

Induksi dan Regenerasi Kalus Jagung yang Ditransformasi dengan Gen *CsNitr1-L* melalui Penembakan Partikel (Callus Induction and Regeneration of Maize Transformed with *CsNitr1-L* Gene through Particle Bombardment)

A. Dinar Ambarwati*, Edy Listanto, Slamet, Umar, Sustiprijatno, dan Sutoro

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111 Indonesia
Telp. (0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820; *E-mail: dinarambarwati@yahoo.com

Diajukan: 18 Desember 2014; Direvisi: 16 Januari 2015; Diterima: 30 Maret 2015

ABSTRACT

The success in development of transgenic plants is influenced by the regeneration system. The objective of the study was to assess the response of maize genotypes to regeneration system of organogenesis and embryogenesis, after transformed with *CsNitr1-L* gene through particle bombardment. Induction and callus regeneration of maize immature embryos of inbred lines Ult:cm.1#, ARC 178-123-112-XB3, and AZ2 were conducted through organogenesis, whereas those inbred lines AZ1, AZ2, P4G19(S)C2.59.3.3.1.3 and P4S3.29.4.4.1 were conducted through embryogenesis somatic. Transformation of *CsNitr1-L* gene was done with the distance of bombardment of 7 cm and 9 cm and calli were then selected using 10 mg/l hygromycin. All explants (100%) of inbred lines Ult:cm.1# formed organogenic callus, while callus formation of ARC 178-123-112-XB3 was 94.3% and AZ2 was 60.5%. Ult:cm.1# was the most responsive line to the regeneration of organogenesis and produced 24 green shoots, compared with ARC 178-123-112-XB3 which produced one green shoot and AZ2 that did not produce green shoots. The highest percentage of embryogenic calli formed through somatic embryogenesis was obtained on inbred lines AZ1 (85.4%) and the lowest was on P4S3.29.4.4.1 (18.9%). Inbred lines AZ1 had the highest percentage of regeneration (50.7%) and produced 62 plants, followed by P4G19(S)C2.59.3.3.1.3 that produced 17 plants (2.8%) and P4S3.29.4.4.1 which produced two plants. Preliminary identification on 31 putative transgenic plants through PCR analysis produced 22 plants (70.96%) that contained *nptII* gene.

Keywords: *Zea mays*, organogenesis, somatic embryogenesis, transformant identification.

ABSTRAK

Keberhasilan perakitan tanaman transgenik dipengaruhi oleh proses regenerasi. Tujuan penelitian adalah mengetahui respons genotipe jagung terhadap sistem regenerasi organogenesis dan embriogenesis somatik setelah ditransformasi dengan gen *CsNitr1-L* melalui penembakan partikel. Induksi dan regenerasi kalus dari eksplan embrio muda jagung galur inbred Ult:cm.1#, ARC 178-123-112-XB3, dan AZ2 dilakukan secara organogenesis, sedangkan galur inbred AZ1, AZ2, P4G19(S)C2.59.3.3.1.3, dan P4S3.29.4.4.1 secara embriogenesis somatik. Transformasi gen *CsNitr1-L* dilakukan dengan jarak penembakan 7 cm dan 9 cm, kemudian kalus diseleksi dengan higromisin 10 mg/l. Semua (100%) eksplan galur Ult:cm.1# dapat membentuk kalus organogenik, sedangkan galur ARC 178-123-112-XB3 dan AZ2 masing-masing dapat membentuk kalus sebesar 94,3% dan 60,5%. Galur Ult:cm.1# paling responsif terhadap regenerasi secara organogenesis dan menghasilkan 24 tunas hijau dibanding dengan ARC 178-123-112-XB3 yang menghasilkan satu tunas hijau dan AZ2 yang tidak menghasilkan tunas hijau. Persentase terbentuknya kalus embriogenik yang tertinggi diperoleh pada galur AZ1 (85,4%) dan paling rendah pada galur P4S3.29.4.4.1 (18,9%). Galur AZ1 mempunyai daya regenerasi yang tertinggi (50,7%) dan menghasilkan 62 tanaman, diikuti galur P4G19(S)C2.59.3.3.1.3 yang menghasilkan 17 tanaman (2,8%) dan galur P4S3.29.4.4.1 yang menghasilkan dua tanaman. Identifikasi awal 31 tanaman transgenik putatif secara PCR menghasilkan 22 tanaman (70,96%) yang positif mengandung gen *nptII*.

Kata kunci: Jagung (*Zea mays*), organogenesis, embriogenesis somatik, identifikasi transforman.

PENDAHULUAN

Salah satu kendala dalam pemupukan tanaman jagung adalah kurang efisiennya penyerapan unsur nitrogen (N). Kehilangan pupuk N di lapang sebesar 50–70% yang dapat disebabkan oleh penguapan, nitrifikasi/denitrifikasi, dan pencucian. Melalui proses nitrifikasi/denitrifikasi, terjadi perubahan bentuk N-amonium menjadi N-nitrat dan N-nitrit yang tidak mudah diserap oleh tanaman jagung dan dapat terbuang melalui proses pencucian. Selain itu, akumulasi N-nitrat di dalam tanah dapat menyebabkan terbentuknya gas rumah kaca, seperti N_2O dan CH_4 (Sugiura *et al.*, 2007).

Cara yang dapat dilakukan untuk meningkatkan efisiensi pemupukan N adalah memanfaatkan gen transporter nitrit yang diisolasi dari *Cucumis sativus*, yaitu gen *cucumber nitrite transporter* (*CsNitr1-L*). Gen tersebut mampu memindahkan nitrit secara cepat dari sitoplasma ke dalam kloroplas. Hal ini menyebabkan terbentuknya amonium secara cepat oleh enzim *nitrite reductase* yang terdapat di dalam membran kloroplas (Shingles *et al.*, 1996). Amonium yang dihasilkan digunakan dalam pembentukan asam amino untuk pertumbuhan tanaman. Tingkat asimilasi nitrat yang cepat melalui percepatan proses transpor nitrit dari sitoplasma ke dalam kloroplas menyebabkan tanaman jagung yang umumnya menyerap amonium dapat juga menyerap sumber nitrat dengan efisien (Crawford, 1995; Crawford dan Glass, 1998).

Selain itu, adanya penambahan hara N yang sebelumnya tidak dapat diserap dapat meningkatkan hasil. Penelitian Sustiprijatno *et al.* (2006) menunjukkan bahwa tanaman padi yang ditransformasi dengan gen *CsNitr1-L* mengindikasikan adanya penurunan konsentrasi nitrit pada daun tanaman padi transgenik dibanding dengan padi nontransgenik yang keduanya diberi hara sumber N-nitrat.

Teknik rekayasa genetika melalui penembakan partikel pada tanaman jagung sudah dilaporkan oleh beberapa peneliti (Klein *et al.*, 1989; Petrillo *et al.*, 2008; Shou *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006) dan merupakan teknik yang efisien untuk menghasilkan tanaman transgenik jagung. Abdel-Rhman (2015) melakukan transformasi embrio muda jagung dengan gen *anthranilate synthase* (*ASA2*) yang berasal dari tembakau melalui penembakan partikel. Transformasi menghasilkan tanaman jagung yang positif mengandung gen *ASA2*. Keberhasilan proses transformasi tanaman sangat dipengaruhi oleh kemampuan atau daya regenerasi tanaman yang ditransformasi. Regenerasi tanaman jagung dapat dilakukan baik secara organogenesis (Danson *et al.*, 2006; Rakshit *et al.*, 2010) maupun embriogenesis somatik (Ombori *et al.*,

2008). Jalur embriogenesis somatik memiliki beberapa tahapan proses perkembangan, yaitu pembentukan kalus, pembentukan embrio somatik, tahap pendewasaan, dan perkecambahan, sedangkan jalur organogenesis diawali dengan pembentukan organ secara langsung maupun tidak langsung yang melalui tahapan kalus. Bedada *et al.* (2012) menggunakan galur-galur inbred jagung tropis, yaitu CML395, CML443, CML442, MAS [MSR/312]-117-2-2-1-B-5-B), dan CML216. Embrio zigotik muda sebagai eksplan dikulturkan pada media MS dengan berbagai konsentrasi 2,4-D. Induksi kalus dan frekuensi kalus embriogenik paling tinggi diperoleh pada konsentrasi 2,4-D 1 mg/l. Keberhasilan induksi dan regenerasi kalus dipengaruhi oleh konsentrasi 2,4-D dan genotipe.

Pada jagung tropis dan subtropis, respons regenerasi sangat dipengaruhi oleh genotipe (Bohorova *et al.*, 1995; Huang dan Wei, 2004). Embrio muda merupakan eksplan yang paling responsif untuk transformasi jagung karena banyak mengandung sel-sel yang aktif membelah (Ahmadabadi *et al.*, 2007) dibanding dengan embrio masak (Huang dan Wei, 2004) atau biji (Al-Abed *et al.*, 2006). Penelitian transformasi tanaman jagung dengan gen *CsNitr1-L* pernah dilakukan pada tahun 2010, namun tanaman belum berhasil didapatkan karena tunas hijau hasil regenerasi secara organogenesis tidak dapat membentuk akar (Sutoro *et al.*, 2010). Tujuan penelitian ini adalah mengetahui respons genotipe jagung terhadap sistem regenerasi organogenesis dan embriogenesis somatik setelah ditransformasi dengan gen *CsNitr1-L* melalui penembakan partikel.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler dan Instalasi Penelitian Cikeumeh, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (BB Biogen), Bogor pada tahun 2010–2011. Penelitian awal (2010) dilakukan melalui organogenesis untuk galur Ult:cm.1#, ARC 178-123-112-XB3, dan AZ2 yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Serealia (Balitsereal), Maros, Sulawesi Selatan. Untuk penelitian embriogenesis somatik digunakan galur inbred hasil penelitian di lapang tahun 2011 yang dapat beradaptasi pada pemupukan N rendah dan berumur genjah, yaitu P4G19(S)C2.59.3.3.1.3 dan P4S3.29.4.4.1 (Sutoro *et al.*, 2011), galur AZ1 serta AZ2.

Komposisi media yang digunakan dicantumkan pada Tabel 1. Kegiatan penelitian terdiri atas penyiapan eksplan untuk transformasi, transformasi gen *CsNitr1-L* dengan penembakan partikel, induksi kalus, regenerasi, dan perakaran serta verifikasi awal integrasi gen melalui analisis molekuler.

Tabel 1. Media induksi dan regenerasi kalus jagung.

Media	Organogenesis (Danson <i>et al.</i> , 2006; Rakshit <i>et al.</i> , 2010)	Embriogenesis (Ombori <i>et al.</i> , 2008)
Osmotikum	MS + sukrosa 20 g/l + maltosa 120 g/l	MS + sorbitol 36,4 g/l + manitol 36,4 g/l
Induksi kalus	N6 + L-prolin 2,3 g/l + kasein hidrolisat 0,2 g/l + dikamba 2 mg/l + sukrosa 30 g/l + fitagel 3 g/l	N6 + kasein hidrolisat 0,1 g/l + prolin 2,875 g/l + perak nitrat 0,01 g/l + sukrosa 30 g/l + fitagel 3 g/l + 2,4-D 2 mg/l
Pemeliharaan kalus	-	Media induksi kalus tanpa perak nitrat
Pendewasaan kalus embriogenik	-	N6 + sukrosa 60 g/l + NAA 1 mg/l + fitagel 3 g/l
Regenerasi kalus	MS + tiamin HCl 0,04 mg/l + L-asparagin 0,15 g/l + IAA 0,5 mg/l + BAP 1 mg/l + sukrosa 20 g/l + fitagel 3 g/l	MS + sukrosa 30 g/l + fitagel 3 g/l
Perakaran	MS + NAA 1 mg/l + sukrosa 20 g/l + fitagel 3 g/l	½ MS + IBA 0,8 mg/l + sukrosa 30 g/l

Penyiapan Eksplan untuk Transformasi

Galur-galur inbred jagung ditanam di lapang dengan jarak tanam 20 cm x 75 cm. Benih jagung ditanam satu biji per lubang. Pemeliharaan tanaman dilakukan sesuai dengan panduan budi daya jagung. Tongkol jagung dipanen pada umur 11–12 hari setelah *selfing* dan dikupas. Sterilisasi dilakukan dengan cara merendam tongkol dalam larutan pemutih komersial 50% (hipoklorit 5,25%) ditambah dengan 1 tetes Tween 20 selama 20 menit yang kemudian dibilas dengan air steril sebanyak 3 kali. Permukaan biji jagung dipotong kira-kira 1 mm dengan pisau skalpel dan embrio muda berukuran 1,5–2 mm diambil dengan menggunakan ujung spatula.

Transformasi Gen *CsNitr1-L* dengan Penembakan Partikel

Transformasi mengikuti metode Wright *et al.* (2001) dengan beberapa modifikasi. Transformasi menggunakan plasmid pIG121Hm-Cs yang mengandung T-DNA dengan gen *nptII* yang menyandi ketahanan terhadap antibiotik kanamisin, gen *CsNitr1-L*, dan gen *hpt* untuk ketahanan terhadap antibiotik higromisin.

Eksplan embrio muda jagung diletakkan dan diatur dalam formasi lingkaran di tengah-tengah cawan petri yang berisi media osmotikum, yaitu MS yang ditambah dengan sukrosa 20 g/l dan maltosa 120 g/l untuk regenerasi secara organogenesis dan media MS yang mengandung sorbitol 36,4 g/l dan manitol 36,4 g/l (Ombori *et al.*, 2008) untuk regenerasi secara embriogenesis somatik. Eksplan dibiarkan selama 4 jam dalam media osmotikum. Penembakan dilakukan berdasarkan jarak penembakan antara *rupture disks* dan *macrocarrier*, yaitu 7 cm dan 9 cm pada percobaan awal untuk galur Ult.cm.1# dan 9 cm untuk galur-galur lainnya. Eksplan yang sudah ditransformasi diinkubasi di dalam ruang gelap bersuhu $\pm 25^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam.

Induksi dan Regenerasi Kalus Organogenik

Eksplan yang sudah ditransformasi dan diinkubasi dalam media osmotikum dipindah ke media induksi kalus N6, baik dengan penambahan maupun tanpa higromisin. Eksplan dikulturkan pada media N6 yang ditambah dengan L-prolin 2,3 g/l, kasein hidrolisat 0,2 g/l, dikamba 2 mg/l, sukrosa 30 g/l, dan fitagel 3 g/l (Tabel 1) kemudian diinkubasi di ruang gelap pada suhu $\pm 25^{\circ}\text{C}$ selama 2 minggu untuk membentuk kalus primer. Kalus yang terbentuk dipindah ke media regenerasi MS yang ditambah dengan tiamin HCl 0,04 g/l, L-asparagin 0,15 g/l, IAA 0,5 mg/l, BAP 1 mg/l, sukrosa 20 g/l, dan fitagel 3 g/l. Kultur diinkubasi di ruang terang dengan fotoperiodisitas 16 jam dan suhu 25°C . Tunas hijau yang terbentuk dipindah ke media perakaran MS yang ditambah dengan NAA 1 mg/l, sukrosa 20 g/l, dan fitagel 3 g/l. Peubah yang diamati adalah jumlah eksplan yang dapat membentuk kalus pada media induksi, persentase kalus berdasarkan jumlah eksplan, dan jumlah kalus yang membentuk spot hijau atau tunas hijau.

Induksi dan Regenerasi Kalus Embriogenik

Setelah ditransformasi, eksplan dikulturkan pada media induksi kalus N6 yang ditambah dengan kasein hidrolisat 0,1 g/l, prolin 2,875 g/l, perak nitrat 0,01 g/l, sukrosa 30 g/l, fitagel 3 g/l, dan 2,4-D 2 mg/l (Tabel 1). Kultur diinkubasi di ruang gelap pada suhu $\pm 25^{\circ}\text{C}$ selama dua minggu. Kalus disubkultur setiap dua minggu ke media pemeliharaan kalus, yaitu media induksi kalus tetapi tanpa penambahan perak nitrat. Kalus embriogenik yang terbentuk dipindah ke media pendewasaan embrio, yaitu N6 yang ditambah dengan sukrosa 60 g/l, NAA 1 mg/l, dan fitagel 3 g/l, selanjutnya dipindah ke media perkecambahan MS yang ditambah dengan sukrosa 30 g/l dan fitagel 3 g/l. Kultur diinkubasi di ruang terang dengan fotoperiodisitas 16 jam dan suhu 25°C . Tunas hijau yang terbentuk dipindah ke media perakaran ½ MS yang ditambah dengan IBA 0,8 mg/l dan sukrosa 30 g/l. Peubah yang diamati adalah jumlah eksplan yang dapat membentuk kalus, jumlah kalus embriogenik, jumlah kalus

dengan embrio somatik hijau, jumlah planlet, dan jumlah tanaman transgenik putatif.

Aklimatisasi

Tanaman transgenik putatif diaklimatisasi dalam tabung reaksi yang berisi akuades kemudian dipindah ke dalam bak semai yang berisi media campuran tanah dan pupuk kandang. Tanaman dengan akar yang kuat dipindah ke dalam pot dengan diameter 30 cm yang berisi campuran tanah dan pupuk kandang dan dipelihara di rumah kaca.

Identifikasi Awal Integrasi Gen melalui Analisis PCR

DNA tanaman transforman diisolasi dari daun tanaman yang telah diaklimatisasi di rumah kaca. Isolasi DNA dilakukan berdasarkan metode ICI Seeds yang dimodifikasi (Edwards *et al.*, 1991). Potongan daun berukuran 1 cm² digerus di dalam tabung 1,5 ml dengan bufer ekstraksi (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, dan SDS 0,5%) hingga homogen, kemudian ditambah dengan larutan *chloroform : isoamyl alcohol (chisam)* 24 : 1. Campuran kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Sebanyak 300 µl supernatan bagian atas dipindah ke dalam tabung 1,5 ml yang baru dan ditambah 250 µl isopropanol, kemudian tabung dibolak-balik beberapa kali dan dibiarkan di suhu ruang selama 10 menit. Sentrifugasi dilakukan pada kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit kemudian supernatan bagian atas dibuang. Endapan DNA dicuci dengan alkohol 70%, kemudian dikeringanginkan. DNA dilarutkan dengan H₂O dan siap digunakan untuk tahapan selanjutnya.

Analisis PCR dilakukan untuk gen *nptII* menggunakan primer spesifik, yaitu primer 1 *nptII*F 5'-GAGGCTATTCGGCTATGACTG-3' dan primer 2 *nptII*R 5'-ATCGGGAGCGGCGATACGTA-3' yang akan meng-

hasilkan fragmen DNA berukuran 700 bp (Anuradha *et al.*, 2006). Total volume 25 µl reaksi PCR yang mengandung bufer PCR 1×, MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs (dNTP masing-masing 0,2 mM), primer 1 dan 2 masing-masing 5 pmol, *Taq* DNA polimerase (Roche) 0,8 unit, dan DNA cetakan 100 ng. Reaksi amplifikasi PCR dilakukan dengan metode Wang *et al.* (1993) yang dimodifikasi dan dilakukan pada mesin PCR MJ Research PCT-100. Kondisi amplifikasi gen *nptII* diawali dengan denaturasi awal pada suhu 94°C selama 5 menit, dilanjutkan dengan 30 siklus reaksi yang terdiri atas tahap denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 53°C selama 1 menit, dan pemanjangan pada suhu 72°C selama 1 menit yang diakhiri dengan tahap pemanjangan pada suhu 72°C selama 5 menit. Sebanyak 15 µl hasil amplifikasi digunakan untuk elektroforesis pada gel agarosa 1,2% dan divisualisasi dengan ChemiDoc™. Plasmid pIG121Hm digunakan sebagai kontrol positif dan H₂O sebagai kontrol negatif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Induksi dan Regenerasi Kalus Organogenik

Semua (100%) eksplan embrio muda galur Ult:cm.1# dapat membentuk kalus, sedangkan galur ARC 178-123-112-XB3 dan galur AZ2 masing-masing dapat membentuk kalus sebesar 94,3% dan 60,5% (Tabel 2). Kalus yang terbentuk berasal dari sel-sel meristematik di dalam skutelum. Pada jarak penembakan 7 cm, dari 223 kalus organogenik yang tumbuh pada media tanpa higromisin, 36 kalus (16,1%) embriogenik dapat dipindah ke media regenerasi, dan dari 186 kalus yang tumbuh pada media seleksi higromisin 10 mg/l terdapat 15 (8,06%) kalus embriogenik yang dapat dipindah ke media regenerasi (Tabel 3). Namun, kalus tidak dapat tumbuh dan berubah

Tabel 2. Induksi kalus organogenik embrio muda jagung yang ditransformasi dengan gen *CsNtr1-L*, 30 hari setelah tanam.

Galur	Jarak penembakan	Jumlah eksplan	Jumlah/persentase kalus (media tanpa higromisin)	Jumlah/persentase kalus (media dengan higromisin 10 mg/l)
Ult:cm.1#	7 cm	409	223/54,52	186/45,48
	9 cm	1.738	858/49,37	880/50,63
ARC 178-123-112-XB3	9 cm	890	343/38,54	496/55,73
AZ2	9 cm	1.095	315/28,77	348/31,78

Media induksi kalus: N6 + L-prolin 2,3 g/l + kasein hidrolisat 0,2 g/l + dikamba 2 mg/l + sukrosa 30 g/l + fitagel 3 g/l pH 5,7.

Tabel 3. Regenerasi kalus organogenik jagung yang ditransformasi dengan gen *CsNtr1-L*, 72 hari setelah tanam.

Galur	Jarak penembakan	Tanpa higromisin	Higromisin 10 mg/l	Jumlah/persentase kalus dengan spot hijau	Jumlah/persentase kalus dengan tunas hijau
Ult:cm.1#	7 cm	36	15	-	-
	9 cm	284	243	80/15,18	24/30
ARC 178-123-112-XB3	9 cm	343	371	3/0,42	1/33,33
AZ2	9 cm	315	348	4/0,60	-

Media regenerasi: MS + tiamin HCl 0,04 g/l + L-asparagin 0,15 g/l + IAA 0,5 mg/l + BAP 1 mg/l + sukrosa 20 g/l + fitagel 3 g/l pH 5,7.

warnanya menjadi cokelat. Kalus yang bersifat nonembriogenik dengan tekstur lunak, berair, dan berwarna kuning juga dijumpai pada penelitian sebelumnya (Ombori *et al.*, 2008; Petrillo *et al.*, 2008). Pada jarak penembakan 7 cm, kalus yang ditransformasi tidak dapat menghasilkan tunas hijau dan tanaman. Oleh karena itu, pada transformasi selanjutnya digunakan jarak penembakan 9 cm.

Pada jarak penembakan 9 cm, 80 kalus dari galur Ult:cm.1# dapat membentuk spot hijau dan 24 kalus beregenerasi menjadi tunas hijau. Galur ARC 178-123-112-XB3 hanya menghasilkan 3 kalus dengan spot hijau dan 1 kalus beregenerasi menjadi tunas hijau, sedangkan pada galur AZ2 dari 4 kalus yang membentuk spot hijau tidak dapat beregenerasi menjadi tunas hijau. Di antara ketiga galur yang diuji, Ult:cm.1# paling responsif terhadap regenerasi secara organogenesis (Tabel 3).

Jumlah kalus yang dapat diregenerasikan, baik yang berasal dari kalus tanpa seleksi maupun dengan seleksi higromisin, semakin berkurang. Kalus yang tidak dapat bertahan pada media induksi dengan seleksi higromisin berubah warnanya menjadi cokelat dan tidak dapat tumbuh.

Akar muncul setelah $\pm 1,5$ bulan pada media perakaran. Pada saat muncul akar, tunas yang semula berwarna hijau sudah berubah menjadi putih sampai cokelat pucat. Setelah tiga bulan pada media perakaran, akar dapat tumbuh dengan baik, namun daun menjadi cokelat. Pertumbuhan akar sangat lama sehingga pada saat dilakukan aklimatisasi, daun sudah berwarna cokelat dan planlet tidak dapat bertahan hidup. Penelitian transformasi jagung dengan jarak

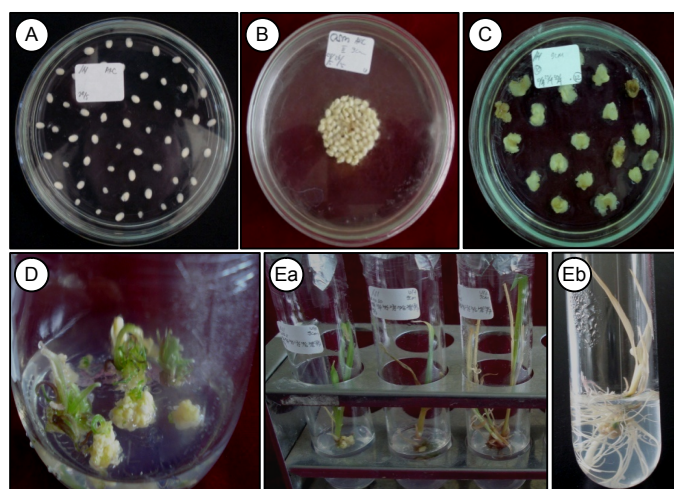
penembakan 9 cm telah dilakukan pada tahun 2010 dan menghasilkan tunas, namun tunas tidak dapat berakar pada media perakaran dengan IBA 1 mg/l (Sutoro *et al.*, 2010), sehingga penelitian pada tahun 2011 menggunakan media perakaran dengan NAA 1 mg/l.

Induksi dan regenerasi kalus jagung secara organogenesis pada penelitian ini tidak efektif dalam menghasilkan tanaman transgenik putatif. Oleh karena itu, perlu dicari metode alternatif, yaitu embriogenesis somatik. Penampilan proses transformasi yang dimulai dari penyiapan eksplan embrio muda jagung sampai perakaran disajikan pada Gambar 1.

Induksi dan Regenerasi Kalus Embriogenik

Eksplan yang sudah ditransformasi dan dipindah ke media osmotikum menunjukkan respons yang baik dan eksplan sedikit membengkak. Setelah ditransformasi, praperlakuan dengan osmotikum diperlukan untuk mengurangi atau memperkecil faktor kerusakan sel, membuat sel menjadi lebih elastis karena adanya plasmolisis dari sel-sel target yang bersifat reversibel (Vain *et al.*, 1993).

Galur P4G19(S)C2.59.3.3.1.3 dan P4S3.29.4.4.1 menghasilkan persentase kalus yang tinggi, sedangkan persentase paling rendah diperoleh dari galur AZ2 (Tabel 4). Tidak semua kalus yang dihasilkan bersifat embriogenik. Persentase pembentukan kalus embriogenik galur P4S3.29.4.4.1 adalah terendah (18,9%), sedangkan AZ1 menghasilkan persentase kalus embriogenik yang tertinggi (85,4%). Untuk meningkatkan frekuensi embriogenesis somatik jagung, perlu ditambahkan perak nitrat yang berfungsi sebagai inhibitor biosintesis etilen dan pada konsentrasi 10



Gambar 1. Induksi kalus dan regenerasi jagung galur Ult:cm.1# yang ditransformasi dengan gen *CsNtr1-L* melalui penembakan partikel. A = eksplan embrio muda jagung, B = eksplan embrio muda jagung pada media osmotikum, C = induksi kalus setelah 30 hari pada media dengan seleksi higromisin 10 mg/l, D = kalus yang beregenerasi membentuk spot dan tunas hijau, E = planlet 1,5 bulan dan F = 3 bulan setelah dipindah ke media perakaran.

mg/l secara nyata meningkatkan terbentuknya kalus embriogenik (Huang dan Wei, 2004). Rakshit *et al.* (2010) juga menggunakan perak nitrat untuk induksi kalus galur-galur inbred jagung di India.

Percobaan menggunakan media secara embriogenesis menghasilkan kalus yang bersifat embriogenik dan nonembriogenik. Kalus embriogenik berwarna krem dan remah (*friable*), sedangkan kalus nonembriogenik bertambah besar ukurannya dengan tekstur kompak dan warnanya menjadi cokelat. Menurut Ombori *et al.* (2008) dan Petrillo *et al.* (2008), ada dua tipe kalus embriogenik pada tanaman jagung, yaitu kalus embriogenik tipe I yang bertekstur kompak, berwarna putih sampai krem, dan tipe II yang bertekstur remah dengan warna sedikit kuning (Ombori *et al.*, 2008; Petrillo *et al.*, 2008). Variasi genotipe untuk membentuk kalus tipe I dan II kemungkinan disebabkan adanya efek gen-gen aditif yang secara positif meningkatkan respons kultur (Tomes dan Smith, 1985). Menurut Danson *et al.* (2006) dan Wang *et al.* (2006), kalus embriogenik tipe II dapat berdiferensiasi 2–3 minggu setelah subkultur dan pada permukaan kalus muncul spot atau embriosomatik yang berwarna hijau. Kalus tersebut menghasilkan tanaman lebih banyak dibanding dengan tipe I.

Pendewasaan kalus embriogenik pada media N6 dengan konsentrasi sukrosa tinggi (6%) dan penambahan NAA 1 mg/l menghasilkan embrio somatik bentuk hati (*heart-shaped*) yang kemudian dikulturkan pada media regenerasi. Hanya kalus embriogenik tipe II yang dapat menghasilkan embriosomatik berwarna hijau. Hal ini disebabkan adanya pengaturan gen-gen yang terkait dengan stres dan gen penyandi transporter diikuti oleh gen penyandi fotosintesis dan penyusun kloroplas lainnya (Che *et al.*, 2006).

Galur AZ1 menghasilkan daya regenerasi yang tertinggi (50,7%) dan galur P4S3.29.4.4.1 paling rendah (2,8%) (Tabel 5). Selama sembilan hari pada media perakaran, terbentuk planlet yang tegar. Sebanyak 62

planlet galur AZ1 berhasil diaklimatisasi di rumah kaca dan menghasilkan tanaman transgenik putatif, sedangkan galur AZ2 memiliki respons yang rendah terhadap perlakuan induksi embriogenesis somatik, seperti pada organogenesis (Tabel 5).

Media perakaran untuk embriogenesis kemudian juga dicoba untuk galur Ult:cm.1# yang sangat lama dalam respons pembentukan akar secara organogenesis dan dalam waktu 9–10 hari akar tumbuh dengan kuat. Untuk galur-galur inbred jagung tropis, Ombori *et al.* (2008) mendapatkan bahwa penggunaan IBA 0,8 mg/l memberikan hasil yang optimum untuk perakaran. Sementara itu, Rakshit *et al.* (2010) melaporkan bahwa penambahan NAA 2 mg/l pada media MS adalah paling baik untuk perakaran inbred jagung India.

Penampilan proses transformasi pada galur AZ1 yang dimulai dari penyiapan eksplan embrio muda jagung sampai perakaran secara embriogenesis disajikan pada Gambar 2. Pada penelitian ini, jalur embriogenesis somatik mampu menghasilkan tanaman yang lebih banyak daripada jalur organogenesis.

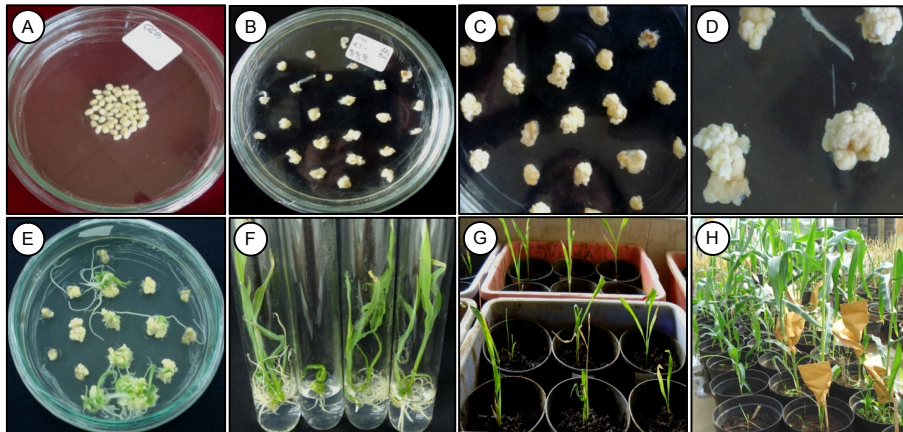
Wang *et al.* (2006) menyatakan bahwa keberhasilan transformasi jagung dipengaruhi oleh jenis genotipe yang digunakan (*genotype dependent*). Tujuh galur inbred memberikan respons yang berbeda. Galur inbred X333 dan X301 tidak dapat membentuk kalus embriogenik, sedangkan galur inbred yang lain tidak dapat beregenerasi membentuk tanaman. Demikian juga dengan Danson *et al.* (2006) yang mendapatkan bahwa faktor genotipe sangat menentukan dalam keberhasilan regenerasi jagung. Dari 22 galur yang diuji, dua galur memberikan respons yang tinggi dalam membentuk kalus embriogenik tipe II, 16 galur tidak dapat membentuk kalus embriogenik dan akhirnya mati, sedangkan empat galur dapat beregenerasi membentuk tanaman. Selain pembentukan kalus embriogenik dan regenerasi tanaman, genotipe memberikan respons yang ber-

Tabel 4. Induksi kalus embriogenik dari embrio muda jagung yang ditransformasi dengan gen *CsNtr1-L*.

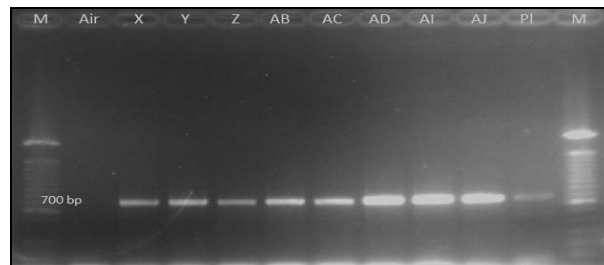
Galur	Jumlah eksplan	Jumlah/persentase kalus	Jumlah/persentase kalus embriogenik
AZ1	600	507/84,4	433/85,4
AZ2	675	450/66,7	339/75,3
P4G19(5)C2.59.3.3.1.3	420	418/99,5	309/73,9
P4S3.29.4.4.1	375	374/99,7	71/18,9

Tabel 5. Regenerasi kalus embriogenik jagung yang ditransformasi dengan gen *CsNtr1-L*.

Galur	Jumlah kalus yang membentuk embrio somatik	Jumlah/persentase kalus dengan embrio somatik hijau	Jumlah planlet	Jumlah tanaman transgenik putatif
AZ1	73	37/50,7	62	62
AZ2	338	45/13,3	-	-
P4G19(S)C2.59.3.3.1.3	307	45/14,7	38	17
P4S3.29.4.4.1	71	2/2,8	3	2



Gambar 2. Induksi dan regenerasi kalus jagung galur AZ1 yang ditransformasi dengan gen *CsNtr1-L* melalui penembakan partikel. A = eksplan embrio muda pada media osmotikum OS, B = kalus pada media induksi, C = kalus embriogenik pada media pemeliharaan kalus, D = embrio somatik pada media pendewasaan embrio, E = perkecambahan embrio somatik, F = planlet pada media perakaran, G, H = aklimatisasi tanaman transgenik putatif *CsNtr1-L* di rumah kaca.



Gambar 3. Hasil analisis PCR untuk gen *nptII* (700 bp). X–AJ = tanaman transforman, PI = plasmid, M = DNA ladder 100 bp.

beda terhadap induksi pembentukan akar (Ombori *et al.*, 2008). Ali *et al.* (2014) melakukan studi regenerasi pada empat galur unggul jagung menggunakan eksplan embrio muda dan embrio masak. Semua galur dapat membentuk kalus embriogenik dan beregenerasi menjadi tanaman. Frekuensi regenerasi eksplan embrio masak bervariasi 40–70%, sedangkan eksplan embrio muda memiliki tingkat keberhasilan yang lebih tinggi (55–80%).

Menurut Ikeda *et al.* (2006), terdapat gen-gen yang terkait dengan embriogenesis dalam membentuk embriosomatik pada beberapa tanaman yang mungkin menjadi penyebab perbedaan respons genotipe. Perbedaan respons genotipe mungkin berkaitan dengan tingkat variasi hormon-hormon endogen (Bhaskaran dan Smith, 1990). Menurut Guo *et al.* (2004), perbedaan respons genotipe untuk regenerasi kemungkinan disebabkan oleh elemen-elemen *transposable* DNA yang bertanggung jawab dalam mengatur gen di sekitar genom jagung yang berkontribusi terhadap perbedaan ekspresi gen.

Identifikasi awal tanaman transgenik putatif dilakukan terhadap 31 tanaman melalui analisis molekuler (PCR) untuk melihat integrasi gen *nptII*. Hasil analisis PCR menunjukkan 22 tanaman (70,96%)

positif mengandung gen *nptII* dengan menghasilkan pita berukuran 700 bp (Gambar 3). Untuk selanjutnya, perlu dilakukan verifikasi secara molekuler menggunakan gen target *CsNtr1-L*.

KESIMPULAN

Galur Ult:cm.1# paling responsif terhadap regenerasi secara organogenesis dan menghasilkan 24 tunas hijau, dibanding dengan ARC 178-123-112-XB3 yang menghasilkan satu tunas hijau dan AZ2 yang tidak menghasilkan tunas hijau. Galur AZ1 secara embriogenesis mempunyai daya regenerasi yang tertinggi (50,7%) dan menghasilkan 62 tanaman, diikuti galur P4G19(S)C2.59.3.3.1.3 yang menghasilkan 17 tanaman (2,8%) dan galur P4S3.29.4.4.1 yang menghasilkan dua tanaman. Identifikasi awal 31 tanaman transgenik putatif secara PCR menghasilkan 22 tanaman (70,96%) yang positif mengandung gen *nptII*.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Rhman, M.M. 2015. Improvement the production of maize (*Zea Mays* L.) crop by using particle bombardment. International Conference on Biological, Civil, and Environmental Engineering (BCIEE-2015). 3–4 February 2015. Bali, Indonesia. pp. 74–79.

- Ahmadabadi, M., S. Ruf, and R. Bock. 2007. A leaf based regeneration and transformation system for maize (*Zea mays* L.). *Transgenic Res.* 16:437–448.
- Al-Abed, D., S. Rudrabhatla, R. Talla, and S. Goldman. 2006. Split-seed: A new tool for maize researchers. *Planta* 223(6):1355–1360.
- Ali, F., M. Ahsan, N.A. Saeed, M. Ahmed, Q. Ali, N. Kanwal, M.M. Tehseen, U. Ijaz, I. Bibi, and N.K. Niazi. 2014. Establishment and optimization of callus-to-plant regeneration system using mature and immature embryos of maize (*Zea mays*). *Int. J. Agric. Biol.* 16(1):111–117.
- Anuradha, T.S., S.K. Jami, R.S. Satla, and P.B. Kirti. 2006. Genetic transformation of peanut (*Arachis hypogaea* L.) using cotyledonary node as explant and a promoterless *gus::nptII* fusion gene based vector. *J. Biosci.* 31(2):235–246.
- Bedada, L.T., S. Seth, S.M. Runo, W. Tefera, and M. Jesse. 2012. Regenerability of elite tropical maize (*Zea mays* L.) inbred lines using immature zygotic embryo explants. *Afr. J. Biotechnol.* 11(3):598–605.
- Bhaskaran, S. and R.H. Smith. 1990. Regeneration in cereal tissue culture. *Crop Sci.* 30:1328–1336.
- Bohorova, N.E., B. Luna, R.M. Brito, L.D. Huerta, and D.A. Hoisington. 1995. Regeneration potential of tropical, subtropical, midaltitude and highland maize inbreds. *Maydica* 40:275–281.
- Che, P., T.M. Love, B.R. Frame, K. Wang, A.L. Carriquiry, and S.H. Howell. 2006. Gene expression patterns during somatic embryo development and germination in maize Hi II callus cultures. *Plant Mol. Biol.* 62(1):1–14.
- Crawford, N.M. 1995. Nitrate: Nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell* 7:859–868.
- Crawford, N.M. and A.D.M. Glass. 1998. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends Plant Sci.* 3:389–395.
- Danson, J.W., M. Lagat, and M. Mbogori. 2006. Screening tropical maize lines for the production and regeneration of friable and embryogenic type II callus. *Afr. J. Biotechnol.* 5(23):2367–2370.
- Edwards, K., C. Johnstone, and C. Thompson. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res.* 19(6):1349.
- Guo, M., M.A. Rupe, C. Zinselmeier, J. Habben, B.A. Bowen, and O.S. Smith. 2004. Allelic variation of gene expression in maize hybrids. *Plant Cell* 16(7):1707–1716.
- Huang, X.Q. and Z.M. Wei. 2004. High-frequency plant regeneration through callus initiation from mature embryos of maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Rep.* 22:793–800.
- Ikeda, M., M. Umehara, and H. Kamanda. 2006. Embryogenesis-related genes. Its expression and roles during somatic and zygotic embryogenesis in carrot and *Arabidopsis*. *Plant Biotechnol.* 23(2):153–161.
- Klein, T.M., L. Kornstein, J.C. Stanford, and M.E. Fromm. 1989. Genetic transformation of maize cells by particle bombardment. *Plant Physiol.* 91:440–444.
- Ombori, O., N.M. Gitonga, and J. Machuka. 2008. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of tropical maize (*Zea mays* L.) inbred lines. *Biotechnol.* 7(2):224–232.
- Petrillo, C.P., N.P. Carneiro, A.A.C. Purcino, C.H.S. Carvalho, J.D. Alves, and A.A. Carneiro. 2008. Optimization of particle bombardment parameters for the genetic transformation of Brazilian maize inbred lines. *Pesq. Agropec. Bras.* 43(3):371–378.
- Rakshit, S., Z. Rashid, J.C. Sekhar, T. Fatma, and S. Dass. 2010. Callus induction and whole plant regeneration in the elite Indian maize (*Zea mays* L.) inbreds. *Plant Cell Tiss. Org.* 100:31–37.
- Shingles, R., M.H. Roh, and R.E. McCarty. 1996. Nitrite transport in chloroplast inner envelope vesicles (I. Direct measurement of proton-linked transport). *Plant Physiol.* 112:1375–1381.
- Shou, H., B.R. Frame, S.A. Whitham, and K. Wang. 2004. Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or *Agrobacterium*-mediated transformation. *Mol. Breed.* 13:201–208.
- Sugiura, M., M.N. Georgescu, and M. Takahashi. 2007. A nitrite transporter associated with nitrite uptake by higher plant chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 48(7):1022–1035.
- 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 Biotech.* 23:47–54.
- Sutoro, Sustiprijatno, Hadiatmi, D. Ambarwati, S.G. Budiarti, M. Setyowati, dan E. Listanto. 2010. Perakitan 30 hibrida jagung dan 5 tanaman transforman jagung regenerasi awal (Ro) untuk peningkatan efisiensi penggunaan pupuk N $\leq 50\%$, umur genjah ≤ 85 hari dan produktivitas 10 t/ha. Laporan Hasil Penelitian 2010. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya genetik Pertanian.
- Sutoro, D. Ambarwati, E. Listanto, S.G. Budiarti, Hadiatmi, M. Setyowati, Slamet, dan Sustiprijatno. 2011. Pembentukan lima galur jagung transgenik dan evaluasi 30 galur hibrida jagung efisien pupuk N produktivitas tinggi dan umur genjah < 85 hari. Laporan Hasil Penelitian 2011. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya genetik Pertanian.
- Tomes, D.T. and O.S. Smith. 1985. The effect of parental genotype on initiation of embryogenic callus from elite maize (*Zea mays* L.) germplasm. *Theor. Appl. Genet.* 70(5):505–509.
- Vain, P., M.D. Mc Mullen, and J.J. Finer. 1993. Osmotic treatment enhances particle bombardment of embryogenic pollen. *Plant Cell Rep.* 14:273–278.
- Wang, H., M. Qi, and A.J. Cutler. 1993. A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucleic Acid Res.* 21(17):4153–4154.
- Wang, D., Q. Zhao, D. Zhu, G. Ao, and J. Yu. 2006. Particle-bombardment-mediated co-transformation of maize with a lysine rich protein gene (*sb401*) from potato. *Euphytica* 150:75–85.
- Wright, M., J. Dawson, E. Dunder, J. Suttie, J. Reed, C. Kramer, Y. Chang, R. Novitzky, H. Wang, and L. Artim-Moore. 2001. Efficient biolistic transformation of maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) using the phosphomannose isomerase gene, *pmi*, as the selectable marker. *Plant Cell Rep.* 20:429–436.