

BULETIN *AgroBio*

ISSN 0853-9022

Vol. 6, No. 1, 2003

JURNAL TINJAUAN ILMIAH RISET BIOLOGI DAN BIOTEKNOLOGI PERTANIAN

Perkembangan Penelitian Bioteknologi Pertanian di Indonesia Novianti Sunarlim dan Sutrisno	1
Status Perkembangan Kapas Bt Muhammad Herman	8
Gen Penyeleksi Alternatif untuk Transformasi Tanaman Syamsidah Rahmawati	26
<i>In Vitro</i> Culture of Pineapple by Organogenesis and Somatic Embryogenesis: Its Utilization and Prospect Ika Roostika T. and Ika Mariska	34



Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian
Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian

Penerbit

Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya
Genetik Pertanian
Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian
Departemen Pertanian

Alamat Penerbit

Jalan Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111, Indonesia

E-mail: borif@indo.net.id

Telepon: (0251) 339793, 337975

Faksimile: (0251) 338820

Kala Terbit

Dua nomor per volume

Penanggung Jawab

Sutrisno
Kepala Balai Penelitian
Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian

Redaktur Teknis

Novianti Sunarlim
M. Machmud
Ida Hanarida Somantri

Redaktur Pelaksana

Faizal Abidin
Ida N. Orbani

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

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

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

Gen Penyeleksi Alternatif untuk Transformasi Tanaman

Syamsidah Rahmawati

Pusat Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi-LIP

ABSTRACT

Alternative Selectable Marker Gene for Plant Transformation. *Syamsidah Rahmawati.* At the moment, antibiotic and herbicide resistant genes are the most commonly used selectable markers for plant transformation. However, issues on allergenicity or toxicity, gene transfer and others, which were suspected to cause negative impact on human health and environment, have raised debate of using this selection system around the world. Many non government organizations world wide, including the Commission of the European Communities, discourage the use of the antibiotic selection system. Based on these reasons, it is important to find alternative selectable markers. In this paper, four alternative selection systems that are potentially safe and reported effective in plant transformation system were discussed. Two systems, the phosphomannose isomerase (PMI) and xylose isomerase (XylA), used mannose and xylose, respectively, as selective agents. Furthermore, enzyme xylose isomerase has been widely used in starch industry and certain food processing. MAT vector system was developed to produce selectable marker-free transgenic plants, while the green fluorescent protein (GFP) enable to select transformed tissues visually. These systems have been applied in various plant species.

Key words: Alternative selectable marker, selection system, plant transformation

Gen penyeleksi (*selectable marker*) sangat penting dalam kegiatan transformasi tanaman. Gen penyeleksi berguna untuk menyeleksi dan/atau membedakan sel, jaringan, organ atau tanaman yang tertransformasi. Berbagai gen penyeleksi telah dikenal sejak ditemukannya teknik transfer gen atau rekayasa genetika, namun hingga saat ini yang paling umum digunakan adalah gen ketahanan terhadap antibiotik dan herbisida. Berdasarkan survei yang dilakukan pada kongres dunia *in vitro biology* pada tahun 2000 menunjukkan bahwa 72% kegiatan penelitian transformasi tanaman yang dipresentasikan pada kongres tersebut menggunakan gen ketahanan antibiotik (*npt II*, *hpt*) atau gen ketahanan terhadap herbisida (*bar*) sebagai gen penyeleksi karena disamping lebih mudah diperoleh dan digunakan, juga dilaporkan efektif pada berbagai tanaman baik pada kelompok monokotil, maupun dikotil (Bailey dan Kaeppeler, 2001). Hal ini menggam-

barkan bahwa hingga saat ini gen ketahanan antibiotik/herbisida masih merupakan sistem penyeleksi yang umum digunakan dalam kegiatan transformasi tanaman, meskipun penggunaan sistem seleksi antibiotik/herbisida dilaporkan sering menyebabkan kebanyakan sel yang tertransformasi tidak atau sulit beregenerasi, diduga karena adanya penghambat pertumbuhan atau toksin yang dikeluarkan dari sel non-transgenik yang mati, atau karena terganggunya transportasi senyawa esensial melalui jaringan mati tersebut (Haldrup *et al.*, 1998; 2001).

Akhir-akhir ini penggunaan antibiotik sebagai gen penyeleksi telah menimbulkan perdebatan pada masyarakat luas terutama karena kurangnya pengetahuan tentang pengaruh dari antibiotik yang digunakan terhadap lingkungan dan kesehatan manusia. Kehawatiran tersebut meliputi (1) produk gen bersifat racun atau dapat menimbulkan alergi, (2) terjadinya transfer gen ke mikroorganisme dalam perut kemudian berpindah lagi ke

mikroorganisme patogen, (3) terjadinya kekebalan terhadap antibiotik akibat mengkonsumsi tanaman transgenik sehingga sulit diobati. Sedangkan isu mengenai gen ketahanan herbisida adalah adanya kekhawatiran terjadinya transfer gen ke kerabat liar dari tanaman transgenik yang memicu munculnya gulma tahan herbisida yang sulit diberantas. Komisi Masyarakat Eropah (*Comission of the European Communities*) mendesak agar gen ketahanan antibiotik maupun herbisida secara berangsur ditarik dan tidak digunakan lagi pada tahun 2005.

Pencarian dan pengembangan gen penyeleksi baru perlu dilakukan untuk menghindari penggunaan gen ketahanan antibiotik/herbisida dan mendapatkan gen penyeleksi baru yang dapat diterima masyarakat, untuk mengatasi masalah regenerasi tanaman menggunakan gen penyeleksi tertentu, dan untuk meningkatkan efisiensi dan fleksibilitas transformasi. Pengembangan sistem seleksi berdasarkan gen penyeleksi alternatif menunjukkan bahwa sejumlah gen penyeleksi efisien untuk transformasi tanaman, di antaranya adalah gen *ipt*, *rol*, *xylA*, *gfp* dan *pmi* (Tabel 1). Tulisan ini mengulas tentang beberapa sistem penyeleksi alternatif yang telah disebutkan di atas untuk memberikan gambaran umum tentang pendekatan yang digunakan oleh gen penyeleksi tersebut dan mekanisme seleksinya secara ringkas.

MULTI-AUTO-TRANSFORMATION VECTOR SYSTEM (MATVS)

Sistem vektor MAT pertama sekali dikembangkan oleh Ebinuma dan kawan-kawan pada tahun 1997. Sistem ini menggunakan onkogen (*oncogen*) dari bakteri *Agrobacterium* sebagai sistem penyeleksi, dikombinasikan dengan mekanisme penghilangan markah

onkogen untuk mendapatkan tanaman transgenik bebas markah (Ebinuma *et al.*, 1997). Onkogen adalah gen yang ditemukan secara alami pada *Agrobacterium*, berperan menginduksi diferensiasi dan regenerasi sel, dan menyebabkan tumor (*crown galls*) atau akar berambut pada tanaman, umumnya tanaman dikotil.

Vektor MAT mengandung onkogen (*ipt* atau *rol*) dan *site-specific recombination system* (*R/RS*) dari yeast *Zygosaccharomyces rouxii* (Sugita *et al.*, 1999). Sistem *R/RS* berperan dalam mekanisme rekombinasi dan pemotongan DNA yang terletak diantara dua urutan DNA spesifik (*recognition site*, *RS*). Sugita *et al.* (1999) melaporkan

bahwa sistem *R/RS* lebih efektif menghilangkan onkogen dibandingkan dengan *transposable element* (*Tn*) *Ac* dari jagung. Hal ini dibuktikan dengan meningkatnya jumlah tanaman transgenik bebas markah yang diperoleh.

Pada sistem vektor MAT, gen *rekombinase* (*R*) bersama dengan gen *ipt* atau *rol* A, B, C disisipkan diantara dua urutan DNA spesifik *RS* dengan orientasi searah (Gambar 1). Gen *R* yang menyandikan enzim rekombinase menginduksi terjadinya penyusunan kembali kromosom (*chromosomal rearrangements*), pemotongan sekitar 180 kb DNA yang terletak di antara dua *RS*, dan translokasi kromosom. Dengan demikian hal ini memungkinkan

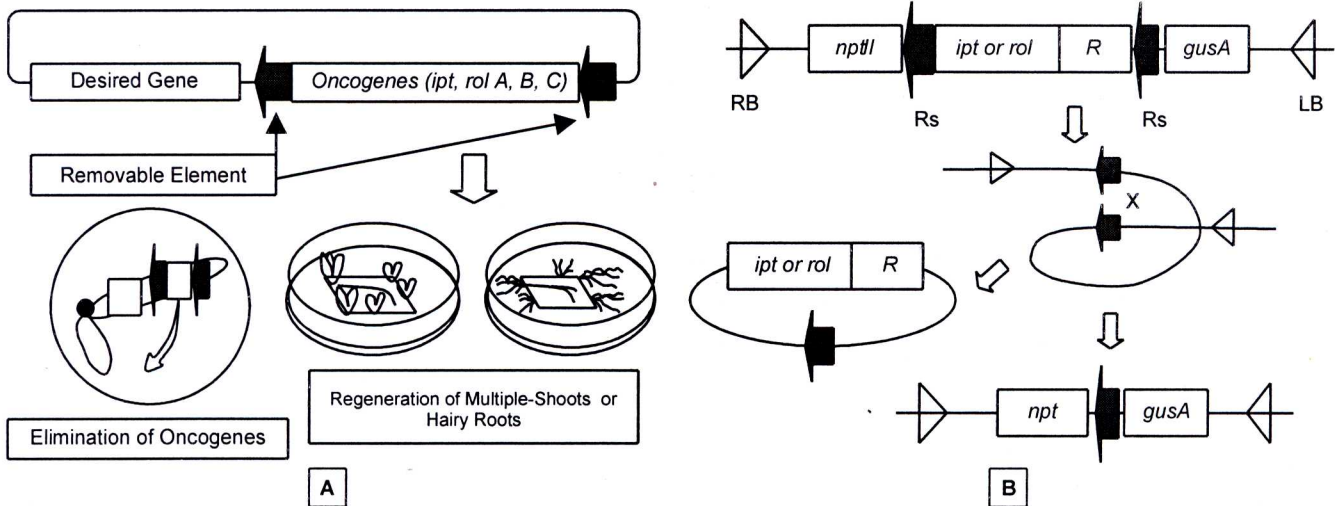
terjadinya pelepasan gen *R* dan *ipt* atau *rol* dari tanaman transgenik.

Pada saat ini, terdapat dua tipe vektor MAT yang sudah dikembangkan, yaitu tipe *ipt* dan *rol* (Ebinuma dan Komamine, 2001). Pada tipe *ipt* (*ipt-type MAT vector system*), gen *isopentenyl transferase* (*ipt*) dari *Agrobacterium tumefaciens* PO22 digunakan sebagai gen penyeleksi. Gen *ipt* menyandikan enzim isopentenyl transferase yang berperan mengkatalisa sintesis sitokinin, yaitu hormon yang diperlukan dalam perbanyakan sel dan diferensiasi tunas. Over produksi sitokinin oleh gen *ipt* meningkatkan pembelahan sel dan diferensiasi tunas, sehingga sel yang ditransformasi akan membentuk tunas pada media be-

Tabel 1. Gen penyeleksi yang umum dan berpotensi digunakan dalam transformasi tanaman

Gen	Deskripsi	Sumber gen	Mekanisme seleksi	Agen penyeleksi
<i>nptII</i>	Neomycin phospho transferase	<i>E. coli</i> transposon 5 (TN5)	Ketahanan antibiotik	Kanamycin
<i>hpt</i>	Hygromycin phospho transferase	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Ketahanan antibiotik	G418
<i>pat/bar</i>	Phosphinothricin acetyl transferase	<i>Streptomyces</i>	Ketahanan herbisida	Hygromycin B
<i>gfp</i>	Green fluorescent	<i>Aequorea victoria</i>	Berpendar	Bialaphos/glufosinate
<i>lec1</i>	Protein	<i>Zea mays</i>	Pertumbuhan/morfogenesis	Skrining secara visual
<i>ipt</i>	Leafy cotyledon	<i>A. tumefaciens</i>	Pertumbuhan/morfogenesis	Tanpa agen
<i>rola, b, c</i>	Isopentenyl transferase	<i>A. rhizogenes</i>	Pertumbuhan/morfogenesis	Tanpa agen
<i>pmi</i>	Root locus	<i>E. coli</i>	Pertumbuhan/morfogenesis	Tanpa agen
<i>xyla</i>	Phosphomannose isomerase	<i>Thermoanaerobacterium</i>	Penggunaan substrat	Tanpa agen
	Xylose isomerase	<i>Streptomyces rubiginosus</i>	Penggunaan substrat	Mannose

Sumber: Bailey dan Kaeppler (2001)



A: MATVS memanfaatkan onkogene-onkogen (*ipt*, *rol*A, B, C) untuk menyeleksi tanaman transgenik dan sistem rekombinasi spesifik untuk menghilangkan onkogen setelah transformasi; B: sistem rekombinasi *R/RS*, enzim rekombinase menyebabkan terjadinya rekombinasi antara dua daerah *RS* yang berorientasi searah, kemudian menghilangkannya dari genom tanaman

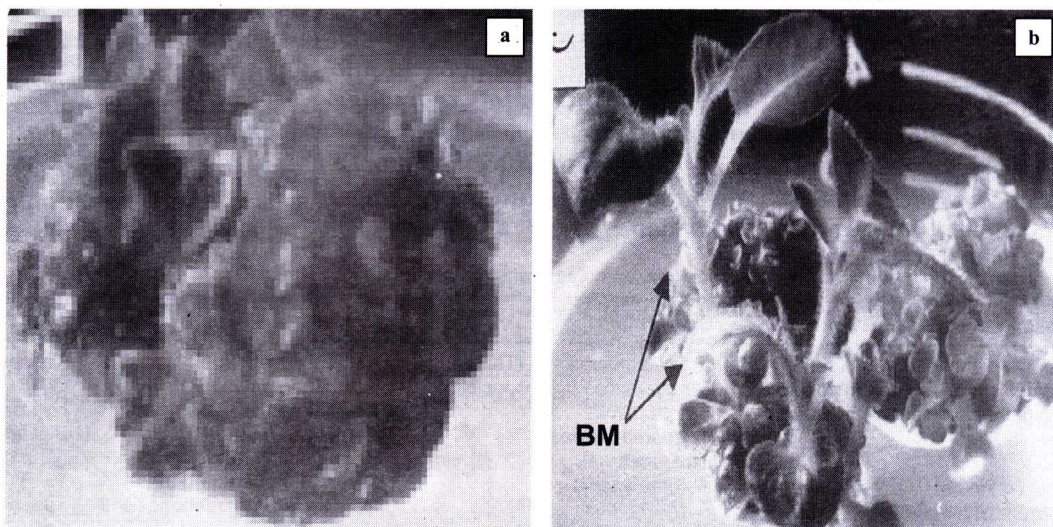
Gambar 1. Prinsip MATVS

bas hormon. Tunas tersebut berdifrensiasi secara otonom dan menunjukkan fenotipe spesifik, di mana tunas kehilangan apikal dominan dan kemampuan berakar. Dengan demikian, tunas yang tertransformasi dengan mudah dapat dibedakan secara visual dari yang tidak tertransformasi, karena menunjukkan fenotipe abnormal, yaitu daun keriting, ruas/buku pendek, dan tanaman kecil/pendek (Gambar 2).

Tunas pucuk yang tertransformasi disubkultur pada media bebas hormon dan diamati munculnya tunas bebas marker dengan fenotipe normal sebelum dipindahkan ke media perakaran.

Tipe yang kedua adalah tipe *rol* (*rol*-type MAT vector system) di mana gen *rol* A, B, C dari *A. rhizogenes* NIAES1724 digunakan sebagai gen penyeleksi. Gen *rol* berperan dalam pembentukan dan memperbanyak

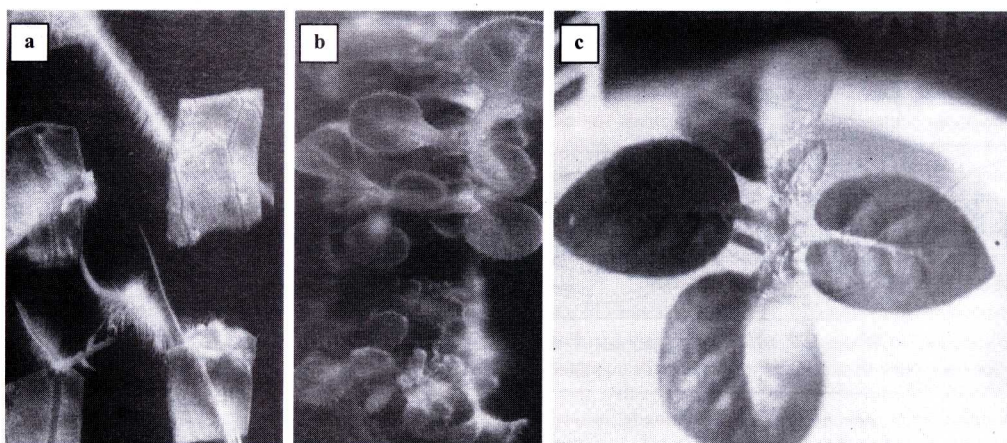
akar rambut dengan meningkatkan sensitifitas terhadap auksin. Sel yang tertransformasi secara visual dapat dibedakan dengan terbentuknya akar rambut pada media bebas hormon sehingga dengan mudah dapat dipisahkan (Gambar 3). Klon akar rambut disubkultur pada media bebas hormon dan diamati munculnya tunas normal bebas markah dari klon akar tersebut.



a = fenotipe tunas *ipt* yang kehilangan apikal dominan dan kemampuan berakar, b = munculnya tunas normal bebas marker (BM) dari klon tunas *ipt* setelah disubkultur

Gambar 2. Transformasi daun tembakau dengan vektor MAT tipe *ipt*

Sumber: Ebinuma dan Komamine (2001)



a = diferensiasi akar rambut dari daun tembakau pada media bebas hormon, b = regenerasi tunas adventif dari klon akar rambut, dan c = tunas normal dari klon akar rambut

Gambar 3. Transformasi daun tembakau dengan vektor MAT tipe *rol*

Sumber: Ebinuma dan Komamine (2001)

Sistem vektor MAT telah berhasil diaplikasikan pada tanaman seperti tembakau dan aspen (dikotil), serta padi dan *snaptdragon* (monokotil), menggunakan transformasi *Agrobacterium* (Ebinuma dan Komamine, 2001; Endo *et al.*, 2001; Sugita *et al.*, 1999). Pemilihan promoter, lamanya masa pra-kultur jaringan tanaman, dan komposisi media berpengaruh pada efisiensi transformasi dan perolehan tanaman transgenik bebas markah.

Apabila dibandingkan dengan penggunaan sistem seleksi menggunakan ketahanan antibiotik/herbisida, maka penggunaan sistem vektor MAT tidak membutuhkan bahan kimia untuk membunuh sel yang tidak tertransformasi (seleksi negatif), hormon untuk merangsang diferensiasi sel, atau perkawinan seksual untuk menghilangkan gen penanda. Sistem seleksi berdasarkan vektor MAT ini memungkinkan seleksi sel/jaringan yang tertransformasi secara visual berdasarkan perubahan morfologi, dilanjutkan dengan pelepasan gen penyeleksi untuk mendapatkan tanaman transgenik dengan fenotipe normal, sekaligus bebas gen penyeleksi, dalam waktu yang relatif singkat.

XYLOSE ISOMERASE (Xyla)

Sukrosa adalah sumber karbohidrat yang umum digunakan dalam kultur jaringan tanaman. Tanaman dapat tumbuh pada media yang mengandung karbohidrat lain, seperti glukosa dan fruktosa, sebagai sumber karbon. Penggunaan sumber karbon alternatif sebagai sistem seleksi merupakan salah satu pendekatan yang dikembangkan untuk transformasi tanaman. Salah satu contohnya adalah sistem seleksi xylosa isomerase menggunakan xylosa sebagai sumber karbon utama sekaligus sebagai agen penyeleksi.

Ditinjau dari sisi keamanannya, sistem xyla tidak bergantung pada gen ketahanan antibiotik atau herbisida, tetapi bergantung pada enzim yang secara umum dikenal aman dan telah digunakan secara luas pada industri tepung dan proses makanan tertentu. Sistem seleksi ini memungkinkan pemisahan antara jaringan yang tertransformasi dengan yang tidak tertransformasi. Jaringan tanaman yang tertransformasi mampu tumbuh dan membelah, sedangkan yang tidak tertransformasi akan terhambat pertumbuhannya, namun tidak mati karena xylosa tidak meracuni tanaman. Sistem seleksi ini disebut juga dengan sistem seleksi positif.

Gen xylose isomerase (*xylA*) diisolasi dari *Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes* atau *Streptomyces rubiginosus* menyandikan enzim D-xylosa isomerase. Enzim xylosa isomerase mengkatalisis isomerisasi D-xylosa menjadi D-xylulosa atau sebaliknya. D-xylulosa akan difosforilasi menjadi xylulosa 5-fosfat oleh enzim xylulokinase sebelum memasuki jalur pentosa fosfat. Enzim ini juga mengkatalisa glukosa menjadi fruktosa, sehingga dikenal juga sebagai enzim glucose isomerase. Di samping menggunakan xylosa dan glukosa, enzim ini diketahui dapat menggunakan L-rhamnosa, L-arabinosa, D-ribosa, atau D-allosa sebagai substrat.

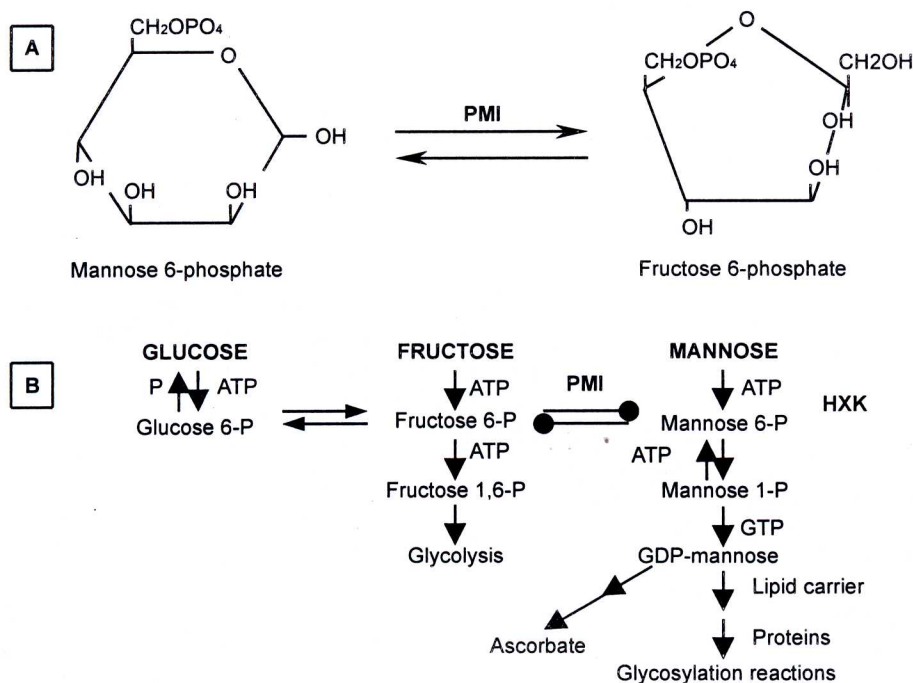
Pada kebanyakan jaringan tanaman ekspresi xylose isomerase sangat rendah (Haldrup *et al.*, 1998). Dari penelitian terdahulu diketahui bahwa sel tanaman kentang dan tomat tidak dapat menggunakan D-xylosa sebagai sumber karbon utama, namun dapat menggunakan D-xylulosa karena tanaman sudah mempunyai enzim xylulokinase (Haldrup *et al.*, 1998; Haldrup *et al.*, 2001). Agar tanaman mampu menggunakan D-xylosa sebagai sumber karbon hanya satu

gen yang perlu ditambahkan, yaitu gen *xylA*.

Keefektifan sistem xylosa isomerase telah dicoba dengan mengintroduksi gen *xylA* yang diisolasi dari *Streptomyces rubiginosus* pada tanaman kentang dan tomat dengan transformasi *Agrobacterium*. Sel yang tertransformasi diseleksi dengan menambahkan xylosa saja atau kombinasi xylosa/sukrosa pada media tumbuh. Hasil penelitian pada tanaman kentang menunjukkan bahwa penambahan kombinasi xylosa (3,5 g^l⁻¹) dan sukrosa (7,5 g^l⁻¹) pada media seleksi memberikan hasil terbaik yang mendukung pertumbuhan sel transforman, namun tidak mematikan sel non transforman, dengan jumlah *escape* rendah. Frekuensi transformasi meningkat hingga 10 kali lipat dan tunas tumbuh lebih cepat dengan vigor yang lebih baik dibandingkan dengan seleksi menggunakan kanamisin (Haldrup *et al.*, 1998). Di samping itu, penggunaan L-rhamnosa sebagai pengganti xylosa juga telah dicoba. Hasil yang terbaik dengan efisiensi transformasi tertinggi (2,9%) dan jumlah *escape* terendah diperoleh dengan penambahan L-rhamnosa (5,625 g^l⁻¹) dikombinasikan dengan sukrosa (7,5 g^l⁻¹) (Haldrup *et al.*, 2001).

PHOSPHOMANNOSE ISOMERASE (PMI)

Contoh lain dari sistem seleksi positif yang menggunakan sumber karbon alternatif adalah sistem seleksi dengan phosphomannose isomerase (PMI). PMI adalah enzim yang berperan dalam konversi mannosa-6-fosfat menjadi fruktosa-6-fosfat atau sebaliknya (Gambar 4). PMI secara alami tidak ditemukan pada tanaman, kecuali pada tanaman kedelai dan tanaman legum lainnya (Lee dan Matheson, 1984). Oleh karenanya, tanaman selain dari kelompok leguminosa



Tanda $\bullet$ = reaksi yang dikatalisa oleh PMI

Gambar 4. Metabolisme yang melibatkan mannosa pada tanaman non-legume yang tidak ditransformasi dengan PMI

tidak mampu hidup pada media yang hanya mengandung mannosa sebagai sumber karbon.

Gen *manA* yang menyandikan PMI telah berhasil diisolasi dari *E. coli* (Miles dan Guest, 1984) dan berpotensi dimanfaatkan sebagai gen penyeleksi dalam transformasi tanaman. Introduksi gen *manA* ke dalam tanaman memungkinkan tanaman tumbuh pada media yang mengandung mannosa sebagai sumber carbon. PMI telah berhasil ditransformasikan baik dengan penembakan, PEG atau *Agrobacterium* dan diekspresikan pada tanaman jagung, gandum, barley, dan semangka (Reed *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2000). Pada percobaan transformasi jagung dengan penembakan, sistem seleksi ini dilaporkan lebih baik dari gen *pat* atau *bar* yang diseleksi dengan Basta®. Efisiensi transformasi meningkat hingga rata-rata 45% dibandingkan menggunakan Basta® (15%). Sedangkan pada percobaan transformasi jagung dengan *Agrobacterium*, peng-

gunaan seleksi mannosa menunjukkan peningkatan efisiensi transformasi hingga 100% dengan rata-rata 52%.

Berbagai pengujian telah dilakukan untuk mengetahui keamanan PMI (Reed *et al.*, 2001). Tiga pendekatan dilakukan untuk melihat apakah PMI potensial sebagai alergen, yaitu uji homologi, uji pencernaan, dan terjadi tidaknya glikosilasi. Hasil uji homologi dengan protein yang ada di database publik (EMBL, Genbank, dll.) menunjukkan produk gen *manA* tidak homolog dengan protein yang dikenal sebagai alergen atau racun. Pada penelitian menggunakan lambung dan cairan usus tiruan mamalia, protein PMI murni yang diisolasi dari *E. coli* cepat dicerna (2 menit, 37°C). Protein yang bersifat alergen biasanya sulit dicerna karena lebih tahan enzim proteolitik yang terdapat pada lambung dan usus mamalia. Selanjutnya tidak ditemukan adanya glicoprotein yang berbeda antara tanaman transgenik dan iso-

genik non-transgenik. Hasil pengujian tersebut menunjukkan bahwa produk gen *manA* tidak potensial sebagai alergen.

Hasil pengujian toksisitas menggunakan metode *acute mouse toxicity test* menunjukkan bahwa PMI tidak bersifat racun pada mamalia. Di samping itu, pengujian terhadap sifat-sifat agronomi seperti tinggi tanaman, perakaran, daya hasil, dan lain-lain, serta komposisi nutrisi biji jagung menunjukkan bahwa secara statistik tidak ada perbedaan yang nyata antara jagung transgenik dengan tanaman isogenik non-transgenik (Reed *et al.*, 2001).

GREEN FLUORESCENT PROTEIN (GFP)

Gen *gfp* (*green fluorescent protein*) secara alami terdapat pada hewan laut sejenis ubur-ubur *Aequorea victoria*. Gen ini menyandikan protein yang memiliki karakteristik unik, yaitu berpendar bila

terkena cahaya biru hingga ultra-violet. Protein GFP menyerap cahaya biru pada puncak (*peak*) panjang gelombang maksimum 395 nm dan minimum 470 nm serta memancarkan cahaya hijau pada puncak panjang gelombang maksimum 509 nm (Morise *et al.*, 1974). Karakter ini dinilai sangat menguntungkan jika dimanfaatkan sebagai gen pelapor atau gen penyeleksi dalam kegiatan transformasi tanaman, sehingga gen tersebut diisolasi dan diintroduksi ke dalam tanaman. Tanaman yang tertransformasi akan berpendar hijau (Gambar 5) apabila dilihat di bawah mikroskop yang dilengkapi dengan cahaya biru, sehingga memungkinkan dilakukan seleksi tanaman yang tertransformasi secara visual.

Gen *gfp* telah berhasil diekspresikan pada berbagai tanaman seperti oat (Kaeppler *et al.*, 2000; 2001), barley (Carlson *et al.*, 2001), *Medicago truncatula* (Kamate *et al.*, 2000), dan lain sebagainya, namun ekspresi gen *gfp wild type* pada tanaman sangat rendah. Kemudian gen *gfp* tersebut dimodifikasi untuk meningkatkan ekspresinya pada tanaman. Hingga saat ini, beberapa gen *gfp* sintetik yang telah dimodifikasi, seperti *sgfp*, *pgfp*, *mgfp*, atau

syngfp, telah dihasilkan dan mempunyai ekspresi yang tinggi pada tanaman (Stewart, 2001). Gen ini telah diintroduksi baik sebagai gen penyeleksi tunggal (Kaeppler *et al.*, 2000; 2001; Kamate *et al.*, 2000) atau dikombinasikan dengan gen penyeleksi antibiotik/ herbisida pada tanaman (Maximova *et al.*, 2003).

Kaeppler *et al.* (2000) melaporkan bahwa tanaman oat (*Avena sativa*) transgenik yang fertil dapat dihasilkan dengan seleksi visual menggunakan gen *gfp* sebagai gen penyeleksi tunggal. GFP tidak berpengaruh buruk pada pertumbuhan sel, regenerasi sel, atau kesuburan tanaman. Selanjutnya seleksi dapat dilakukan secara dini, kapan saja tanpa merusak sampel, tidak memerlukan substrat, kofaktor atau agen penyeleksi. Frekuensi transformasi bervariasi antara 0,7-6% dengan rata-rata 2,1%, lebih tinggi dibandingkan dengan transformasi tanaman oat dengan sistem seleksi antibiotik.

PROSPEK PENGGUNAAN DI MASA MENDATANG

Seiring dengan meningkatnya penggunaan teknik transformasi,

pengembangan sistem seleksi yang lebih efektif dan aman sangat diperlukan. Metode seleksi alternatif yang menghindari penggunaan antibiotik dan herbisida masih belum dikembangkan untuk penggunaan praktis. Pencarian sistem penyeleksi alternatif bertujuan untuk mengembangkan sistem seleksi baru yang dapat diterima oleh konsumen, murah, dan mempunyai efisiensi yang lebih tinggi dari sistem yang sudah ada. Secara umum sistem penyeleksi yang didambakan adalah yang secara visual dapat diseleksi kapan saja tanpa merusak sampel dan tanpa penambahan substrat, kofaktor atau agen penyeleksi. Selanjutnya harus tidak mempunyai efek samping terhadap pertumbuhan sel, regenerasi, fertilitas juga tidak berdampak negatif terhadap kesehatan manusia dan lingkungan. Di dalam ulasan ini telah digambarkan bahwa beberapa sistem seleksi berpotensi sebagai metode seleksi alternatif. Masing-masing menjanjikan keunggulan yang berbeda.

Dilihat dari sudut pemisahan sel yang tertransformasi dari yang tidak tertransformasi maka sistem seleksi negatif menggunakan antibiotik/ herbisida paling mudah dibanding-



Gambar 5. Kecambah transgenik (atas) dan non-transgenik (bawah) dilihat di bawah cahaya putih (a) dan di bawah cahaya biru (b)

Sumber: Kaeppler *et al.* (2000)

kan dengan sistem seleksi lain karena tidak memerlukan tenaga. Sistem seleksi GFP memerlukan alat khusus dan agak sulit diterapkan pada jaringan yang berklorofil. Meskipun sampai saat ini masih dianggap aman, adanya gerakan pencinta hewan mungkin akan menghambat penggunaannya. Sistem MATVS relatif lebih mudah karena dapat dibedakan secara morfologi, namun memerlukan tenaga untuk memisahkannya. Demikian juga halnya dengan sistem PMI atau Xyla. Untuk mengurangi jumlah *escape* perlu dilakukan optimasi konsentrasi sukrosa/mannosa atau sukrosa/xylosa. Di samping itu, sebelum memilih gen penyeleksi *pmi* atau *xylA* perlu diketahui ketahanan tanaman interes terhadap agen penyeleksi yang digunakan, konsentrasi minimum yang secara efektif membunuh sebagian besar jika tidak semua sel yang tidak tertransformasi, serta kombinasi xylosa/sukrosa atau mannososa/sukrosa yang tepat untuk mendukung pertumbuhan sel yang tertransformasi, namun jaringan tanaman yang tidak tertransformasi masih lapar. Penggunaan gen xylosa atau mannososa dari tanaman perlu dilakukan untuk menghindari gen asing.

Namun, ditinjau dari segi keamanan pangan maka sistem Xyla lebih aman dan produk gen ini sudah lama diterapkan pada industri makanan. Selanjutnya berdasarkan hasil pengujian di laboratorium menunjukkan bahwa sistem vektor MAT dan PMI terbukti aman. Sistem vektor MAT dapat menghasilkan tanaman transgenik bebas marker dalam waktu yang relatif singkat (sebulan) tanpa harus melakukan persilangan secara seksual dan telah berhasil diaplikasikan pada tanaman monokotil maupun dikotil. Di samping itu, teknik ini juga memungkinkan untuk aplikasi transformasi secara *in vivo* dengan stek batang. Stek batang diinfeksi de-

ngan *Agrobacterium* yang mengandung vektor MAT tipe *rol*. Tunas transgenik bebas markah akan dihasilkan dari akar rambut yang terkena cahaya (Ebinuma dan Komamine, 2001).

Sebelum memilih sistem seleksi untuk diterapkan dalam transformasi tanaman tentunya perlu dipertimbangkan, di antaranya adalah aspek keamanan pangan dan juga keamanan hayati dari gen atau produk gen penyeleksi yang diintroduksi, di samping kemudahan seleksi, efisiensi transformasi dan daya regenerasi sel menggunakan sistem seleksi tersebut.

KESIMPULAN

Sistem seleksi menggunakan vektor MAT yang memanfaatkan onkogen-onkogen dari bakteri *Agrobacterium*, sistem seleksi positif xylosa isomerase, phosphomannose isomerase, serta sistem seleksi visual menggunakan green fluorescent protein merupakan empat sistem seleksi alternatif yang telah diteliti dan efektif untuk transformasi berbagai jenis tanaman.

DAFTAR PUSTAKA

- Bailey, M.A. and H.F. Kaeppler. 2001. Special-workshop: Alternative markers for plant transformation. Workshop presentations from the 2000 World Congress *in vitro* Biology. In *Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 37:101-102.
- Carlson A.R., J. Letarte, J. Chen, and K.J. Kasha. 2001. Visual screening of microspore-derived transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) with green fluorescent protein. *Plant Cell Reports* 20:331-337.
- Ebinuma, H. and A. Komamine. 2001. MAT (multi-auto-transformation) vector system. The oncogenes of *Agrobacterium* as positive markers for regeneration and selection of marker-free transgenic plants. In *Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 37:103-113.
- Ebinuma, H., K. Sugita, E. Matsunaga, M. Yamakado, and A. Komamine. 1997. Principle of MAT vector. *Plant Biotechnology* 14:133-139.
- Endo S., T. Kasahara, K. Sugita, E. Matsunaga, and H. Ebinuma. 2001. The isopentenyl transferase gene is effective as a selectable marker gene for plant transformation in tobacco (*Nicotiana glauca* cv. SRI). *Plant Cell Reports* 20:60-66.
- Haldrup A., S.G. Petersen, and F.T. Okkels. 1998. Positive selection: A plant selection principle based on xylose isomerase, an enzyme used in the food industry. *Plant Cell Reports* 18:76-81.
- 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.
- Kaeppler, H.F., G.K. Menon, R.W. Skadsen, A.M. Nuutila, and A.R. Carlson. 2000. Transgenic oat plants via visual selection of cells expressing green fluorescent protein. *Plant Cell Reports* 19:661-666.
- Kaeppler, H.F., A.R. Carlson, and G.K. Menon. 2001. Routine utilization of green fluorescent protein as a visual selectable marker for cereal transformation. In *Vitro Cell Dev. Biol.-Plant* 37:120-126.
- Kamate, K., I.D. Rodriguez-Llorente, M. Schotte, P. Durand, P. Ratet, E. Kondorosi, and T.H. Trinh. 2000. Transformation of floral organs with GFP in *Medicago truncatula*. *Plant Cell Reports* 19:647-653.
- Lee, B.T. and N.K. Matheson. 1984. Phosphomannose isomerase and phosphoglucose isomerase in seeds of *Cassia coluteoides* and some other legumes that synthesize galactomannan. *Phytochemistry* 23:983-987.
- Maximova, S., C. Miller, G. Antunez de Mayolo, S. Pishak, A. Young, and M.J. Guiltinan. 2003. Stable transformation of *Theobroma cacao* L. and influence of matrix attachment regions on GFP

- expression. *Plant Cell Reports* 21:872-883.
- Miles, G.S. and J.R. Guest. 1984.** Nucleotide sequence and transcriptional start point of the phosphomannose isomerase gene (*manA*) of *E. coli*. *Gene* 32:41-48.
- Morise, H., O. Shimomura, F.H. Johnson, and J. Winant. 1974.** Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. *Biochemistry* 13: 2656-2662.
- 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.
- Stewart Jr, C.N. 2001.** The utility of green fluorescent protein in transgenic plants. *Plant Cell Reports* 20:376-382.
- Sugita, K., E. Matsunaga, and H. Ebinuma. 1999.** Effective selection system for generating marker-free transgenic plants independent of sexual crossing. *Plant Cell Reports* 18:941-947.
- Wang, A.S., R.A. Evans, P.R. Altendorf, J.A. Hanten, M.C. Doyle, and J.L. Rosichan. 2000.** A mannose selection system for production of fertile transgenic maize plants from protoplast. *Plant . Cell Reports* 19:654-660.
-