health Canada (HC). 1999.** High lauric acid canola lines 23-198, 23-18-17. HC. Food and Nutrition. Novel Food Information-Food Biotechnology. FD/OFB-096-100-A. October 1999. Available at http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/gmf-agm/appro/ofb-096-100-a_e.html
- Health Canada (HC). 2000.** High oleic soybean lines G94-1, G94-19, and G168. HC. Food and Nutrition. Novel Food Information-Food Biotechnology. October 2000. Available at http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/gmf-agm/appro/oleic_soybean-soja_oleique_e.html.
- Held, G.A., L.A. Bulla, E. Ferrari Jr., J. Hoch, and A.I. Aronson. 1982.** Cloning and localization of the lepidopteran protoxin gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79:6065.
- Hemmenway, C., R.X. Fang, W.K. Kaniewksi, N.K. Chua, and N.E. Turner. 1987.** Analysis of the mechanism of protection in transgenic plants expressing the potato virus x coat protein or its antisense RNA. *EMBO J.* 7:1273-1281.
- Hepher, A. and H.J. Atkinson. 1992.** Nematode control with protease inhibitors. *Eur. Patent No.* 0 502-730 A1.
- Herman, M. 1996.** Rekayasa genetik untuk perbaikan tanaman. *Buletin AgroBio* 1(1):24-34.
- Herman, M. 1997.** Insect resistant plants via genetic engineering. *In* Darussamin, A., I.P. Kompiang, and S. Moeljopawiro (*Eds.*). *The Proceeding of Second Conference on Agricultural Biotechnology.* Jakarta, June 13-15, 1995. II:217-225.
- Herman, M., K. Kusumanegara, dan D. Damayanti. 2004.** Perakitan dan bioasai tanaman transgenik tahan serangga hama. Balai Besar Litbang dan Sumberdaya Genetik Pertanian. Badan Litbang Pertanian. 40 hlm.
- Heuer, H., R.M. Kroppenstedt, J. Lottmann, G. Berg, and K. Smalla. 2002.** Effects of T4 lysozyme release from transgenic potato roots on bacterialrhizosphere relative to communities are negligible natural factors. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1325-1335.
- Heuer, H. and K. Smalla. 1999.** Bacterial phyllosphere communities of *Solanum tuberosum* L. and T4-lysozyme-producing transgenic variants. *FEMS Microbiol. Ecology* 28:357-371.
- Hill, K.K., N. Jarvis-Eagan, E.L. Halk, K.J. Krahn, L.W. Liauro, R.S. Mathewson, D.J. Merio, S.E. Nelson, K.E. Rashka, and L.S. Loesch-Fries. 1991.** The development of virus resistant alfalfa, *Medicago sativa* L. *Bio/Technol.* 9:373-379.

- Hily, J.-M., R. Scorza, T. Malinowski, B. Zawadzka, and M. Ravelonandro. 2004.** Stability of gene silencing-based resistance to Plum pox virus in transgenic plum (*Prunus domestica* L.) under field conditions. *Transgenic Res.* 13(5):427.
- Hirschmann, H. 1985.** The genus *Meloidogyne* and morphological characters differentiating its species. *in* Sasser, J.N. and C.C. Carter (Eds). *An Advance Treatise on Meloidogyne*. Biology and Control 1:73-93.
- Hinchee, M.A.U., S.R. Padgett, G.M. Kishore, X. Delannay, and R.T. Fraley. 1993.** Herbicide tolerant crops. *In* Kung, S.D. and R. Wu (Eds.). *Engineering and Utilization*. *Transgenic Plants* 1:243-263.
- Hoffman, M.P., F.G. Zalom, L.T. Wilson, J.M. Smilananick, L.D. Malyj, J. Kiser, V.A. Hider, and W.M. Barnes. 1992.** Field evaluation of transgenic tobacco containing a *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein gene. *J. Economic Entomol.* 85(5):1651-1659.
- Holliday, P. 1989.** A dictionary of plant pathology. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Hsieh, T.H., J.T. Lee, Y.Y. Charng, and M.T. Chan. 2002.** Tomato plants ectopically expressing Arabidopsis CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress. *Plant Physiology Preview*.
- Huang, G., R. Allen, E.L. Davis, T.J. Baum, and R.S. Hussey. 2006.** Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. *PNAS* 103(39):14302-14306.
- Huang, Y., R.O. Nordeen, L. Di, L.D. Owens, and J.H. McBeath. 1997.** Expression of an engineered cecropin gene cassette in transgenic tobacco plants confers disease resistance to *Pseudomonas syringae* pv. tabaci. *Phytopathology* 87:494-499.
- Huang, W., X. Cui, Y. Tian, M. Lin, and X. Peng. 1994.** Cloning of T7 lysozyme gene and construction of the vector for transgenic plants resistant to bacterial infection. *Wei Sheng Wu Hsueh Pao* 34:261-265.
- Hung, N.M., C.H. Ha, B.C. Lang, and L.T. Binh. 2007.** Progress report of the papaya project in Vietnam. *Papaya Biotechnology Network of SEAsia Coordination Meeting*, Manila, Philippines. June 14-15, 2007.
- Iannaccone, R., A. Perito, G. Taddonio, V. Viggiano, F. Cellini, and P. Vera. 2004.** Transgenic tomato overexpressing the homeobox gene H52. *Proceedings of the XLVIII Italian Society of Agricultural Genetics-SIFV-SIGA Joint Meeting Lecce, Italy, 15-18 September 2004*.
- Iglesias, V.A. and F. Meins, Jr. 2000.** Movement of plant viruses is delayed in a b-1,3-glucanase-deficient mutant showing a reduced plasmodesmatal size exclusion limit and enhanced callose deposition. *Plant J.* 21:157-166.
- Information Systems for Biotechnology (ISB). 1997.** Crops engineered to tolerate Aluminum toxicity. *Information Systems for Biotechnology News Report*. July 1997. <http://www.isb.vt.edu/news/1997/news97.Jul.html>
- Ishimoto, M., J. Sato, M.J. Chrispeels, and K. Kitamura. 1996.** Bruchids resistance of transgenic azuki bean expressing seed α -amylase inhibitor in the common bean. *Entomol. Exper. Appl.* 79:309-315.
- Jach, G., B. G rnhardt, J. Mundy, J. Logemann, E. Pinsdorf, R. Leah, J. Schell, and C. Mass. 1995.** Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *Plant J.* 8:97-109.

- James, C. 2002.** Global review of commercialized transgenic crops: 2001. Feature: Bt Cotton. ISAAA Brief No. 26. ISAAA, Ithaca, NY.
- James, C. 2003.** Global review of commercialized transgenic crops: 2002. Feature: Bt Corn. ISAAA Brief No. 29. ISAAA, Ithaca, NY.
- James, C. 2005.** Global review of commercialized Biotech/GM crops: 2005. ISAAA Brief No. 34. ISAAA, Ithaca, NY.
- James, C. 2006.** Global review of commercialized Biotech/GM crops: 2006. ISAAA Brief No. 35. ISAAA, Ithaca, NY.
- James, C. 2007.** Global review of commercialized Biotech/GM crops: 2007. ISAAA Brief No. 37. ISAAA, Ithaca, NY.
- Jaynes, J.M., P. Nagpala, L. Destefano Beltran, J.H. Huang, J. Kim, T. Denny, and S. Cetiner. 1993.** Expression of a cecropin b lytic peptide analog in transgenic tobacco confers enhanced resistance to bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Sci.* 89:43-53.
- Jiban, M. 2001.** Genetics and genetic improvement of drought resistance in crop plants. *Curr. Sci.* 80(6):758-763.
- John Innes Centre (JIC). 2008.** Purple tomatoes may keep cancer at bay. JIC Press October 2008. Available at <http://www.jic.ac.uk/corporate/media-and-public/current-releases/081026martin.htm>
- 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.* 86:9871-9875.
- Jongedijk, E., H. Tigelaar, J.S.C. Van Roekel, S.A. Bres-Vloemans, I. Dekker, P.J.M. Van den Elzen, B.J.C. Cornelissen, and L.S. Melchers. 1995.** Synergistic activity of chitinases and 1,3-glucanases enhances fungal resistance in transgenic tomato plants. *Euphytica* 85:173-180.
- 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/Technol.* 8:750-754.
- Kaniewski, W., V. Ilardi, L. Tomassoli, T. Mitsky, J. Layton, and M. Barba. 1999.** Extreme resistance to cucumber mosaic virus (CMV) in transgenic tomato expressing one or two viral coat proteins. *Mol. Breed.* 5:111-119.
- Kansas State University (KSU). 2008.** Herbicide-resistant grain sorghum trait developed at Kansas State University. Research and Extension News. September 04, 2008. Available at <http://www.oznet.ksu.edu/news/story/briefs090408.aspx>.
- Karim, S., H. Aronsson, H. Ericson, M. Pirhonen, B. Leyman, B. Welin, E. Mäntylä, E.T. Palva, P. Van Dijck, and K.O. Holmström. 2007.** Improved drought tolerance without undesired side effects in transgenic plants producing trehalose. *Plant Mol. Biol.* 64(4):371-386.
- Kasuga, M., S. Miura, K. Shinozaki, and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2004.** A Combination of the *Arabidopsis* DREB1A gene and stress-inducible *rd29A* promoter improved drought-and low-temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. *Plant Cell Physiol.* 45(3):346-350.
- Kasukabe, K., L. He, K. Nada, S. Misawa, I. Ihara, and S. Tachibana. 2004.** Overexpression of spermidine synthase enhances tolerance to multiple environmental stresses and up-regulates the expression of various stress-regulated genes in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 45(6):712-722.

- Katsumoto, Y., M.F. Mizutani, Y. Fukui, F. Brugliera, T.A. Holton, M. Karan, N. Nakamura, K.Y. Sakakibara, J. Togami, A. Pigeaire, G.Q. Tao, N.S. Nehra, C.Y. Lu, B.K. Dyson, S. Tsuda, T. Ashikari, T. Kusumi, J.G. Mason, and Y. Tanaka. 2007. Engineering of the rose flavonoid biosynthetic pathway successfully generated blue-hued flowers accumulating delphinidin. *Plant Cell Physiol.* 48(11):1589-1600.
- Kauffmann, S., M. Legrand, P. Geoffroy, and B. Fritig. 1987. Biological function of 'pathogenesis-related' proteins: Four PR proteins of tobacco have 1,3- β -glucanase activity. *EMBO J.* 6:3209-3212.
- Kim, J.-K., X. Duan, R. Wu, S.J. Seok, R.S. Boston, I.-C. Jang, M.-Y. Eun, and B.H. Nahm. 1999. Molecular and genetic analysis of transgenic rice plants expressing the maize ribosome-inactivating protein b-32 gene and the herbicide resistance *bar* gene. *Mol. Breed.* 5:85-94.
- Knowles, B.H., A. Julian, and T. Dow. 1993. The crystal δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: Models for their mechanism of action on the insect gut. *BioEssay* 15(7):469-476.
- Kramer, M., R.E. Sheehy, and W.R. Hiatt. 1989. Progress towards the genetic engineering of tomato fruit softening. *Trends Biotechnol.* 7:191-195.
- Krattiger, A.F. 1997. Insect resistance in crops: A case study of *Bacillus thuringiensis* (Bt) and its transfer to developing countries. ISAAA Brief No.2. ISAAA, Ithaca, NY.
- Kumar, A. and S.C. Minocha. 1998. Transgenic manipulation of polyamine metabolism. In Lindsey, K. (Ed.). *Transgenic Research in Plants*. Harwood Academic Publishers UK. p. 187-199.
- Kurtz, R.W., A. McCaffery, and D. O'Reilly. 2007. Insect resistance management for Syngenta's VipCot™ transgenic cotton. *J. Invertebrate Pathol.* 95(3):227-230.
- Lawson, E.C., J.D. Weiss, P.E. Thomas, and W.K. Kaniewski. 2001. NewLeaf Plus Russet Burbank potatoes: Replicase-mediated resistance to potato leafroll virus. *Mol. Breed.* 7(1):1-12.
- Leah, R., H. Tommerup, I. Svendsen, and J. Mundy. 1991. Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties. *J. Biol. Chem.* 266:1464-1573.
- Lee, M.K., F.S. Walters, H. Hart, N. Palekar, and J.S. Chen. 2003. The Mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of *cry1Ab* δ -endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(8):4648-4657.
- Lee, D.E., I.J. Lee, O. Han, M.G. Baik, S.S. Han, and K. Back. 2004. Pathogen resistance of transgenic rice plants expressing mitogen-activated protein kinase 1, MK1, from *Capsicum annuum*. *Mol. Cells.* 17(1):81-5.
- Lee, Y.H., I.S. Yoon, S.C. Suh, and H.I. Kim. 2002. Enhanced resistance in transgenic cabbage and tobacco expressing a glucose oxidase gene from *Aspergillus niger*. *Plant Cell Rep.* 20:857-863.
- Legrand, M., S. Kauffmann, P. Geoffroy, and B. Fritig. 1987. Biological function of pathogenesis-related proteins: four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:6750-6754.
- Li, Q.S., C.B. Lawrence, H.Y. Xing, R.A. Babbitt, W.T. Bass, I.B. Maiti, and N.P. Everett. 2001. Enhanced disease resistance conferred by expression of an antimicrobial magainin analog in transgenic tobacco. *Planta* 212:635-639.
- Lines, R.E., D. Persley, J.L. Dale, R. Drew, and M.F. Bateson. 2002. Genetically engineered immunity to papaya ringspot virus in Australian papaya cultivars. *Mol. Breed.* 10(3):119-129.

- Linke, C., U. Conrath, W. Jeblick, T. Betsche, A. Mahn, K. Düring, and H.E. Neuhaus. 2002.** Inhibition of the plastidic ATP/ADP transporter protein primes potato tubers for augmented elicitation of defense responses and enhances their resistance against *Erwinia carotovora*. *Plant Physiol.* 129:1607-1615.
- Liu, Q., S.P. Singh, and A.G. Green. 2002.** High-stearic and high-oleic cottonseed oils produced by hairpin RNA-mediated post-transcriptional gene silencing. *Plant Physiol.* 129:1732-1743.
- Lius, S., R.M. Manshardt, M.M.M. Fitch, J.C. Slightom, and D. Gonsalves. 1997.** Pathogen-derived resistance provides papaya with effective protection against papaya ringspot virus. *Mol. Breed.* 3:161-168.
- Logemann, J., G. Jach, H. Tommerup, J. Mundy, and J. Schell. 1992.** Expression of a barley ribosome-inactivating protein leads to increased fungal protection in transgenic tobacco plants. *Bio/ Technol.* 10:305-308.
- Lorenz, G., D. Johnson, J. Hopkins, J. Reaper, A.L. Fisher, and C. Norton. 2001.** Bollgard II performance in Arkansas. *Proceeding of the Beltwide Cotton Conference.* Memphis, TN. USA. National Cotton Council 2:1116-1117.
- Lottmann, J. and G. Berg. 2001.** Phenotypic and genotypic characterization of antagonistic bacteria associated with roots of transgenic and non-transgenic potato plants. *Microbiol. Res.* 156:75-82.
- Lottmann, J., H. Heuer, K. Smalla, and G. Berg, 1999.** Influence of transgenic T4-lysozyme-producing potato plants on potentially beneficial plant-associated bacteria. *FEMS Microbiol. Ecology* 29:365-377.
- Lottmann, J., H. Heuer, J. de Vries, A. Mahn, K. Düring, W. Wackernagel, K. Smalla, and G. Berg. 2000.** Establishment of introduced antagonistic bacteria in the rhizosphere of transgenic potatoes and their effect on the bacterial community. *FEMS Microbiol. Ecology* 33:41-49.
- Lusso, M. and J. Kuc. 1996.** The effect of sense and antisense expression of the *PR-N* gene for b-1,3-glucanase on disease resistance of tobacco to fungi and viruses. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 49:267-283.
- MacIntosh, S.C., T.B. Stone, S.R. Sims, P. Hunst, J.T. Greenplate, P.G. Marrone, F.J. Perlak, D.A. Fischhoff, and R.L. Fuchs. 1990.** Specificity and efficacy of purified *Bacillus thuringiensis* proteins against agronomically important species. *J. Insects Path.* 56:95-105.
- Maddaloni, M., F. Forlani, V. Balmas, G. Donini, L. Stasse, L. Corazza, and M. Motto. 1997.** Tolerance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani* AG4 of transgenic tobacco expressing the maize ribosome-inactivating protein b-32. *Transgenic Res.* 6:393-402.
- Magdalita, P.M., A.C. Laurena, B.M. Yabut-Perez, V.N. Villegas, E.M.T. Mendoza, and J.R. Botella. 2001.** Progress in the development of transgenic papaya: Transformation of Solo papaya using ACC synthase antisense construct. *Acta Hort.* 575:171-176.
- Magdalita, P.M., A.C. Laurena, B.M. Yabut-Perez, M.M. Zaporteza, E.M.T. Mendoza, V.N. Villegas and J.R. Botella. 2003.** Towards transformation, regeneration and screening of papaya containing antisense ACC synthase gene. *In Vasil, I.K. (Ed.). Plant Biotechnology 2002 and Beyond.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. p. 323-327.
- Magdalita, P.M., V.M. Aquino, L.M. Dolores, H.F. Galvez. 2004a.** *Agrobacterium*-mediated transformation of Philippines papaya for PRSV resistance. Terminal report-May 1999 to April 2004-submitted to the Philippine Council for Agriculture, Forestry and Natural Resources Research and Development (PCARRD).

- Magdalita, P.M., A.C. Laurena, M.M. Perez, and R.L. Comia. 2004b.** Development of transgenic papaya with delayed ripening characteristics containing the ACC oxidase gene via *Agrobacterium* mediated transformation. ISAAA Papaya Biotechnology Network of Southeast Asia: Delayed Ripening Project Meeting. Mines Beach Resort Hotel, Seri Kembangan, Selangor, Malaysia, 23-24 July 2004.
- Magdalita, P.M., L.M. Dolores, H.F. Galvez, F.C. Sta. Cruz, and D.M. Hautea. 2007.** The PRSV resistant papaya-project status and prospects. Papaya Biotechnology Network of SEAsia Coordination Meeting, Manila, Philippines. June 14-15, 2007.
- Manshardt, R.S. Ferreira, K.P. Gonsalves, P. Tennant, M. Fitch, and D. Gonsalves. 2003.** Development, commercial use and status of GM papaya in Hawaii. Technical and Coordination Meeting for the Papaya Biotechnology Network of Southeast Asia. Bangkok, 15-16 December 2003. ISAAA.
- Martin, G.B., S.H. Brommonschenkel, J. Chunwongse, A. Frary, M.W. Ganai, R. Spivey, T. Wu, E.D. Earle, and S.D. Tanksley. 1993.** Map-based cloning of a 66 protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* 262:1432-1436.
- Masoud, S.A., Q. Zhu, C. Lamb, and R.A. Dixon. 1996.** Constitutive expression of an inducible b-1,3-glucanase in alfalfa reduces disease severity caused by the oomycete pathogen *Phytophthora megasperma* f. sp. *medicaginis*, but does not reduce severity of chitin-containing fungi. *Transgenic Res.* 5:313-323.
- Mazur, B.J. and S.C. Falco. 1989.** The development of herbicide resistant crops. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40:441-456.
- McClintock, J.T., C.R. Schaffer, and R.D. Sjoblad. 1995.** A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. *Pesticides Sci.* 45:95-105.
- McGarvey, P.B. and J.M. Kaper. 1993.** Transgenic plants for conferring virus tolerance. In Kung, S.D. and R. Wu (Eds.). *Engineering and Utilization. Transgenic Plants* 1:277-295.
- McKersie, B.D., Y. Chen, M. de Beus, S.R. Bowley, C. Bowler, D. Inzé, K. D'Halluin, and J. Botterman. 1993.** Superoxide dismutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.* 103(4):1155-1163.
- McKersie, B.D., S.R. Bowley, and K.S. Jones. 1999.** Winter survival of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. *Plant Physiol.* 119: 839-848.
- Melchers, L.S. and Stuiver, M.H. 2000.** Novel genes for disease resistance breeding. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3:147-152.
- Mentag, R., M. Lukevich, M.J. Morency, and A. Seguin, 2003.** Bacterial disease resistance of transgenic hybrid poplar expressing the synthetic antimicrobial. *Tree Physiol.* 23:405-411.
- Meyer, P., I. Heidmann, G. Forkman, and H. Saedler. 1987.** A new petunia flower color gene-coded by transformation of a mutant with a maize gene. *Nature* 330:667-678.
- Mindrinis, M., F. Katagiri, G.-L. Yu, and F.M. Ausubel. 1994.** The *Arabidopsis thaliana* disease resistance gene RPS2 encodes a protein containing a nucleotide-binding site and leucine-rich repeats. *Cell* 78:1089-1099.
- Mourgues, F., M.N. Brisset, and E. Chevreau. 1998.** Strategies to improve plant resistance to bacterial diseases through genetic engineering. *TIBTECH* 16:203-210.

- Muda, P., P. Ravindranathan, C.Y. Kwok, U.K.A. Bakar, V. Pillai, L.P. Fatt, and H.M. Daud. 2003.** Contained field evaluation of delayed ripening transgenic eksotika papaya. Papaya Biotechnology Network of Southeast Asia Technical and Coordination Meeting Bangkok, Thailand, 15-16 December 2003.
- Naimov, S., M. Weemen-Hendriks, S. Dukiandjiev, and de R.A. Maagd. 2001.** *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin *cry1* hybrid proteins with increased activity against the Colorado potato beetle. Appl. Environ. Microbiol. 67:5328-5330.
- Naimov, S., S. Dukiandjiev, and R.A. de Maagd. 2003.** A hybrid *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin gives resistance against a coleopteran and a lepidopteran pest in transgenic potato. Plant Biotechnol. J. 1(1):51-57.
- News Agriculturist on Line (NAL). 2005.** The quest for drought tolerance. <http://www.new-ag.info/05-2/focuson/focuson5.html>
- Neupane, K.R., U.T. Mukatira, and J.I. Stiles. 1996.** Cloning of Fruit-specific ACC synthase and ACC oxidase cDNAs from papaya (*Carica papaya* L.) and their expression during fruit ripening. Nucleic Acid Database.
- Nishizawa, Y., Z. Nishio, K. Nakazono, M. Soma, E. Nakajima, M. Ugaki, and T. Hibi. 1999.** Enhanced resistance to blast (*Magnaporthe grisea*) in transgenic Japonica rice by constitutive expression of rice chitinase. Theor. Appl. Genet. 99:383-390.
- Norelli, J.L. 2000.** Use of Antimicrobial Proteins and Peptides in Transgenic Plants. http://www.riskasses.org/file_dir/Norelli%2010-9%201.pdf.
- Norelli, J.L., H.S. Aldwinckle, L. Destefano Beltran, and J.M. Jaynes. 1994.** Transgenic 'Malling 26' apple expressing the attacin E gene has increased resistance to *Erwinia amylovora*. Euphytica 77:123-128.
- Norman Jr., J.W. and A.N. Sparks Jr. 2001.** Performance of Bollgard II cotton against Lepidopterous pests in the lower Rio Grande Valley of Texas. Proceeding of the Beltwide Cotton Conference. Memphis, TN. USA. National.
- Oh, S.J, S.I. Song, Y.S. Kim, H.J. Jang, S.Y. Kim, M. Kim, Y.K. Kim, B.H. Nahm, and J.K. Kim. 2005.** Arabidopsis CBF3/DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth. Plant Physiol. 138:341-351.
- Oka, Y. and Y. Cohen. 2001.** Induced resistance to cyst and root-knot nematodes in cereals by DL-B-amino-*n*-butyric. Eur. J. Plant Pathol. 107:219-227.
- Osusky, M., G.Q. Zhou, L. Osuska, R.E. Hancock, W.W. Kay, and S. Misra. 2000.** Transgenic plants expressing cationic peptide chimeras exhibit broadspectrum resistance to phytopathogens. Nature Biotechnol. 18:1162-1166.
- Paine, J.A., C.A. Shipton, S. Chaggar, R.M. Howells, M.J. Kennedy, G. Vernon, S.Y. Wright, E. Hinchliffe, J.L. Adams, A.L. Silverstone, and R. Drake. 2005.** A new version of golden rice with increased pro-vitamin A content. Nature Biotechnol. 23:482-487.
- Pathak, M.D. and Z.R. Khan. 1994.** Insect pests of rice. International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines.
- Penn, S.R., B. Reich, J. Osborn, K. Embry, and J. Greenplate. 2001.** Quantification of Lepidopteran activity in a 2-gene product: A 2-year summary of Bollgard II. Proceedings of the Beltwide Cotton Conference. Memphis, TN. USA. National Cotton Council 2:830-832.

- 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.
- Perlak, F.J., T.B. Stone, Y.M. Muskopf, L.J. Petersen, G.B. Parker, S.A. McPherson, J. Wyman, S. Love, and G. Reed. 1993.** Genetically improved potatoes: Protection from damage by Colorado potato beetles. *Plant Mol. Biol.* 22:313-321.
- Perry, D. 2003.** Adventures in Hawaiian papayas: An on going tale of a villain, heroes, challenges and solutions. Technical and Coordination Meeting for the Papaya Biotechnology Network of Southeast Asia. Bangkok, 15-16 December 2003.
- Ponti, D., M.L. Mangoni, G. Mignogna, M. Simmaco, and D. Barra. 2003.** An amphibian anti-microbial peptide variant expressed in *Nicotiana tabacum* confers resistance to phytopathogens. *Biochemical J.* 370:121-127.
- 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.
- Powell, K.S., A.M.R. Gatehouse, V.A. Hilder, and J.A. Gatehouse. 1993.** Antimetabolic effects of plant lectins and plant fungal enzymes on the nymphal stages of two important rice pests, *Nilaparvata lugens* and *Nephotettix nigropictus*. *Entomol. Exp. Appl.* 66:119-126.
- Quemada, H. 1998.** The use of coat protein technology to develop virus resistant cucurbits. In Ives, C.L. and B. Bedford (Eds.). *Agricultural Biotechnology in International Development*. CABI Publishing. NY. USA. p. 147-160.
- Rahn, P.R., L. Ruschke, and Z.W. Shappley. 2001.** Efficacy and agronomic performance of Bollgard II. Proceedings of the Beltwide Cotton Conference. Memphis, TN. USA. National Cotton Council 2:832.
- Raj, S.K., R. Singh, S.K. Pandey, and B.P. Singh. 2005.** *Agrobacterium*-mediated tomato transformation and regeneration of transgenic lines expressing tomato leaf curl virus coat protein gene for resistance against TLCV infection. *Curr. Sci.* 88(10):1674-1679.
- Rajamohan, F. and D.H. Dean. 1995.** Molecular biology of *Bacillus thuringiensis*. The workshop on Bt-technology for agriculture. Plant Genetic Engineering Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Kasetsart University, Thailand.
- Rakesh, K., R.K. Shukla, S. Raha, V. Tripathi, and D. Chattopadhyay. 2006.** Expression of CAP2, an APETALA2-family transcription factor from chickpea, enhances growth and tolerance to dehydration and salt stress in transgenic tobacco. *Plant Physiol.* 142:113-123.
- Rao, K.V., K.S. Rathore, T.K. Hodges, X. Fu, E. Stoger, D. Sudhakar, S. Williams, P. Christou, M. Bharathi, D.P. Brown, K.S. Powell, J. Spence, A.M.R. Gatehouse, and J.A. Gatehouse. 1998.** Expression of snowdrop lectin (GNA) in transgenic rice plants confers resistance to rice brown planthopper. *Plant J.* 15(4):469-477.
- Ravelonandro, M., R. Scorza, A. Callahan, L. Levy, C. Jacquet, M. Monsion, and V. Damsteegt. 2000.** The use of transgenic fruit trees as a resistance strategy for virus epidemics: The plum pox (sharka) model. *Virus Research* 71(1-2):63.
- Riazuddin, S. 1994.** Plant genetic engineering and future agriculture. *Genetic Engineering* 16:93-113.
- Ridge, R.L., S.G. Turnipseed, and M.J. Sullivan. 2000.** Field comparison of genetically-modification cottons containing one strain (Bollgard) and two strain (Bollgard II) of *Bacillus thuringiensis kurstaki*.

- In* Dugger, P. and D. Richter (Eds.). Proceedings of the Beltwide Cotton Conference. Memphis, TN. USA. National.
- Robinson, E. 2006.** Second generation technology: What's advantage of next Bt cotton? Southwest FarmPress. http://southwestfarmpress.com/mag/farming_second_generation_technology_2/.
- Rodrigues, S.M., M.O. Andrade, A.P.S. Gomes, F.M. DaMatta, M.C. Baracat-Pereira, and E.P.B. Fontes. 2006.** *Arabidopsis* and tobacco plants ectopically expressing the soybean antiquitin-like *ALDH7* gene display enhanced tolerance to drought, salinity, and oxidative stress. J. Exp. Botany 57(9):1909-1918.
- Rohini, V.K. and Rao, K.S. 2001.** Transformation of peanut (*Arachis hypogaea* L.) with tobacco chitinase gene: variable response of transformants to leaf spot disease. Plant Sci. 160:889-898.
- Romyanon, K., P. Kasemsin, and S. Attathom. 2005.** Thailand screening for PRSV resistance and transgene analysis of transgenic papaya from *Agrobacterium*-mediated transformation. Technical Coordination Meeting. Papaya Biotechnology Network of Southeast Asia. ISAAA. 20-21 November, 2005. Genting Highlands, Kuala Lumpur, Malaysia.
- Rotino, G.L., E. Perri, M. Zottini, H. Sommer, and A. Spena. 1997.** Genetic engineering of parthenocarpic plants. Nature Biotechnol. 15:1398-1401.
- Rotino, G.L., N. Acciarri, E. Sabatini, G. Mennella, R.L. Scalzo, A. Maestrelli, B. Molesini, T. Pandolfini, J. Scalzo, B. Mezzetti, and A. Spena. 2005.** Open field trial of genetically modified parthenocarpic tomato: seedlessness and fruit quality. BMC Biotechnol. 5:32.
- Ryan, C.A. 1990.** *Proteinase inhibitors* in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens. Ann. Rev. Phytopathol. 28:425-449.
- Sági, L. 2004.** Engineering resistance to pathogenic bacteria. http://www.promusa.org/research/genetic_transfo_strategies_bacteria.pdf
- Salmeron, J.M., G.E.D. Oldroyd, C.M.T. Rommens, S.R. Scofield, H.S. Kim, D.T. Lavelle, D. Dahlbeck, and B.J. Staskawicz. 1996.** Tomato Prf is a member of the leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes and lies embedded with the Pto kinase gene cluster. Cell 86:123-133.
- Sasser, J.N. and D.W. Freckman. 1987.** A world perspective on nematology: the role of the society. *In* Veech, J.A. and D.W. Dickerson (Eds.). Vistas on Nematology. Marceline, MO: Soc. Nematol. p. 7-14.
- Sasser, J.N., J.D. Eisenback, and C.C. Carter. 1983.** The International Meloidogyne Project-its goals and accomplishment. Ann. Rev. Phytopathol. 21:271-288.
- Schaub, P., S. Al-Babili, R. Drake, and P.R. Beyer. 2005.** Why is golden rice golden (yellow) instead of red?. Plant Physiol. 138:441-450.
- Schlumbaum, M.F. Mauch, U. Vogeli, and T. Boller. 1986.** Plant chitinase are potent inhibitors of fungal growth. Nature 324:365-367.
- Schroeder, H.E., S. Gollasch, A. Moore, L.M. Tabe, S. Craig, D. Hardie, M.J. Chrispeels, D. Spencer, and T.J.V. Higgins. 1995.** Bean α -amylase inhibitor confers resistance to the pea weevil, *Bruchus pisorum*, in genetically engineered peas (*Pisum sativum* L.). Plant Physiol. 107:1233-1239.
- Schuch, W., C.R. Bird, J. Ray, C.J. Smith, C.F. Watson, P.C. Morris, J.E. Gray, C. Arnold, G.B. Seymour, G.A. Tucker, and D. Grierson. 1989.** Control and manipulation of gene expression during tomato fruit ripening. Plant Mol. Biol. 13:303-309.

- Scientific Blogging (SB). 2008.** Anthocyanins may mean outrageously healthy purple tomatoes. Science. October 26th, 2008. Available at http://www.scientificblogging.com/news_releases/anthocyanins_may_mean_outrageously_healthy_purple_tomatoes.
- Seed Quest (SQ). 2005.** Australian and Japanese researchers apply RNAi technology for gene replacement in plants, develop world's only blue rose. Seed Quest News Section March 29, 2005. Available at <http://www.seedquest.com/News/releases/2005/march/11830.htm>
- Serrano, C., P. Arce-Johnson, H. Torres, M. Gebauer, M. Gutierrez, M. Moreno, X. Jordana, A. Venegas, J. Kalazich, and L. Holuigue. 2000.** Expression of the chicken lysozyme gene in potato enhances resistance to infection by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. Amer. J. Potato Res. 77:191-199.
- Shadduck, J.A. 1983.** Some observations on the safety evaluation of nonviral microbial pesticides. Bull. WHO 61:117-128.
- Shade, R.E., H.E. Schroeder, H.E. Pueyo, L.M. Tabe, L.L. Murdock, T.J.V. Higgins, and M.J. Chrispeels. 1994.** Transgenic pea seeds expressing the α -amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchid beetles. Bio/Technol. 12:793-796.
- Shane, O. and G. Galli. 1992.** Increased lysine synthesis in tobacco plants that express high of bacterial dihydrodipicolinate synthase in their chloroplasts. Plant J. 2:203-209.
- Sharma, K.K. 2006.** Development and evaluation of transgenic chickpea for tolerance to drought and low temperature stress by using P5CSF gene and drought responsive regulatory elements. ICRIAT Program report 2004-2005. http://iscb.epfl.ch/reports_0405/PS4.2_0405.pdf
- Shutov, A.D. and A.I. Vaintraub. 1987.** Degradation of storage proteins in germinating seeds. Phytochemistry 26:1557-1562.
- Simmaco, M., G. Mignogna, D. Barra, and F. Bossa. 1994.** Antimicrobial peptides from skin secretions of *Rana esculenta*. Molecular cloning of cDNAs encoding esculentin and brevinins and isolation of new active peptides. J. Biol. Chem. 269:11956-11961.
- Song, W.Y., G.L. Wang, L.L. Chen, H.S. Kim, L.Y. Pi, T. Holsten, J. Gardner, B. Wang, W.X. Zhai, L.H. Zhu, C. Fauquet, and P. Ronald. 1995.** A receptor kinase-like protein encoded by the rice resistance gene, Xa21. Science 270, 804-1806.
- Song, J., J.M. Bradeen, S.K. Naess, J.A. Raasch, S.W. Wielgus, Haberlach, J.T. Liu J., S. Kuang, S. Austin-Phillips, Buell, J.M. Helgeson, and J. Jiang. 2003.** Gene *RB* cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight. Proc. Natl. Acad. Sci. 100:9128-9133.
- Souza Jr., M.T. and D. Gonsalves. 1998.** Development of transgenic *Carica papaya* L. resistant to the Brazilian isolate of PRSV: A case of technology transfer between Cornell University and EMBRAPA. Phytopathology 88(9 SUPPL.):S137.
- Staskawicz, B.J., D. Dahlbeck, and N.T. Keen. 1984.** Cloned avirulence gene of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* determines race-specific incompatibility on *Glycine max* (L.) Merr. Proc. Nat. Acad. Sci. 81:6024-6028.
- Stewart, S.D. 2007.** Bt cotton. Extension Publication No. W129. The University of Tennessee.
- Sui, N., M. Li, S.-J. Zhao, F. Li, H. Liang, and Q.-W. Meng. 2007.** Overexpression of glycerol-3-phosphate acyltransferase gene improves chilling tolerance in tomato. Planta 226(5):1097-1108.

- Suzuki, S., Y. Ohe, T. Okube, T. Kakegawa, and K. Tatemoto. 1995.** Isolation and characterization of novel antimicrobial peptides, rugosins A, B and C, from the skin of the frog, *Rana rugosa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212:249-254.
- Swiderski, M.R. and R.W. Innes. 2001.** The Arabidopsis PBS1 resistance gene encodes a member of a novel protein kinase subfamily. *Plant J.* 26:101-112.
- Syngenta. 2003a.** Syngenta selects VipCot™ as the brand name for its new insecticidal cotton trait. Syngenta Media Highlights 8/8/2003. http://www.syngentacropprotection-us.com/media/article.asp?article_id=398.
- Syngenta. 2003b.** New insecticide trait for cotton featured at Syngenta plot tour. Syngenta Media Releases 9/12/2003. http://www.syngenta-us.com/media/article.asp?article_id=411.
- Tabei, Y., S. Kitade, Y. Nishizawa, N. Kikuchi, T. Kayano, T. Hibi, and K. Akutsu. 1998.** Transgenic cucumber plants harboring a rice chitinase gene exhibit enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). *Plant Cell Rep.* 17:159-164.
- Tai, T.H., D. Dahlbeck, E.T. Clark, P. Gajiwala, R. Pasion, M.C. Whalen, R.E. Stall, and B.J. Staskawicz. 1999.** Expression of the Bs2 pepper gene confers resistance to bacterial spot disease in tomato. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 96:14153-14158.
- Tailor, R., J. Tippet, G. Gibb, S. Pells, D. Pike, L. Jordan, and S. Ely. 1992.** Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. *Mol. Microbiol.* 6:1211-1217.
- Thomas, P.E., E.C. Lawson, J.C. Zalewski, G.L. Reed, and W.K. Kaniewski. 2000.** Extreme field resistance in potato leafroll virus in potato cv. Russet Burbank mediated by the viral replicase gene. *Virus Research* 71(1-2):49-62.
- Tim Teknis Keamanan Hayati (TTKH). 1999a.** Laporan pengujian keamanan hayati kedelai *Roundup Ready* (toleran herbisida *glyphosate*) di Fasilitas Uji Terbatas.
- Tim Teknis Keamanan Hayati (TTKH). 1999b.** Laporan pengujian keamanan hayati jagung *Roundup Ready* (toleran herbisida *glyphosate*) di Fasilitas Uji Terbatas.
- Tim Teknis Keamanan Hayati (TTKH). 1999c.** Laporan pengujian keamanan hayati kapas *Roundup Ready* (toleran herbisida *glyphosate*) di Fasilitas Uji Terbatas.
- Tim Teknis Keamanan Hayati (TTKH). 1999d.** Laporan pengujian keamanan hayati kedelai *Roundup Ready* (toleran herbisida *glyphosate*) di Lapangan Uji Terbatas di Jawa Timur.
- Tim Teknis Keamanan Hayati (TTKH). 1999e.** Laporan pengujian keamanan hayati jagung *Roundup Ready* (toleran herbisida *glyphosate*) di Lapangan Uji Terbatas di Sulawesi Selatan.
- Tim Teknis Keamanan Hayati (TTKH). 1999f.** Laporan pengujian keamanan hayati kapas *Roundup Ready* (toleran herbisida *glyphosate*) di Lapangan Uji Terbatas di Sulawesi Selatan.
- Trudel, J., C. Potvin, and A. Asselin. 1992.** Expression of active hen egg white lysozyme in transgenic tobacco. *Plant Sci.* 87:55-67.
- Trudel, J., C. Potvin, and A. Asselin. 1995.** Secreted hen lysozyme in transgenic tobacco: recovery of bound enzyme and in vitro growth inhibition of plant pathogens. *Plant Sci.* 106:55-62.
- Trudgill, D.L. 1997.** Parthenogenetic root-knot nematodes (*Meloidigyne* spp.); how can these biotrophic endoparasites have such an enormous host range? *Plant Pathol.* 42:26-32.

- Tu, J., I. Ona, Q. Zhang, T.W. Mew, G.S. Khush, and S.K. Datta. 1998.** Transgenic rice variety 'IR72' with Xa21 is resistant to bacterial blight. *Theor. Appl. Genet.* 97:31-36.
- Tu, J., K. Datta, G.S. Khush, Q. Zhang, and S.K. Datta. 2000.** Field performance of Xa21 transgenic indica rice (*Oryza sativa* L.), IR72. *Theor. Appl. Genet.* 101:15-20.
- Uchimiya, H. 2001.** Annex II Genetic engineering for abiotic stress tolerance in plants. FAO Document Repository: Applications of Molecular Biology and Genomics to Genetic Enhancement of Crop.
- Urwin, P.E., H.J. Atkinson, D.A. Waller, and M.J. McPherson. 1995.** Engineered oryzacystatin-I expressed in transgenic hairy roots confers to *Globodera pallida*. *Plant J.* 8:121-31.
- Urwin, P.E., C.J. Lilley, M.J. McPherson, and H.J. Atkinson. 1997.** Resistance to both cyst-and root-knot nematodes conferred by transgenic *Arabidopsis* expressing a modified plant cystatin. *Plant J.* 12:455-61.
- Urwin, P.E., M.J. McPherson, and H.J. Atkinson. 1998.** Enhanced transgenic plant resistance to nematodes by dual protease inhibitor constructs. *Planta* 204:472-79.
- Urwin, P.E., I. Yi, H. Martin, H.J. Atkinson, and P.M. Gilmartin. 2000a.** Cross kingdom conservation of IRES function: The *Encephalomyocarditis* virus internal ribosome entry site works in plants. *Plant J.* 24:583-89.
- Urwin, P.E., A. Levesley, M.J. McPherson, and H.J. Atkinson. 2000b.** Transgenic resistance to the nematode *Rotylenchulus reniformis* conferred by *A. thaliana* plants expressing protease inhibitors. *Mol. Breed.* 6:257-64.
- Urwin, P.E., E.I. Zubko, and H.J. Atkinson. 2002.** The biotechnological application and limitation of IRES to deliver multiple defense genes to plant pathogens. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 61:103-8.
- USAID. 2004.** ABSPII work plan for the development and commercialization of drought and salinity stress tolerant rice for India, Bangladesh and Indonesia.
- 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.
- Van den Elzen, P.J.M., E. Jongedijk, L.S. Melchers, and B.J.C. Cornelissen. 1993.** Virus and fungal resistance: From laboratory to field. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* 342:271-278.
- Van Frankenhuyzen, K. and C. Nystrom. 2002.** The *Bacillus thuringiensis* toxin specificity database. <<http://www.glfsc.cfs.nrcan.gc.ca/Bacillus/btsearch.cfm>>.
- Van Rie, J., S. Jansens, H. Hofte, D. Degheile, and Van Mellaert. 1990.** Receptors on the brush border membrane on the insect midgut as determinant of the specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1378-1385.
- Varona, J., E.A. Rodriguez, and E. Jimenez. 2002.** Cloning and characterization of ripening-induced ACC oxidase gene from *Carica papaya* cv. 'Maradol roja'. *Nucleic Acid Database.*
- Vetten, Nick de. 2004.** Permohonan pengujian ubi kayu transgenik amilosa rendah dan toleran herbisida produk AVEBE Cooperative Co. Belanda. Presentasi dalam sidang Tim Teknis Keamanan Hayati dan Keamanan Pangan Kelompok Tanaman Desember 2004.
- Vidya, C.S.S., M. Manoharan, C.T.R. Kumar, H.S. Savitri, and G.L. Sita. 2000.** *Agrobacterium*-mediated transformation tomato with coat protein of Physalis mottle tymovirus. *J. Plant Physiol.* 156:106-110.

- Warren, G.W. 1997.** Vegetative insecticidal proteins: Novel proteins for control of corn pests. *In* Carozzi, N. and M. Koziel (Eds.). *Advances in Insect Control*. Taylor & Francis, Bristol, Pa. p. 109-121.
- 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
- Warren, R.F., A. Henk, P. Mowery, E. Holub, and R.W. Innes. 1998.** A mutation within the Leucine-rich repeat domain of the Arabidopsis disease resistance gene Rps5 partially suppresses multiple bacterial and downy mildew resistance genes. *Plant Cell* 10:1439-1452.
- Wessels, J.G.H. and J.H. Sietsma. 1981.** Funga1 cell walls: A survey. *In* Tanner, W. and F.A. Loewus (Eds.). *Encyclopedia of Plant Physiology*, New series. Plant Carbohydrates. 138:352-394.
- Wilson, F.D., M.F. Lint, W.R. Deaton, D.A. Fischhff, F.J. Perlak, T.A. Armstrong, R.L. Fusch, 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.
- Wu, L. and R.G. Birch. 2005.** Characterization of the highly efficient sucrose isomerase from *Pantoea dispersa* UQ68J and cloning of the sucrose isomerase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(3):1581-1590.
- Wu, L. and R.G. Birch. 2007.** Doubled sugar content in sugarcane plants modified to produce a sucrose isomer. *Plant Biotechnol. J.* 5:109-117.
- Wu, G., B.J. Shortt, E.B. Lawrence, E.B. Levine, K.C. Fitzsimmons, and D.M. Shah. 1995.** Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H₂O₂-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *Plant Cell* 7:1357-1368.
- Xie, Y. 2008.** Genetically modified tomatoes can keep cancer at bay. *Ars Technica* October 26, 2008. Available at <http://arstechnica.com/news.ars/post/20081026-forget-apples-a-tomato-a-day-is-what-might-keep-the-oncologist-away.html>.
- Xu, Y., Y.Y. Bai, Z.M. Wei, and Z.H. Xu. 1999.** Enhanced resistance of transgenic tobacco expressing shiva a gene against bacterial wilt disease (*Pseudomonas solanacearum* pv. *tabaci*). *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao* 32:73-76.
- Yamamoto, T., H. Iketani, H. Leki, Y. Nishizawa, K. Notsuka, T. Hibi, T. Hayashi, and N. Matsuta. 2000.** Transgenic grapevine plants expressing a rice chitinase with enhanced resistance to fungal pathogens. *Plant Cell Rep.* 19:639-646.
- Ye, X., S. Al-Babili, A. Klöti, J. Zhang, P. Lucca, P. Beyer, and I. Potrykus. 2000.** Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 287:303-305.
- Yin, D., S. Deng, K. Zhan, and D. Cui. 2007.** High-oleic peanut oils produced by HpRNA-mediated gene silencing of oleate desaturase. *Plant Mol. Biol. Rep.* 25(3-4):154-163.
- Yoshikawa, M., M. Tsuda, and Y. Takeuchi. 1993.** Resistance to fungal diseases in transgenic tobacco plants expressing the phytoalexin elicitor-releasing factor, b-1,3-endoglucanase, from soybean. *Naturwissenschaften* 80:417-420.
- Yoshimura, S., U. Yamanouchi, Y. Katayose, S. Toki, Z.-X. Wang, I. Kono, N. Kurata, M. Yano, N. Iwata, and T. Sasaki. 1998.** Expression of Xa1, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. *Proc. Nati. Acad. Sci.* 95:1663-1668.

- Yu, C.-G., M.A. Mullins, G.W. Warren, M.G. Koziel, and J.J. Estruch. 1997.** The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:532-536.
- Zakharchenko, N.S., E.B. Rukavtsova, A.T. Gudkov, and Y.I. Buryanov. 2005.** Enhanced resistance to phytopathogenic bacteria in transgenic tobacco plants with synthetic gene of antimicrobial peptide cecropin P1. *Russian J. Genetics* 41(11):1187-1193.
- Zhai, W.X., X.B. Li, W.Z. Tian, Y.L. Zhou, X.B. Pan, S.Y. Cao, X.F. Zhao, B. Zhao, Q. Zhang, and L.H. Zhu. 2000.** Introduction of a rice blight resistance gene, Xa21, into five Chinese rice varieties through an *Agrobacterium*-mediated system. *Science in China Series C* 43:361-368.
- Zhai, W.X., W.M. Wang, Y.L. Zhou, X.B. Li, X.W. Zheng, Q. Zhang, G.L. Wang, and L.H. Zhu. 2002.** Breeding bacterial blight-resistant hybrid rice with the cloned bacterial blight resistance gene Xa21. *Mol. Breed.* 8:285-293.
- Zhang, D.X. Li, and L.H. Zhang. 2002.** Isomaltulose synthase from *Klebsiella* sp. strain LX3: gene cloning and characterization and engineering of thermostability. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(6):2676-2682.
- Zhang, J., N.Y. Klueva, Z. Wang, R. Wu, T.H. David Ho, and H.T. Nguyen. 2000.** Genetic engineering for abiotic stress resistance in crop plants. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 36(2):108-114.
- Zhao, J., W. Ren, D. Zhi, L. Wang, and G. Xia. 2007.** *Arabidopsis DREB1A/CBF3* bestowed transgenic tall fescue increased tolerance to drought stress. *Plant Cell Rep.* 26(9):1521-1528.
- Zhu, Q., E.A. Maher, S. Masoud, R.A. Dixon, and C.J. Lamb. 1994.** Enhanced protection against fungal attack by constitutive co-expression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco. *Biotechnology* 12:807-812.

Bab III. Status Penelitian Tanaman PRG di Indonesia

Pada bab ini dijelaskan status kegiatan penelitian tanaman PRG di Indonesia. Penelitian perakitan tanaman PRG di Indonesia sudah dimulai pada awal 1990-an. Penelitian tersebut dilakukan oleh berbagai lembaga penelitian, perguruan tinggi, badan usaha milik negara (BUMN), dan perusahaan swasta. Lembaga penelitian yang melakukan perakitan tanaman PRG antara lain Pusat Penelitian (Puslit) Bioteknologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Balai Pengkajian Bioteknologi Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT), Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (BB-Biogen) di bawah Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan di bawah Lembaga Riset Perkebunan Indonesia (LRPI). Perguruan tinggi yang melakukan kegiatan perakitan tanaman PRG antara lain Institut Pertanian Bogor (IPB), Institut Teknologi Bandung (ITB), Universitas Gadjah Mada (UGM), Universitas Jember, Universitas Udayana, Universitas Brawijaya. Sedangkan BUMN dan perusahaan swasta yang melakukan penelitian tanaman PRG adalah PTPN XI dan PT Indah Kiat (Mulya *et al.* 2003, Murdyatmo 2003, 2004). Secara lengkap status kegiatan penelitian perakitan tanaman PRG di Indonesia disajikan pada Tabel 1, Tabel 2, dan Tabel 3. Status tersebut pada taraf penelitian baik di laboratorium, rumah kaca, dan rumah kaca dalam Fasilitas Uji Terbatas (FUT), maupun sudah di Lapangan Uji Terbatas (LUT) (Mulya *et al.* 2003, Bahagiawati dan Herman 2008, Herman 2008). Kegiatan penelitian tanaman PRG di Indonesia sebagian besar ditujukan untuk memperoleh tanaman PRG yang tahan cekaman biotik dan toleran cekaman abiotik seperti kekeringan. Sebagian kegiatan ditujukan untuk memodifikasi kualitas tanaman seperti penundaan kemasakan buah, penurunan kandungan amilosa, dan perakitan buah tanpa biji (Herman 2008).

KETAHANAN TERHADAP CEKAMAN BIOTIK

Serangga Hama

Salah satu hama penting tanaman padi di Indonesia adalah penggerek batang padi (PBP). PBP di Indonesia ada berbagai jenis, antara lain PBP putih (*Scirpophaga innotata*), PBP kuning (*S. incertulas*), PBP bergaris (*Chilo suppressalis*), PBP merah jambu (*Sesamia inferens* Wlk), PBP kepala mengkilat (*C. auricilius* D.), dan PBP kepala hitam (*C. polychrysus* M.) (IRRI 2006). PBP dapat menyerang pertanaman padi baik pada tahap pertumbuhan vegetatif dengan menimbulkan gejala serangan sundep, maupun tahap generatif dengan menimbulkan gejala serangan beluk.

Sedangkan pada kedelai, salah satu hama penting adalah penggerek polong (*Etiella zinckenella* Tr) (Marwoto *et al.* 1991, Nurdin *et al.* 1995). Apabila tidak dilakukan pengendalian, serangan penggerek polong dapat mencapai 90% (Nurdin *et al.* 1995). Pengendalian dengan aplikasi insektisida mengalami kendala karena larva hama tersebut menyerang dan berada dalam polong kedelai.

STATUS PENELITIAN TANAMAN PRG DI INDONESIA

Tabel 1. Penelitian perakitan tanaman PRG pada tahap laboratorium di berbagai lembaga.

Perbaikan sifat/karakter tanaman	Komoditas	Gen	Lembaga penelitian/perguruan tinggi/swasta
Tahan cekaman biotik			
• Tahan tahan hama penggerek buah	Kakao	<i>cry1Ac</i>	Balit Bioteknologi Perkebunan
• Tahan hama (TAD)	Jati	TAD	PT Indah Kiat
• Tahan virus patogen (TAD)	Cabai	CP	IPB
• Tahan penyakit (TAD)	Kentang	hordotionin	IPB
• Tahan cendawan patogen (TAD)	Kedelai	<i>chitinase, glucanase</i>	Universitas Brawijaya
	Abaca	<i>chitinase, glucanase</i>	Universitas Brawijaya
	Jarak pagar	<i>chitinase, glucanase</i>	Universitas Brawijaya
	Jeruk (batang bawah)	<i>chitinase, glucanase</i>	Universitas Brawijaya
• Tahan penyakit bercak daun (TAD)	Kubis	TAD	Universitas Gadjah Mada dan Universitas Airlangga
Toleran cekaman abiotik			
• Toleran kekeringan	Padi	<i>DREB1A</i> <i>trehalose</i>	BB-Biogen IPB kerja sama dengan BB-Biogen
	Tebu	<i>P5CS</i>	Balit Bioteknologi Perkebunan
• Toleran aluminium	Kedelai	<i>Mamt2</i>	IPB kerjasama dengan BB-Biogen
Modifikasi kualitas			
• Penggunaan nitrit secara efisien	Jagung	CsNitr1-L	BB-Biogen
• Penundaan pembungaan	Jati	<i>leafy</i>	ITB
• Peningkatan pembungaan	Manggis	<i>Apekalla-1 (AP-1)</i>	Balit Bioteknologi Perkebunan kerja sama dengan IPB
• Kandungan gula kalori rendah (palatinosa)	Tebu	<i>pall</i>	ITB
• Kandungan amilosa tinggi	Ubi kayu	<i>BE-1 dan BE-2</i>	Puslit Bioteknologi LIPI
• Kandungan asam oleat tinggi	Kelapa sawit	<i>KASII, Palmitoyl ACP Theosterase</i>	Balai Pengkajian Bioteknologi, BPPT

TAD = tidak ada data, CP = *coat protein*, BB-Biogen = Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, IPB = Institut Pertanian Bogor, ITB, Institut Teknologi Bandung, Balit = Balai Penelitian, Puslit = Pusat Penelitian, LIPI = Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, BPPT = Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi. Modifikasi Mulya *et al.* (2003), Bahagiawati *et al.* (2006), Bahagiawati dan Herman (2008).

1. Padi Bt

Penelitian perakitan padi Bt dilakukan oleh BB-Biogen dan Puslit Bioteknologi LIPI (Herman 2008, Loedin 2008). Perakitan padi PRG tahan PBP putih (*S. innotata*) dan PBP kuning (*S. incertulas*) dimulai pada tahun 1997 oleh tim peneliti BB-Biogen (Hanarida *et al.* 1998). Tim peneliti BB-Biogen menggunakan gen *cry1Ab* dalam perakitan padi Bt untuk ketahanan terhadap hama penggerek batang. Gen *cry1Ab* di-transformasikan ke tanaman padi *Indica* varietas Cisadane dan Sintanur, serta *Japonica* varietas Taipei 309 (T309) dengan teknik penembakan partikel (Hanarida *et al.* 2002).

Hasil transformasi menunjukkan bahwa padi yang sangat respon terhadap transformasi dengan penembakan partikel adalah varietas T309 (Hanarida *et al.* 2002). Hasil analisis molekuler dengan PCR pada tanaman PRG putatif generasi T₁, T₂, dan T₃ menunjukkan bahwa ada 10 tanaman yang positif PCR. Tanaman yang positif tersebut adalah dua tanaman dari generasi T₁, tujuh tanaman generasi T₂, dan satu tanaman generasi T₃ (Santoso *et al.* 2002). Hasil bioasai di rumah kaca FUT, sepuluh tanaman tersebut menunjukkan respon tahan-sangat tahan terhadap PBP kuning (Dewi *et al.* 2002).

STATUS PENELITIAN TANAMAN PRG DI INDONESIA

Tabel 2. Penelitian perakitan tanaman PRG pada tahap rumah kaca, rumah kaca, dan atau FUT di berbagai lembaga.

Perbaikan sifat/karakter tanaman	Komoditas	Gen	Rumah kaca/ rumah kaca/FUT	Lembaga penelitian/BUMN
Tahan cekaman biotik				
• Tahan hama penggerek batang kuning (Si)	Padi	<i>cry1Ab</i>	Rumah kaca/FUT	BB-Biogen
• Tahan hama penggerek polong (Ez)	Kedelai	<i>cry1B-cry1Aa, cry1B pin II</i>	Rumah kaca/FUT	Puslit Bioteknologi LIPI
• Tahan penyakit HDB (Xoo) dan blas (Po)	Padi	<i>cry1Ab</i>	Rumah kaca/FUT	BB-Biogen
• Tahan penyakit blas (Po) dan <i>Rhizoctonia solani</i>	Padi	<i>OsWRKY76</i>	Rumah kaca/FUT	BB-Biogen
• Tahan penyakit daun kuning keriting (TYLCV) dan CMV	Tomat	<i>entC, pmsB</i>	Rumah kaca/FUT	Puslit Bioteknologi LIPI
• Tahan penyakit bilur (PSTV)	Kacang tanah	CP	Rumah kaca/FUT	BB-Biogen kerja sama dengan Balitsa dan IPB
• Tahan penyakit layu (<i>Fusarium</i> sp.)	Kentang	CP	Rumah kaca	BB-Biogen
• Tahan nematoda kista emas (Gr)	Kentang	<i>chitinase</i>	Rumah kaca	IPB
• Tahan penyakit CVPD	Jeruk	<i>chitinase</i>	Rumah kaca	IPB
		<i>CVPD'</i>	Rumah kaca	Universitas Brawijaya kerja sama dengan Universitas Udayana
			Rumah kaca	Universitas Udayana
Toleran cekaman abiotik				
• Toleran kekeringan	Padi	<i>Hd-Zip (oshox)</i>	Rumah kaca/FUT	Puslit Bioteknologi LIPI
Modifikasi kualitas				
• Penggunaan nitrit secara efisien	Padi	<i>CsNitri1-L</i>	Rumah kaca/FUT	BB-Biogen
• Penundaan pemasakan buah	Pepaya	<i>Antisense ACC Oxidase</i>	Rumah kaca/FUT	BB-Biogen
• Buah tanpa biji (partenokarpi)	Tomat	<i>defH9-iaaM dan defH9-RI-iaaM</i>	Rumah kaca/FUT	BB-Biogen
• Kandungan albumin tinggi	Kedelai	<i>albumin</i>	Rumah kaca	Universitas Udayana
• Produktivitas tinggi	Kedelai PRG	SPS	Rumah kaca	Universitas Udayana
• Kandungan rendemen tinggi	Tebu	SoSPS1	Rumah kaca/FUT	PTPN XI kerjasama dengan Universitas Jember
• Peningkatan absorpsi P	Tebu	<i>phytase</i>	Rumah kaca	IPB
• Percepatan pertumbuhan dan kandungan selulase tinggi	Sengon	<i>Xylolase, xylo-glucanase, poly galacturonase, dan xylanase</i>	Rumah kaca/FUT	Puslit Bioteknologi LIPI
• Peningkatan pertumbuhan dan kandungan selulase tinggi	Akasia	<i>Xylolase, xylo-glucanase, poly galacturonase, dan xylanase</i>	Rumah kaca/FUT	Puslit Bioteknologi LIPI

FUT = fasilitas uji terbatas, Si = *Scirpophaga incertulas*, Ez = *Etiella zinckenella*, HDB = hawar daun bakteri, Xoo = *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, Po = *Pyricularia oryzae*, TYLCV = *tomato yellow leaf curl virus*, CMV = *cucumber mosaic virus*, Gr = *Globodera rostochiensis*, PSTV = *peanut stripe virus*, CP = *coat protein*, CVPD = *citrus vein phloem degeneration*, BB-Biogen = Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Puslit = pusat penelitian, LIPI = Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Balitsa = Balai Penelitian Tanaman Sayuran, IPB = Institut Pertanian Bogor, PTPN = Perseroan Terbatas Perkebunan Nusantara. Modifikasi Bahagiawati *et al.* (2006), Bahagiawati dan Herman (2008), Herman (2008).

Benih padi PRG putatif generasi T₄ dan T₅ ditumbuhkan dan dilakukan pengujian lanjutan dengan analisis molekuler PCR, uji immunostrip, dan bioasai dengan PBP kuning di rumah kaca FUT (Ambarwati *et al.* 2004). Hasil pengujian menunjukkan bahwa 38 tanaman T₄ positif PCR (45,8%) dan 31 tanaman positif immunostrip (37,4%). Sedangkan generasi T₅ menunjukkan bahwa 85 tanaman positif PCR (51,1%) dan 50

STATUS PENELITIAN TANAMAN PRG DI INDONESIA

Tabel 3. Penelitian perakitan tanaman PRG pada tahap LUT di berbagai lembaga.

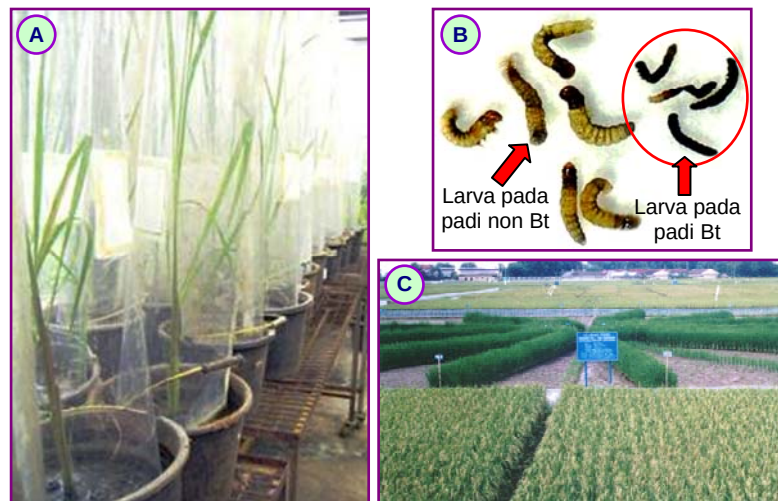
Perbaikan sifat/karakter tanaman	Komoditas	Gen	Lembaga penelitian/BUMN
Tahan cekaman biotik			
• Tahan hama penggerek batang kuning (Si)	Padi	<i>cry1Ab</i>	Puslit Bioteknologi LIPI
• Tahan penyakit hawar daun (Pi)	Kentang	RB	BB-Biogen kerjasama dengan Balitsa
Toleran cekaman abiotik			
• Toleran kekeringan	Tebu	<i>betA</i>	PTPN XI
Modifikasi kualitas			
• Kandungan amilosa rendah	Ubi kayu	<i>IRC-GBSS</i>	BB-Biogen kerjasama dengan Puslit Bioteknologi LIPI
• Kandungan rendemen tinggi	Tebu	<i>SoSPS1</i>	PTPN XI kerjasama dengan Universitas Jember

LUT = lapangan uji terbatas, Si = *Scirpophaga incertulas*, Pi = *Phytophthora infestans*, BUMN = Badan Usaha Milik Negara, LIPI = Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, BB-Biogen = Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Balitsa = Balai Penelitian Tanaman Sayuran, PTPN = Perseroan Terbatas Perkebunan Nusantara. Modifikasi Bahagiawati dan Herman (2008), Herman (2008).

tanaman positif immunostrip (30,3%) (Ambarwati *et al.* 2004). Hasil bioasai padi Bt terhadap PBP kuning, menunjukkan 25 tanaman generasi T₄ bereaksi tahan-sangat tahan pada tahap vegetatif (gejala serangan sundep) dan 28 tanaman pada tahap generatif (gejala serangan beluk). Sedangkan untuk tanaman generasi T₅ diperoleh 22 tanaman bereaksi tahan-sangat tahan pada tahap vegetatif (sundep) dan 17 tanaman pada tahap generatif (beluk) (Ambarwati *et al.* 2004).

Padi Bt varietas Rojolele yang mengandung gen *cry1Ab* juga berhasil dirakit oleh tim peneliti dari Puslit Bioteknologi LIPI (Estiati *et al.* 2006). Studi bioasai PBP kuning terhadap padi Bt dilakukan di FUT (Gambar 1A). Hasil bioasai menunjukkan adanya perbedaan mortalitas pada larva PBP kuning yang makan padi Bt dan padi non Bt (Gambar 1B). Bahkan pengujian padi Bt di LUT di daerah Karawang dan Indramayu, telah diperoleh satu galur padi PRG 6.11(+/-) generasi ketujuh (T₆) mengandung gen *cry1Ab*, potensial tahan PBP kuning (Estiati *et al.* 2006). Hasil LUT menunjukkan bahwa galur 6.11(+/-) tahan PBP kuning (*S. incertulas* Wlk) dengan tingkat kerusakan 5%, sedangkan tingkat kerusakan padi non PRG 21% pada varietas Rojolele dan 50% pada IR42 (Estiati *et al.* 2006). Studi pengkajian keamanan lingkungan padi Bt yang meliputi dampak padi Bt terhadap organisme bukan sasaran (non target) dan perpindahan gen (*gene flow*) (Gambar 1C) telah dilakukan di LUT selama tiga tahun. Hasil studi, menunjukkan bahwa padi Bt yang mengandung gen *cry1Ab* tidak berpengaruh terhadap populasi musuh alami dan organisme non target (termasuk mikroba tanah). Kondisi tersebut terkait dengan tidak ada perbedaan populasi musuh alami dan organisme non target baik pada plot padi Bt maupun non Bt (Estiati *et al.* 2006). Hasil studi perpindahan gen menunjukkan bahwa tidak terjadi perpindahan gen.

Di samping *cry1Ab*, tim peneliti Puslit Bioteknologi LIPI menggunakan gen fusi dua gen *cry* (*cry1B-cry1Aa*) dan gen *cry1B* dengan promoter gen terinduksi pelukaan, *mpi* untuk merakit padi Bt yang lain (Estiati *et al.* 2006). Hasil bioasai padi Bt yang positif mengandung gen *cry1B-cry1Aa* atau *cry1B* terhadap hama PBP menunjukkan bahwa



Gambar 1. Bioasai penggerek batang padi kuning terhadap padi Bt di FUT (A) dan pengaruhnya terhadap larva (B), serta studi *gene flow* padi Bt di Kerawang (C) (Estiati *et al.* 2006, Loedin 2008).

padi Bt mempunyai tingkat serangan yang lebih rendah (0-1) dibandingkan dengan tingkat serangan pada padi non Bt varietas Rojolele, yaitu skala 9 (Estiati *et al.* 2006).

2. Kedelai *pinII*

Penelitian kedelai *pinII* hanya dilakukan di BB-Biogen. Tim peneliti BB-Biogen berhasil mentransformasi gen *pinII* ke genom kedelai varietas Tidar dan Wilis melalui mediasi vektor *A. tumefaciens* (Pardal 2004, Pardal *et al.* 2004) dan dengan penembakan partikel (Pardal 2004, Pardal *et al.* 2005). Hasil transformasi melalui vektor *A. tumefaciens* dan analisis molekuler dengan PCR menunjukkan bahwa hanya kedelai varietas Wilis yang positif mengandung gen *pinII* (Pardal 2004, Pardal *et al.* 2004).

Sedangkan transformasi dengan penembakan partikel menghasilkan transforman kedelai varietas Tidar yang positif PCR (Pardal 2004, Pardal *et al.* 2005). Benih generasi kedua (T_1) dari kedelai PRG varietas Tidar dan Wilis ditumbuhkan untuk bioasai ketahanan terhadap hama penggerek polong di rumah kaca FUT BB-Biogen. Hasil bioasai menunjukkan bahwa tingkat serangan pada polong kedelai PRG varietas Wilis 45,4% (20-60%), sedangkan varietas Tidar 58,8% (35-75%), dibandingkan 96,5% pada Wilis non PRG dan 95,5% pada Tidar non PRG (Pardal 2004).

3. Kedelai Bt

Dalam rangka perakitan kedelai PRG tahan hama penggerek polong, tim peneliti BB-Biogen mentransformasikan gen *cryIAb* ke dalam genom kedelai varietas Wilis dan Sindoro melalui mediasi vektor *A. tumefaciens* dan penembakan partikel. Hasil transformasi diperoleh kedelai PRG varietas Sindoro generasi ke-2 (T_1) yang positif

mengandung gen *cry1Ab*. Kedelai PRG T₁ tersebut berada di rumah kaca FUT BB-Biogen untuk keperluan pengujian selanjutnya.

Penyakit Tanaman

Salah satu penyakit penting tanaman padi di Indonesia adalah blas. Penyakit blas disebabkan oleh cendawan *Magnaporthe grisea* Barr (*anamorph Pyricularia grisea* Sacc., sinonim *P. oryzae* Cav.). Selain itu ada penyakit hawar daun bakteri (HDB) yang disebabkan oleh *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) (Semangun 1991, Kardin dan Hifni 1993, Machmud dan Farida 1995).

Pada tanaman kentang penyakit sering menjadi kendala penting dalam produksi. Penyakit busuk daun atau hawar daun (*late blight*) yang disebabkan oleh cendawan *Phytophthora infestans* merupakan salah satu penyakit utama pada tanaman kentang, dan menyerang seluruh areal pertanaman kentang di Indonesia. Penyakit ini di Indonesia dapat menurunkan hasil sampai dengan 80% pada musim hujan (Sinaga *et al.* 1997).

Salah satu kendala biotik yang serius pada produksi tomat adalah penyakit daun kuning keriting yang disebabkan oleh virus gemini (*tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV). Di Indonesia, virus ini dapat menginfeksi hampir 90-100% tanaman tomat dan mengakibatkan pengurangan hasil antara 50-100% (Sudiono *et al.* 2001). Selain tomat, virus gemini menyerang tanaman tembakau (Trisusilowati 1989, Trisusilowati *et al.* 1990). Virus Gemini dapat menyebabkan penurunan produksi dan kualitas tanaman tembakau (Hendrastuti *et al.* 1999). Setelah TYLCV, virus mosaik mentimun atau *cucumber mosaic virus* (CMV) adalah penyakit virus kedua yang paling merugikan pada tomat. Virus ini menginfeksi lebih dari 1000 spesies pada lebih dari 85 famili, termasuk tomat dan cabai (Duriat 1996, Deptan 1999).

1. Cendawan dan bakteri patogen

Gen-gen yang potensial digunakan dalam perakitan tanaman PRG tahan cendawan patogen (TCP) ada beberapa seperti *chitinase* (Broglie *et al.* 1993, Datta *et al.* 2000), *glucanase* (Lusso dan Kuc 1996), dan RIP (*ribosome in-activating protein*) (Logemann *et al.* 1992). Penggunaan gen-gen tersebut dijelaskan dengan lengkap pada Bab II tentang rekayasa genetik untuk perbaikan tanaman. Selain gen-gen tersebut ada gen-gen lain yang digunakan seperti gen RB dan gen penyandi asam salisilat (*entC* dan *pmsB*) dan WRKY. Asam salisilat adalah suatu molekul signal penting di dalam pertahanan tanaman (Shah 2003). Asam salisilat secara alamiah berakumulasi di dalam tanaman sebagai bagian dari suatu respon ketahanan tanaman secara sistemik (*systemic acquired resistance* atau SAR). SAR adalah suatu cara tanaman untuk melindungi dirinya dari suatu infeksi oleh patogen (Verberne *et al.* 2000). Gen yang mengkode enzim *isochorismate isomerase* (*entC*) diperoleh dari *Escherichia coli* dan gen yang mengkode *SA-forming isochorismate: pyruvate lyase* (*pmsB*) diperoleh dari

Pseudomonas fluorescence (Verberne *et al.* 2000). Menurut Blanco *et al.* (2001), gen *entC* dan *pmsB* terlibat dalam biosintesis asam salisilat.

Protein kelompok WRKY merupakan protein faktor transkripsi yang berhubungan dengan pengaturan ketahanan tanaman terhadap patogen (Eulgem *et al.* 1999, Ulker dan Somssich 2004, Zhang dan Wang 2005). Gen WRKY telah diisolasi dari berbagai tanaman seperti *Arabidopsis thaliana*, ubi jalar (*Ipomoea batatas*), barley (*Hordeum vulgare*), tembakau (*Nicotiana tabacum*), padi (*Oryza sativa*), kentang (*Solanum tuberosum*), dan gandum (*Triticum aestivum*) (Zhang dan Wang 2005). Gen OsWRKY76 telah diisolasi dari tanaman padi yang berhubungan dengan pengaturan ketahanan terhadap cendawan patogen *M. grisea* dan bakteri patogen *X. oryzae* pv. *oryzae* (Ryu *et al.* 2006).

a. Padi PRG dengan gen OsWRKY76

Tim peneliti BB-Biogen melakukan perakitan padi PRG untuk ketahanan terhadap penyakit blas dan hawar daun bakteri (HDB) dengan strategi *over*-ekspresi. Gen yang digunakan adalah faktor transkrip OsWRKY76 yang berasal dari tanaman padi. Gen tersebut diisolasi dari padi varietas Nipponbare dan dikonstruksikan dengan promoter dan terminator 35S (Apriana 2008). Gen OsWRKY76 ditransformasikan ke genom tanaman padi varietas Nipponbare melalui mediasi vektor *A. tumefaciens*. Kegiatan ini menghasilkan 750 planlet dari 126 *event*. Dari 126 *event*, 34 *event* dianalisis molekuler dengan PCR. Hasil PCR menunjukkan semua *event* (34) positif. Dari 34 *event*, 26 *event* dianalisis dengan *Southern Blot* dan menunjukkan jumlah kopi yang bervariasi, dari satu sampai empat kopi. Ada enam *event* yang mempunyai satu kopi. Benih generasi kedua (T₁) ditumbuhkan dan dilakukan bioasai terhadap penyakit blas dan HDB. Hasil bioasai dengan penyakit blas isolat 173 menunjukkan tiga *event* dengan kopi tunggal yang lebih tahan dibandingkan dengan kontrol peka, yaitu Kencana Bali dan Nipponbare non PRG (Apriana 2008). Sedangkan bioasai dengan HDB isolat 93-101 ada dua *event* (satu *event* mengandung satu kopi) yang menunjukkan lebih tahan dibandingkan dengan Nipponbare non PRG dan kontrol peka Kencana Bali (Apriana komunikasi pribadi).

b. Padi PRG dengan gen *entC* dan *pmsB*

Tim peneliti dari Puslit Bioteknologi LIPI melakukan perakitan padi PRG tahan penyakit blas (*P. grisea*). Gen yang ditransformasikan adalah gen-gen penyandi asam salisilat (*entC* dan *pmsB*) dengan gen penanda higromisin (*hpt*) (Loedin *et al.* 2006). Berdasarkan bioasai terhadap penyakit blas, diperoleh satu galur padi PRG yang tahan (Loedin *et al.* 2006).

c. Kentang PRG dengan gen RB

Gen ketahanan cendawan patogen terhadap hawar daun (*P. infestans*), berhasil diisolasi dari *S. bulbocastanum* oleh tim peneliti dari University of Wisconsin (UW), AS (USAID 2004). Perakitan kentang PRG tahan *P. infestans* menggunakan gen RB

berhasil dilakukan melalui teknik rekayasa genetik dengan *Agrobacterium tumefaciens*, juga oleh tim peneliti dari UW. Varietas kentang yang digunakan adalah Katahdin, yang telah diuji ketahanannya di laboratorium dan menunjukkan tahan terhadap *P. infestans*. Di samping itu, diuji ketahanannya di lapangan terbatas selama dua tahun di Minnesota, Wisconsin, dan di *International Potato Late Blight Testing Program* Toluca, Mexico, (PICTIPAPA) (USAID 2004). Pada tahun 2004 kentang PRG tersebut juga diuji di negara bagian Washington. Hasil pengujian di berbagai daerah dari berbagai negara bagian tersebut menunjukkan bahwa gen RB yang berada di dalam kentang PRG varietas Katahdin dapat mengendalikan penyakit hawar daun (*P. infestans*) pada awal musim (*early-season*), tetapi tidak mengendalikan *P. infestans* pada akhir musim (*late-season*). Meskipun kentang PRG Katahdin mengandung gen tunggal, tetapi ketahanannya tidak spesifik ras (USAID 2004). Song *et al.* (2003) juga sudah berhasil mengklon dan memetakan gen RB pada lokasi spesifik di kromosom 8. Grup peneliti lain dari *Michigan State University*, AS juga melakukan transformasi gen RB ke genom tanaman kentang yang peka (rentan) terhadap *P. infestans* (Kuhl *et al.* 2007). Hasil penelitian Halterman *et al.* (2008) di rumah kaca University of Wisconsin menunjukkan bahwa kentang PRG varietas Katahdin, Superior, Russet Burbank, dan Dark Red Norland mempunyai ketahanan yang tinggi pada daun terhadap *P. infestans*. Berbeda nyata dengan hasil penelitian di lapangan terbatas selama dua tahun yang menunjukkan umbi kentang PRG yang mengandung gen RB tidak mempunyai ketahanan terhadap *P. infestans* (Halterman *et al.* 2008).

Kentang PRG varietas Katahdin dengan gen RB, *event* SP904 dan SP951 tahan *P. infestans* hasil rakitan tim peneliti UW, AS telah diuji di LUT, Balai Penelitian Tanaman Sayuran (Balitsa) Lembang pada tahun 2007 (Herman *et al.* 2007a). LUT tersebut telah dipantau oleh Tim Teknis Keamanan Hayati dan Keamanan Pangan (TTKHKP) Kelompok Tanaman (TTKHKP 2007a). Hasil observasi LUT menunjukkan bahwa serangan alami *P. infestans* mulai muncul pada kentang non PRG varietas Atlantic (varietas peka) pada 33 hari setelah tanam (HST). Pada 66 HST serangan *P. infestans* menyebabkan matinya tanaman peka (Atlantic, Granola, dan Katahdin non PRG) (Gambar 2B, 2C, 2D), sebaliknya kentang PRG varietas Katahdin *event* SP904 dan SP951 yang mengandung gen RB (Gambar 2A dan 2E), menunjukkan ketahanan terhadap *P. infestans* ras Lembang, Indonesia (Herman *et al.* 2007b).

Kentang PRG *event* SP904 dan SP951 disilangkan dengan kentang varietas Atlantic dan Granola, yang dilakukan di BB-Biogen dan Balitsa (Herman *et al.* 2006). Persilangan kedua *event* tersebut dengan Atlantic dan Granola menghasilkan biji F₁. Kedua biji F₁ tersebut ditumbuhkan dan diuji secara molekuler dengan PCR untuk mendeteksi keberadaan gen RB, yang dilakukan di BB-Biogen. Uji PCR menunjukkan hasil sebagai berikut: Granola x SP904 sebesar 26,1% positif PCR, Granola x SP951 sebesar 44,1%, Atlantic x SP904 sebesar 33,3%, dan Atlantic x SP951 sebesar 49,6% (Herman *et al.* 2007a).

Gen RB hasil kloning dan konstruksi tim peneliti dari UW, AS juga berhasil ditransformasikan ke kentang varietas Granola (Herman *et al.* 2006). Transformasi gen RB menghasilkan 95 transforman. Dari jumlah tersebut 74 di antaranya telah dianalisis secara molekuler dengan PCR untuk mengetahui keberadaan gen RB. Hasil PCR menunjukkan 50 tanaman yang positif. Lima puluh tanaman yang positif tersebut berasal dari 20 *independent event* (Herman *et al.* 2007a). Progeni hasil persilangan dan transformasi diharapkan tahan *P. infestans* ras Indonesia. Progeni dan transforman tersebut berada di FUT BB-Biogen dan Balitsa.

d. Kentang PRG dengan gen *chitinase*

Gen *chitinase* berhasil diisolasi dan dikloning oleh Malik *et al.* (2003). Gen tersebut berasal dari bakteri *Aeromonas caviae* WS7b (Malik *et al.* 2003) di IPB. Gen *chitinase* ditransformasikan ke genom tanaman kentang varietas Desiree oleh Wiendi (2005) di IPB. Kentang PRG yang mengandung gen *chitinase* telah diuji ketahanannya terhadap cendawan patogen *Fusarium oxysporum*, ternyata menunjukkan ketahanan terhadap patogen tersebut (Wiendi 2005).

2. Virus patogen

Penelitian perakitan tomat PRG tahan TYLCV dan CMV, serta tembakau PRG tahan TYLCV dilakukan di BB-Biogen. Penelitian tersebut merupakan penelitian kerja sama BB-Biogen dengan Balitsa dan IPB.

a. Tomat tahan TYLCV dan CMV

Dua galur tomat tahan virus gemini TYLCV (FLA456 dan FLA478) hasil persilangan konvensional dan dua *event* tomat PRG (R7-110-11 dan R7-51-12) tahan CMV telah dirakit di AVRDC. Empat galur tomat tersebut digunakan sebagai *donor parent* untuk disilangkan dengan empat tomat varietas Indonesia (Gondol Hijau, CL6046, Opal, dan Intan) sebagai *recurrent parent* di AVRDC (Santoso 2005). Progeni hasil persilangan dilakukan uji lanjutan di Indonesia, seperti persilangan ganda (*intercross*) dan efikasi ketahanan terhadap virus gemini dan CMV strain Indonesia. Hasil uji



Gambar 2. Hasil bioasai *P. infestans* terhadap kentang PRG yang tahan (A dan E) dan non PRG yang peka (B, E, dan D) pada 65 hari setelah tanam di lapangan uji terbatas, Balitsa (Herman *et al.* 2007a).

efikasi terhadap virus gemini yang dilakukan di IPB menunjukkan bahwa FLA456 (tetua tahan TYLCV) lebih tahan dibandingkan dengan tetua FLA478. Progeni hasil persilangan varietas Intan dengan FLA456 dilakukan uji skrining ketahanan terhadap TYLCV (Hendrastuti *et al.* 2006, Santoso 2008). Hasil uji skrining menunjukkan dari 44 tanaman yang diuji 30 tanaman tahan terhadap TYLCV (Gambar 3E). Progeni yang tahan terhadap TYLCV disilangandakan dengan progeni persilangan dengan R7-110-11 dan R7-51-12 yang positif mengandung gen CP-CMV. Progeni hasil persilangan varietas Intan dengan R7-110-11 (CMV-A) juga dilakukan uji skrining ketahanan terhadap CMV. Hasil uji skrining menunjukkan dari 19 tanaman yang diuji 14 tanaman tahan terhadap CMV (Gambar 3A). Progeni hasil persilangan ganda, diuji efikasi ketahanannya terhadap TYLCV dan CMV, serta dianalisis keberadaan gen CP-CMV dengan PCR. Hasil uji skrining ketahanan TYLCV pada progeni persilangan ganda menunjukkan 10 tanaman (dari 17 tanaman) yang tahan, dan 12 tanaman positif mengandung gen CMV melalui analisis PCR (Santoso 2008). Progeni yang tahan dan mengandung gen CP-CMV disilangbalikkan dengan tomat varietas Intan dan CL6046 (Hendrastuti *et al.* 2007).

b. Tembakau tahan virus gemini

Perakitan tembakau PRG tahan virus gemini dilakukan di BB-Biogen. Gen AV1 dikonstruksi dari isolat gemini virus yang berasal dari Kaliurang dan Brastagi. Gen AV1 ditransformasikan ke tanaman tembakau melalui mediasi vektor *A. tumefaciens*. Hasil transformasi menunjukkan 35 tanaman (dari 46 tanaman) positif PCR mengandung gen AV1 (Santoso 2008). Tanaman yang positif PCR dianalisis dengan *Southern Blot* dan menunjukkan lima tanaman (dari 11 tanaman) mengandung 1 kopi gen AV1. Lima tanaman tersebut diuji efikasi ketahanannya terhadap virus gemini dan menunjukkan empat tanaman tahan (Gambar 4A), serta tidak mengandung virus gemini (Santoso 2008).

Nematoda Parasit Tanaman

Kentang PRG yang mengandung gen *chitinase* hasil rakitan Wiendi (2005) diuji ketahanannya terhadap nematoda sista kentang (*Globodera* spp.) oleh Lisnawita (2007) di IPB. Hasil pengujian menunjukkan bahwa jumlah sista pada kentang PRG varietas Desiree 24,6 dan 66,6 pada kentang non PRG varietas Desiree (Lisnawita 2007). Dalam skoring ketahanan, kentang PRG termasuk agak tahan terhadap nematoda sista kentang.

TOLERAN TERHADAP CEKAMAN ABIOTIK: TOLERAN KEKERINGAN

Tebu PRG

Kegiatan perakitan tebu PRG toleran kekeringan dilakukan oleh Puslit Bioteknologi Perkebunan dan PTPN XI. Gen yang digunakan adalah *P5CS* dan *betA*.



Gambar 3. Hasil bioasai CMV dan TYLCV terhadap tomat PRG yang tahan CMV (A) dan TYLCV (E), dan non PRG yang peka CMV (B) serta TYLCV (C dan D) di rumah kaca, IPB (Santoso 2008).



Gambar 4. Hasil bioasai TYLCV terhadap tembakau PRG yang tahan (A) dan non PRG yang peka (B, C, dan D) di rumah kaca, IPB (Santoso 2008).

Fitranty *et al.* (2003) dari Puslit Bioteknologi Perkebunan melakukan transfer gen *P5CS* ke dalam kalus tebu klon PS 851 dengan vektor *A. tumefaciens*. Hasil analisis PCR menunjukkan bahwa tebu PRG positif mengandung gen *P5CS*. Untuk mengetahui ekspresi gen *P5CS* pada tebu PRG dilakukan pengujian kandungan *proline*. Hasil analisis kandungan prolin menunjukkan variasi yang cukup tinggi antara tebu PRG dan tebu non PRG (Fitranty *et al.* 2003).

Penelitian perakitan tebu PRG toleran kekeringan juga dilakukan oleh peneliti lain menggunakan gen *betA* (Murdyatomo 2003). Gen *betA* yang diisolasi dari tanaman bit gula telah ditransformasikan ke genom tanaman tebu melalui vektor *A. tumefaciens* (Murdyatmo 2003). Tebu PRG ditujukan untuk toleran kekeringan. Tebu PRG tersebut telah diuji di laboratorium dan rumah kaca PTPN XI dan menunjukkan toleransi terhadap kekeringan (Murdyatmo 2004). Lapangan uji terbatas tebu PRG toleran kekeringan telah dilakukan oleh PTPN XI pada tahun 2005 dan 2007 di kebun percobaan PNTPN XI Jatiroto (Gambar 5A, 5B), Jawa Timur dan dipantau oleh TTKHKP (Gambar 5C, 5D) (TTKHKP 2005, 2007b).

Padi PRG

Gen toleran kekeringan lain adalah *homeodomain leucine zipper* (*HDZip*) yang diperoleh dari tanaman *Craterostigma plantagineum* (Deng *et al.* 2002). Gen *HDZip* (*Oshox4*) untuk respon toleran kekeringan juga diperoleh dari tanaman padi (Agalou *et al.* 2008).

Tim peneliti dari Puslit Bioteknologi LIPI melakukan perakitan padi PRG toleran kekeringan. Gen yang ditransformasikan ke padi varietas Rojolele dan IRAT 112 adalah *Hd-Zip* (*oshox*) dengan gen penanda higromisin (*hpt*) (Loedin *et al.* 2006). Berdasarkan analisis PCR menggunakan primer spesifik pada tanaman generasi pertama (T_0) diperoleh enam galur padi PRG varietas Rojolele yang mengandung gen target *oshox* (Loedin *et al.* 2006). Pada benih padi (T_1), hasil analisis ekspresi gen penanda *hpt* diperoleh 14 galur yang menunjukkan ekspresi gen dengan pola segregasi Mendel (3 : 1) (Loedin *et al.* 2006).

MODIFIKASI KUALITAS TANAMAN

Pendekatan teknologi *antisense* juga digunakan untuk menunda pemasakan buah pepaya dan menurunkan kandungan amilosa ubi kayu. Penelitian perakitan pepaya PRG dengan sifat penundaan pemasakan telah dilakukan di BB-Biogen. Pengujian untuk seleksi ubi kayu PRG amilosa rendah (yang dirakit di Wegeningen, Belanda) juga dilakukan di BB-Biogen.

Penundaan Pemasakan (PK)

Gen *antisense ACC oxidase* berhasil diklon dan dikontruski oleh Damayanti (2005). Gen tersebut ditransformasikan ke genom tanaman pepaya varietas Burung dengan penembakan partikel (Damayanti 2005). Pepaya PRG hasil transformasi dianalisis secara molekuler dengan PCR. Dari 25 galur tanaman hasil transformasi (T_0) menunjukkan empat galur positif PCR, yaitu TR6, TR9, TR20, dan TR24 dengan ukuran pita 800 bp dari gen *antisense ACC oxidase* (Damayanti 2005). Empat galur pepaya PRG (T_0) yang positif PCR ditumbuhkan di rumah kaca FUT BB-Biogen. Buah dari empat galur pepaya PRG tersebut dianalisis periode pemasakan buahnya. Hasil analisis menunjukkan satu galur pepaya PRG, yaitu TR9 masak lebih lama 5-6 hari dibandingkan dengan pepaya PRG galur TR6, TR20, dan TR24, maupun pepaya non PRG. Buah pepaya PRG galur TR9 masak dalam waktu 10



Gambar 5. Percobaan tebu PRG toleran kekeringan di lapangan uji terbatas dan pemantauan TTKHKP Kelompok Tanaman tahun 2005 (A dan C) dan tahun 2007 (B dan D) (TTKHKP 2005, 2007b).

hari pada ruangan ver-AC dan 8 hari pada suhu kamar, dibandingkan dengan masing-masing 4 hari dan 3 hari pada pepaya non PRG (Damayanti *et al.* 2007). Buah pepaya PRG dan non PRG dianalisis produksi *ethylen*-nya dan hasilnya menunjukkan bahwa produksi *ethylene* pada pepaya PRG galur TR9 lebih rendah dibandingkan dengan pepaya non PRG (Damayati *et al.* 2007). Pepaya PRG galur TR9 generasi ke-2 (T_1) ditumbuhkan bersama dengan pepaya PRG generasi ke-1 (T_0) di rumah kaca FUT BB-Biogen (Gambar 6). DNA tanaman pepaya PRG galur TR9 dari T_1 dianalisis dengan PCR dan hasilnya menunjukkan bahwa 75% positif masih mengandung gen *antisense ACC oxidase* berukuran 800bp (Damayati *et al.* 2007).

Kandungan Amilosa Rendah

Kegiatan perakitan tanaman PRG untuk menurunkan kandungan amilosa telah dilakukan pada gandum, kentang, ubi jalar, dan ubi kayu (Baga *et al.* 1999, Fulton *et al.* 2002, Kimura *et al.* 2004, Vetten 2004). Hampir semua perakitan tanaman PRG yang mengandung amilosa rendah menggunakan gen *granule-bound starch synthase* (GBSS). GBSS bertanggung jawab dalam sintesis komponen amilosa dalam pati, dan juga dapat berkontribusi dalam sintesis amilopektin (Shah *et al.* 1999).

Gen *antisense* GBSS oleh Kuipers *et al.* (1994) dengan promoter 35S ditransformasikan ke genom tanaman kentang melalui vektor *Agrobacterium*. Kentang PRG yang mengandung gen GBSS telah dievaluasi di lapangan uji terbatas (Kuipers *et al.* 1994). Kimura *et al.* (2004) mentransformasi tanaman ubi jalar dengan gen *full-length sense* cDNA untuk GBSSI ubi jalar dengan promoter CaMV 35S dengan mediasi vektor *A. tumefaciens*. Shah *et al.* (1999) melakukan transfer gen GBSS I cDNA yang berasal dari ubi kayu ke genom tanaman kentang.

Perakitan ubi kayu PRG yang mengandung amilosa rendah juga telah dilakukan oleh tim peneliti AVEBE di Wageningen, Belanda (Vetten 2004). Gen *inverted repeat cassava* GBSS *cDNA* ditransformasikan ke genom ubi kayu melalui vektor *Agrobacterium*. Ubi kayu PRG dengan gen GBSS menghasilkan puluhan klon dan *event* yang mengandung amilosa rendah (Vetten 2004). Vetten (2004) memperoleh 71 klon transforman, enam klon di antaranya kandungan amilosanya seperti non transgenik, yaitu di atas 20%. Selain itu 14 klon kandungan amilosanya sedang, yaitu antara 10-15%, 46 klon dengan kandungan amilosa rendah (3-10%), dan 5 klon bebas amilosa (*free amylose*), yaitu di bawah 3%. Untuk melihat perbedaan kandungan amilosa dalam pati antara ubi kayu PRG kandungan amilosa rendah dan tinggi dapat dilakukan pewarnaan (*staining*) dengan jodium. Pati yang berasal dari ubi kayu PRG kandungan amilosa rendah terlihat berwarna terang kecoklatan, sedangkan yang amilosa tinggi berwarna biru kehitaman (Gambar 7).

Selain GBSS, gen *starch branching enzyme* I (SBEI) dan *starch synthase* (SS) digunakan untuk perakitan tanaman PRG dengan kandungan amilosa rendah. Penggunaan gen *antisense* SBEI dalam transformasi tanaman gandum berhasil memperoleh gandum PRG dengan kandungan amilosa rendah (Baga *et al.* 1999). Kegiatan penelitian perakitan kentang PRG untuk merubah kandungan amilosa dalam pati juga dilakukan oleh Fulton *et al.* (2002), yang mentrasfer gen *antisense* GBSS dan SSIII/GBSS dengan promotor 35S ke genom kentang melalui mediasi *Agrobacterium*. Hasilnya menunjukkan bahwa kandungan amilosa dalam pati kentang PRG dengan gen GBSS dan SSIII/GBSS jauh lebih rendah dibandingkan dengan kentang non PRG.

Transformasi gen *inverted repeat cassava* GBSS *cDNA* dan gen *pat* dengan *A. tumefaciens* ke tanaman ubi kayu varietas Indonesia, yaitu Adhira 4 telah dilakukan oleh Tim peneliti dari AVEBE di Wageningen, Belanda (Vetten 2004). Ubi kayu PRG varietas Adhira 4 mengandung amilosa rendah (kurang dari 6%) dan TH (Vetten 2004). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memperoleh ubi kayu PRG dengan kandungan amilosa rendah



Gambar 6. Pepaya PRG dengan sifat penundaan pemasakan (*delay ripening*) di rumah kaca FUT, BB-Biogen, FUT = fasilitas uji terbatas (Damayanti *et al.* 2007).

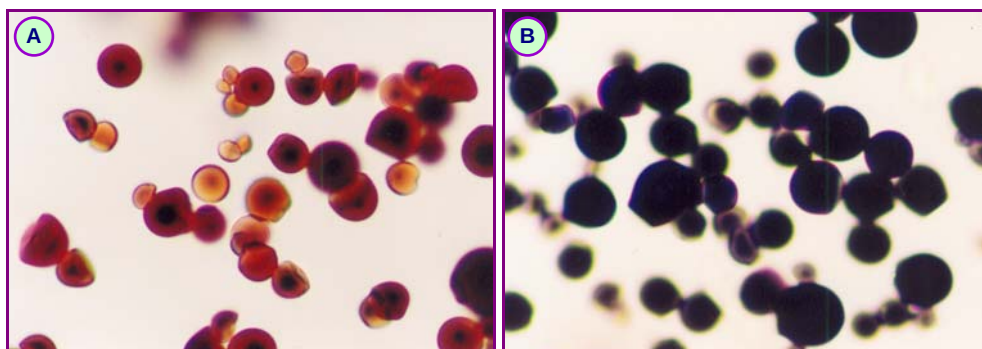
bahkan bebas amilosa (*free amylose*) yang kandungan amilosanya di bawah 2%. Sehubungan dengan itu, ubi kayu PRG telah diuji untuk seleksi di rumah kaca dan rumah kaca FUT, serta di LUT BB-Biogen dan Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI Cibinong (Gambar 8) (Herman *et al.* 2007b).

Tanaman Tanpa Biji (Partenokarpi)

Perakitan tanaman PRG tanpa biji (partenokarpi) dilakukan oleh Rotino *et al.* 1997 pada tanaman tembakau dan terong. Gen yang digunakan adalah *DefH9-iaaM*. Gen *iaaM* berasal dari *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*, sedangkan gen *DefH9* berasal dari *Anthriscum majus*. Gen *iaaM* mengkode sintesis *tryptophan monooxygenase* dan memproduksi *indolacetamide* yang kemudian merubah menjadi *auxin indole-3-acetic acid*, sedangkan *DefH9* mengatur daerah ekspresi gen khususnya di dalam *ovules* dan *placenta* (Rotino *et al.* 1997). Penelitian perakitan tanaman PRG tanpa biji juga berhasil dilakukan pada tomat (Ficcadenti *et al.* 1999, Pandolfini *et al.* 2002) dan *strawberry* (Mezzetti *et al.* 2002, 2004) dan *raspberry* (Mezzetti *et al.* 2004) yang juga mentransformasikan gen *DefH9-iaaM*.

Acciarri *et al.* (2002) merakit terong PRG partenokarpi juga dengan gen *DefH9-iaaM* melalui vektor *A. tumefaciens*. Berdasarkan hasil uji di rumah kaca dan LUT, terong PRG partenokarpi tersebut menunjukkan perbaikan produktivitas (Acciarri *et al.* 2002). Tomat partenokarpi hasil rekayasa genetik menggunakan gen *DefH9-iaaM* dengan vektor *A. tumefaciens* juga diuji ekspresinya di LUT oleh Rotino *et al.* (2005). Gen lain yang digunakan untuk menginduksi tanaman tomat partenokarpi adalah *rolB*. Gen *rolB* diperoleh dari *Agrobacterium rhizogenes* (Carmi *et al.* 2003). Gen tersebut dengan promotor spesifik buah muda *TPRP-F1* ditransformasikan ke tanaman tomat melalui *A. tumefaciens* (Carmi *et al.* 2003).

Perakitan tanaman PRG tanpa biji juga dilakukan oleh Purnamaningsih (2005) dari BB-Biogen, pada tanaman tomat. Gen *defH9-iaaM* dan *defH9-RI-iaaM* ditransformasikan ke



Gambar 7. Kandungan amilosa rendah pada ubi kayu PRG klon 1B-126E (A) dan amilosa tinggi pada ubi kayu non PRG (B) melalui pengecatan dengan jodium pada pati (Vetten 2007).



Gambar 8. Seleksi ubi kayu PRG amilosa rendah dan toleran herbisida di lapangan uji terbatas, BB-Biogen (A dan B) dan Puslit Bioteknologi LIPI Cibinong (D dan E) (Herman *et al.* 2007b).

genom tanaman tomat varietas Opal dan Ratna melalui mediasi vektor *A. tumefaciens* (Purnamaningsih 2005, Purnamaningsih *et al.* 2005). Penelitian tersebut telah menghasilkan benih generasi ke-4 (T_3). Tanaman dalam pengujian ekspresi gen di FUT, BB-Biogen.

Tanaman dengan Sifat Peningkatan Efisiensi Penggunaan Nitrogen

Tanaman PRG dengan sifat peningkatan efisiensi penggunaan nitrogen diharapkan dapat mengurangi penggunaan pupuk nitrogen. Gen yang digunakan dalam perakitan tanaman PRG dengan sifat efisiensi penggunaan nitrogen tersebut adalah *nitrite transporter* (*CsNitr1-L*). Gen tersebut berasal dari tanaman mentimun (*Cucumis sativa*). Gen *CsNitr1-L* ditransformasikan oleh peneliti BB-Biogen (Sustiprijatno 2006) ke genom tanaman padi varietas Nipponbare melalui vektor *A. tumefaciens*. Padi PRG yang mengandung *CsNitr1-L* tersebut disilangkan dengan padi varietas Ciherang, Jatiluhur, dan Mekongga di BB-Biogen. Hasil persilangan tersebut kemudian disilangbalikkan. Tanaman PRG tersebut saat ini pada status BC4. Gen *CsNitr1-L* juga ditransformasikan ke tanaman jagung melalui mediasi *A. tumefaciens* dan penembakan partikel.

DAFTAR PUSTAKA

- Acciarri, N., F. Restaino, G. Vitelli, D. Perrone, M. Zottini, T. Pandolfini, A. Spena, and G.L. Rotino. 2002. Genetically modified parthenocarpic eggplants: Improved fruit productivity under both greenhouse and open field cultivation. *BMC Biotechnology* 2:4.
- Agalou, A., S. Purwantomo, E. Övernäs, H. Johannesson, X. Zhu, A. Estiati, R.J. de Kam, P. Engström, I.H. Slamet-Loedin, Z. Zhu, M. Wang, L. Xiong, A.H. Meijer, and P.B.F. Ouwerkerk. 2008. A genome-wide survey of HD-Zip genes in rice and analysis of drought-responsive family members. *Plant Mol. Biol.* 66(1-2):87-103.
- Ambarwati, A.D., I. Hanarida, A. Apriana, T.J. Santoso, I.S. Dewi, A. Sisharmini, dan I M. Samudra. 2004. Perakitan tanaman padi transgenik untuk ketahanan terhadap hama penggerek batang. Kumpulan Makalah Seminar Hasil Penelitian BB-Biogen tahun 2004.
- Apriana, A.A. 2008. Over-ekspresi gen OsWRKY76 untuk ketahanan terhadap cendawan blas (*Pyricularia grisea* Sacc.) pada padi. Tesis Magister Sains. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Wiendi, N.M.A. 2005. Konstruksi fusi transkripsi gen kitinase asal *Aeromonas caviae* WS7b dan ekspresinya pada tanaman kentang kultivar Desiree. Disertasi Doktor. Institut Pertanian Bogor.
- Baga, M., A. Repellin, T. Demeke, K. Caswell, N. Leung, R.N. Chibbar, El-Sayed Abdel-Aal, and P. Hucl. 1999. Wheat starch modification through biotechnology. *Starch* 51(4):111-116.
- Bahagiawati dan M. Herman. 2008. Peraturan perundang-undangan tentang keamanan produk bioteknologi dan status perakitan tanaman produk bioteknologi di Indonesia. Booklet Kerjasama Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian dengan Michigan State University dan Program Biosafety System. 14 hlm.
- Bahagiawati, E.M. Lakollo, Supriyati, dan Sutrisno. 2006. Estimasi biaya penelitian transgenik dan biaya regulasi untuk persetujuan pelepasan komrsil di Indonesia. Laporan Akhir Penelitian Kerjasama dengan *Program for Biosafety System*. Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian. 32 hlm.
- Blanco, J.M., M.G. Koen, M. van der Drift, P.E. Olsson, J.E. Thomas-Oates, L.C. van Loon, A.H. Peter, and A.H.M. Bakker. 2001. Analysis of the *pmsCEAB* gene cluster involved in biosynthesis of salicylic acid and the Siderophore Pseudomonine in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS374. *J. Bacteriol.* 183(6):1909-1920.
- Brogli, R., K. Brogli, D. Roby, and I. Chet. 1993. Production of transgenic plants with enhanced resistance to microbial pathogens. In Kung, S.D. and R. Wu (Eds.). *Transgenic Plants. Engineering and Utilization* 1:265-276.
- Carmi, N., Y. Salts, B. Dedicova, S. Shabtai, and R. Barg. 2003. Induction of parthenocarpy in tomato via specific expression of the *rolB* gene in the ovary. *Planta* 217(5):726-735.
- Damayanti, D. 2005. Introduksi gen *antisense* ACC oksidase untuk menunda kemasakan buah pepaya (*Carica papaya* L.) melalui penembakan partikel. Tesis Magister Sains. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Damayanti, D., E. Listanto, I. Mariska, A.D. Ambarwati, and M. Herman. 2007. Technical and Coordination Meeting for the Papaya Biotechnology Network of Southeast Asia. Manila, 15-16 June 2007. ISAAA.

- Datta, K., Z. Koukoliková-Nicola, N. Baisakh, N. Oliva, and S.K. Datta. 2000.** *Agrobacterium*-mediated engineering for sheath blight resistance of indica rice cultivars from different ecosystems. *Theor. Appl. Genet.* 100:832-839.
- Deng, X., J. Phillips, A.H. Meijer, F. Salamini, and D. Bartels. 2002.** Characterization of five novel dehydration-responsive homeodomain leucine zipper genes from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Mol. Biol.* 49(6):601-610.
- Departemen Pertanian Republik Indonesia (Deptan). 1999.** Pengendalian Mosaik Mentimun pada cabai. *Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian* 21(4):1-3.
- Dewi, I.S., I.S. Hanarida, D. Damayanti, A. Apriana, dan T.J. Santoso. 2002.** Bioasai lanjutan tanaman putative transgenik padi *cryIA* generasi T1, T2, dan T3. Laporan Hasil Penelitian Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian Tahun 2002.
- Duriat A.S. 1996.** Management of pepper viruses in Indonesia: problem and progress. *IARD Journal.* 18(3):45-50.
- Estiati, A., S. Rahmawati, dan S. Purwantomo. 2006.** Aplikasi teknologi DNA untuk peningkatan ketahanan terhadap hama penggerek padi. <http://www.biotech.lipi.go.id/index.php?option=content&task=view&id=46&catid=56&Itemid=48>.
- Eulgem, T., P.J. Rushton, E. Schmelzer, K. Hahlbrock, and I.E. Somssich. 1999.** Early nuclear events in plant defence signalling: Rapid gene activation by WRKY transcription factors. *EMBO J.* 18(17):4689-4699.
- Ficcadenti, N., S. Sestili, T. Pandolfini, C. Cirillo, G.L. Rotino, and A. Spena. 1999.** Genetic engineering of parthenocarpic fruit development in tomato. *Mol. Breed.* 5:463-470.
- Fitranty, N., F. Nurilmala, D. Santoso, dan H. Minarsih. 2003.** Efektivitas *Agrobacterium* mentransfer gen *P5CS* ke dalam kalus tebu klon PS 851. *Menara Perkebunan* 71(1):16-27.
- Fulton, D.C., A. Edwards, E. Pilling, H.L. Robinson, B. Fahy, R. Seale, L. Kato, A.M. Donald, P. Geigenberger, C. Martin, and A.M. Smith. 2002.** Role of granule-bound starch synthase in determination of amylopectin structure and starch granule morphology in potato. *J. Biol. Chem.* 277(13):10834-10841.
- Halterman, D.A., L.C. Kramer, and J. Jiang. 2008.** Performance of transgenic potato containing late blight resistance gene RB. *Plant Disease* 92(3): 339-343.
- Hanarida, I.S., A.D. Ambarwati, A. Apriana, I.S. Dewi, dan E. Listanto. 1998.** Perakitan tanaman padi transgenik tahan hama penggerek batang. Laporan Hasil Penelitian T.A. 1998/1999. Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan.
- Hanarida, I., A.D. Ambarwati, I.S. Dewi, A. Apriana, dan T.J. Santoso. 2002.** Transformasi padi Japonica (T309) dan Indica dengan gen *cryIA*. Laporan Hasil Penelitian Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian Tahun 2002.
- Hendrastuti, S.E.F. Tondok, dan K.K. Mutaqin. 1999.** Keragaman genetik virus-virus gemini di Indonesia: Kisaran inang dan karakter molekuler. Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat. Institut Pertanian Bogor.
- Hendrastuti, S.A. Duriat, T.J. Santoso, K. Kusumanegara, M. Herman, and E. Sofiari. 2006.** Annual report of Product Development of Multiple Virus Resistant (MVR) Tomato in Indonesia. USAID/ABSP II. Cornell University. Ithaca, NY. USA 2006.

- Hendrastuti, S.A. Duriat, T.J. Santoso, K. Kusumanegara, M. Herman, and E. Sofiari. 2007.** Annual report of Product Development of Multiple Virus Resistant (MVR) Tomato in Indonesia. USAID/ABSP II. Cornell University. Ithaca, NY. USA.
- Herman, M., E. Sofiari, E. Suryaningsih, A.D. Ambarwati, E. Listanto, S. Wijayanti, and H. Purwanti. 2006.** Annual report of Product Development of Late Blight Resistant (LBR) Potato in Indonesia. USAID/ABSP II. Cornell University. Ithaca, NY. USA.
- Herman, M., E. Sofiari, E. Suryaningsih, A.D. Ambarwati, E. Listanto, S. Wijayanti, and H. Purwanti. 2007a.** Annual report of product development of Late blight resistant (LBR) potato in Indonesia. USAID/ABSP II. Cornell University. Ithaca, NY. USA.
- Herman, M., E. Soedarmonowati, B. Santosa, Hani, and N. de Vetten. 2007b.** Report of confined field trial of transgenic Adhira 4 cassava free amylose and herbicide tolerance in Indonesia. Biosafety and Food Safety Technical Team Meeting. Bogor, 11 September 2007.
- Herman, M. 2008.** Perkembangan bioteknologi dan status regulasi di Indonesia. Media Workshop Manfaat Bioteknologi dalam Mengatasi Krisis Pangan. IndoBIC, CropLife, dan PBPI. Jakarta, 28 Agustus 2008.
- International Rice Research Institute (IRRI). 2006.** Penggerek batang. Informasi Ringkas Teknologi Padi. IRRI Rice Knowledge Bank (Masukan diperoleh dari G.Jahn). Disadur oleh: J. Bawolye MSyam-Des.2006. http://www.knowledgebank.irri.org/regionalsites/indonesia/PDF%20files/penggerek_BW.pdf
- Kardin, M.K. dan H.R. Hifni. 1993.** Penyakit hawar daun bakteri padi di Indonesia. Risalah Seminar Puslitbangtan, April 1992-Maret 1993. hlm. 85-99.
- Kimura, T.M. Otani, T. Noda, O. Ideta, T. Shimada, and A. Saito. 2004.** Absence of amylose in sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] following the introduction of granule-bound starch synthase I cDNA. Plant Cell Rep. 20(7):663-666.
- Kuhl, J.C., K. Zarka, J. Coombs, W.W. Kirk, and D.S. Douches. 2007.** Late blight resistance of RB transgenic potato lines. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 132(6):783-789.
- Kuipers, A.G., W.J. Soppe, E. Jacobsen, and R.G. Visser. 1994.** Field evaluation of transgenic potato plants expressing an antisense granule-bound starch synthase gene: Increase of the antisense effect during tuber growth. Plant Mol. Biol. 26(6):1759-1773.
- Lisnawita. 2007.** Identifikasi, kajian biologi, evaluasi ketahanan tanaman dan kisaran inang nematoda sista kentang (*Globodera* spp.) Indonesia. Disertasi Doktor. Institut Pertanian Bogor.
- Loedin, I.H.S., S. Nugroho, E.S. Mulyaningsih, A. Rachmat, E. Erdayani, S. Indrayani, dan C.F. Pantow. 2006.** Transformasi genetika untuk merakit varietas padi toleran pada kekeringan dan penyakit blas. <http://www.biotech.lipi.go.id/index.php?option=content&task=view&id=55&catid=56&Itemid=48>.
- Loedin, I.H.S. 2008.** Status perkembangan bioteknologi pangan di tingkat global. Media Workshop Manfaat Bioteknologi dalam Mengatasi Krisis Pangan. IndoBIC, CropLife, dan PBPI. Jakarta, 28 Agustus 2008.
- Logemann, J., G. Jach, H. Tommerup, J. Mundy, and J. Schell. 1992.** Expression of a barley ribosome-inactivating protein leads to increased fungal protection in transgenic tobacco plants. Biotechnology 10:305-308.

- Lusso, M., and J. Kuc. 1996.** The effect of sense and antisense expression of the *PR-N* gene for b-1,3-glucanase on disease resistance of tobacco to fungi and viruses. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 49:267-283.
- Machmud, M. dan Farida, 1995.** Isolasi dan identifikasi bakteri antagonis terhadap bakteri hawar daun padi (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*). *Dalam* Peningkatan Peranan Fitopatologi dalam Pengamanan Produksi dan Pelestarian Lingkungan. Risalah Kongres Nasional XII dan Seminar Ilmiah. Perhimpunan Fitopatologi Indonesia. Yogyakarta. hlm. 259-269.
- Malik, A., S. Wenuganen, A. Suwanto, and B. Tjahyono. 2003.** Cloning DNA sequence, and expression of *A. caviae* WS7b chitinase gene. *Mol. Biotechnol.* 23:1-8.
- Marwoto, E., Wahyuni, dan K.E. Neering. 1991.** Pengelolaan pestisida dalam pengendalian hama kedelai secara terpadu. Monograf Balittan Malang No. 7. Balai Penelitian Tanaman Pangan Malang.
- Mezzetti, B., L. Landi, L. Scortichini, A. Rebori, A. Spena, and T. Pandolfini. 2002.** Genetic engineering of parthenocarpic fruit development in strawberry. *Proc. 4th ISHS Strawberry symposium, Tampere (Finland) 9-14 July 2000. Acta Horti.* 567:101-104.
- Mezzetti, B., L. Landi, T. Pandolfini, and A. Spena. 2004.** The *defH9-iaaM* auxin-synthesizing gene increases plant fecundity and fruit production in strawberry and raspberry. *BMC Biotechnol.* 4:4.
- Mulya, K., Sutrisno, Budihardjo, D. Santoso, R. Saraswati, I.S. Loedin, Erizal, B.S. Wardhana, Suprahtomo, dan Sudarisman. 2003.** Status pengaturan dan keamanan pemanfaatan produk rekayasa genetik di Indonesia. Proyek *National Biosafety Framework* GEF-UNEP. Kementerian Negara Lingkungan Hidup.
- Murdyatmo, U. 2003.** The development of transgenic sugarcane tolerant to drought. The Workshop on Agricultural Assessment in Indonesia: The Role for Biotechnology. Novotel Coralia Bogor, Indonesia. August 4-5, 2003.
- Murdyatmo, U. 2004.** Permohonan pengkajian keamanan hayati tebu transgenik toleran kekeringan produk PTPN XII. Presentasi dalam sidang Tim Teknis Keamanan Hayati Kelompok Tanaman Mei 2004.
- Nurdin, F., F. Artati, dan Atman. 1995.** Hama penggerek polong kedelai (*Etiella* spp.), biologi, serangan dan pengendaliannya. *Buletin Teknik Sukarami* 8:9-18.
- Pandolfini, T., G.L. Rotino, S. Camerini, R. Defez, and A. Spena. 2002.** Optimisation of transgene action at the post-transcriptional level: high quality parthenocarpic fruits in industrial tomatoes. *BMC Biotechnol.* 2:1.
- Pardal, J.P. 2004.** Transformasi kedelai dengan gen proteinase inhibitor II melalui *Agrobacterium* dan penembakan partikel. Disertasi Doktor. Institut Pertanian Bogor.
- Pardal, J.P., G.A. Wattimena, H. Aswidinnoor, M. Herman, E. Listanto, dan Slamet. 2004.** Transfer gen proteinase inhibitor II pada kedelai melalui vector *Agrobacterium tumefaciens* untuk ketahanan terhadap hama penggerek polong (*Etiella zinckenella* Tr). *Jurnal Bioteknologi Pertanian* 9(1):20-28.
- Pardal, J.P., G.A. Wattimena, H. Aswidinnoor, dan M. Herman. 2005.** Transformasi genetik kedelai dengan gen *proteinase inhibitorII* menggunakan teknik penembakan partikel. *Jurnal Agrobiogen* 1(2):53-61.
- Purnamaningsih, R. 2005.** Introduksi gen *defH9-iaaM* dan *defH9-RI-iaaM* ke dalam genom tanaman tomat untuk meningkatkan potensi produksi tanaman tomat. Disertasi Doktor. Institut Pertanian Bogor.

- Purnamaningsih, R., I. Mariska, G.A. Wattimena, dan A. Purwito. 2005.** Transformasi genetik tanaman tomat menggunakan gen *defH9-iaaM* melalui vektor *Agrobacterium tumefaciens*. Proceeding Seminar Nasional Perhimpunan Bioteknologi Pertanian. Tantangan dan Peluang Pengembangan Bioteknologi Pertanian Menghadapi Era Globalisasi. Malang, 12-13 April 2005.
- Rotino, G.L., N. Acciarri, E. Sabatini, G. Mennella, R.L. Scalzo, A. Maestrelli, B. Molesini, T. Pandolfini, J. Scalzo, B. Mezzetti, and A. Spena. 2005.** Open field trial of genetically modified parthenocarpic tomato: Seedlessness and fruit quality. *BMC Biotechnol.* 5:32.
- Rotino, G.L., E. Perri, M. Zottini, H. Sommer, and A. Spena. 1997.** Genetic engineering of parthenocarpic plants. *Nature Biotechnol.* 15:1398-1401.
- Ryu, H.S., M. Han, S.K. Lee, J.I. Cho, N. Ryoo, S. Heu, Y.H. Lee, S.H. Bhoo, G.L. Wang, T.R. Hahn, and J.S. Jeon. 2006.** A comprehensive expression analysis of the *WRKY* gene superfamily in rice plants during defense response. *Plant Cell Rep.* 25(8) 836-847.
- Santoso, T.J. 2005.** Report of ABSPII training on Initial Hybridization for Development of Indonesian Multiple Viruses Resistant Tomato in AVRDC December 1, 2004-February 28, 2005.
- Santoso, T.J. 2008.** Identifikasi begomovirus Indonesia dan analisis diversitas genetik gen *AV1* serta pemanfaatannya untuk pengembangan tanaman tahan virus. Disertasi Doktor. Institut Pertanian Bogor.
- Santoso, T.J., I. Hanarida, A.D. Ambarwati, A. Apriana, dan I.S. Dewi. 2002.** Analisis molekuler lanjutan tanaman putatif transgenik padi gen *cryIA* generasi T1 dan T2. Laporan Hasil Penelitian Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian Tahun 2002.
- Semangun, H. 1991.** Penyakit-penyakit Tanaman Pangan Penting di Indonesia. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Shah, J. 2003.** The salicylic acid loop in plant defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6(4):365-371.
- Shah, N.I., M. Salehuzzaman, J.P. Vincken, M. Van de Wal, I.S. Engelen, E. Jacobsen, and R.G.R. Fisher. 1999.** Expression of a cassava granule-bound starch synthase gene in the amylose-free potato only partially restores amylose content. *Plant Cell Environ.* 22:1311-1318.
- Sinaga A., Budiman, M. Susi, Sukmaya, S. Djoko, R.D. Mei, S. Sudjoko, dan D. Ahmad. 1997.** Budidaya tanaman kentang. Balai Pengkajian Teknologi Pertanian. 57 hlm.
- Song, J., J.M. Bradeen, S.K. Naess, J.A. Raasch, S.W. Wielgus, Haberlach, J.T. Liu J., S. Kuang, S. Austin-Phillips, Buell, J.M. Helgeson, and J. Jiang. 2003.** Gene *RB* cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:9128-9133.
- Sudiono, S.H. Hidayat, R. Suseno, dan S. Sosromarsono. 2001.** Deteksi molekuler dan uji kisaran inang virus gemini asal tomat. *Dalam* Prosiding Seminar Ilmiah dan Kongres Nasional XVI Perhimpunan Fitopatologi Indonesia. Bogor, 22-24 Agustus 2001. hlm. 208-217.
- Sustiprijatno, M. Sugiura, K. Ogawa, and M. Takahashi. 2006.** Improvement of nitrate- and nitrite-dependent growth of rice by the introduction of a constitutively expressing chloroplastic nitrite transporter. *Plant Biotechnol.* 23(1):47-54.
- Tim Teknis Keamanan Hayati dan Keamanan Pangan (TTKHKP). 2005.** Monitoring lapangan uji terbatas tebu transgenik toleran kekeringan produk PTPN XI di Kebun Percobaan PG Jatiroto, Jawa Timur pada 25-26 Mei 2005. Laporan TTKHKP Kelompok Tanaman.

- Tim Teknis Keamanan Hayati dan Keamanan Pangan (TTKHKP). 2007a.** Monitoring lapangan uji terbatas kentang transgenik tahan *Phytophthora infestans* produk *University of Wisconsin*, Amerika Serikat di Kebun Percobaan Balai Penelitian Tanaman Sayuran, Lembang pada 21 Februari 2007. Laporan TTKHKP Kelompok Tanaman.
- Tim Teknis Keamanan Hayati dan Keamanan Pangan (TTKHKP). 2007b.** Monitoring lapangan uji terbatas tebu transgenik toleran kekeringan produk PTPN XI di Kebun Percobaan PG Jatiroto, Jawa Timur pada 27 Juni 2007. Laporan TTKHKP Kelompok Tanaman.
- Trisusilowati, E.B. 1989.** Studi sifat virus penyebab penyakit krupuk pada tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum* L). Disertasi. Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 109 hlm.
- Trisusilowati, E.B., R. Suseno, S. Sosromarsono, Barizi, Soedarmadi, and M.A. Nur. 1990.** Transmissions, serological aspects and morphology of the tobacco krupuk virus. *Indon. J. Trop. Agric.* 1(2):19
- Ulker, B. and I.E. Somssich. 2004.** WRKY transcription factors: From DNA binding towards biological function. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7(5):491-8.
- USAID. 2004.** ABSPII work plan for the development of transgenic late blight-resistant potato for India, Bangladesh and Indonesia.
- Verberne, M.C., R. Verpoorte, J.F. Bol, J. Mercado-Blanco, and H.J.M. Linthorst. 2000.** Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. *Nat. Biotechnol.* 18:779-783.
- Vetten, Nick de. 2004.** Permohonan pengujian ubi kayu transgenik amilosa rendah dan toleran herbisida produk AVEBE Cooperative Co. Belanda. Presentasi dalam sidang Tim Teknis Keamanan Hayati dan Keamanan Pangan Kelompok Tanaman Desember 2004.
- Vetten, Nick de. 2007.** Laporan pengujian ubi kayu transgenik amilosa rendah dan toleran herbisida produk AVEBE Cooperative Co. Belanda di Lapangan Uji Terbatas di BB Biogen dan Puslit Bioteknologi LIPI. Presentasi dalam sidang Tim Teknis Keamanan Hayati dan Keamanan Pangan Kelompok Tanaman Oktober 2007.
- Zhang. Y. and L. Wang. 2005.** The WRKY transcription factor superfamily: its origin in eukaryotes and expansion in plants. *BMC Evolutionary Biology* 5(1):1.