Hayati, Juni 1995, hlm. 1-7
ISSN 0854-8587

Vol. 2, No. 1

ULAS BALIK

Sterilitas Jantan pada Tanaman
(*Male Sterility in Plants*)

SUHARSONO

Jurusan Biologi FMIPA IPB, Jalan Raya Pajajaran, Bogor 16144
dan PAU Bioteknologi IPB, Kotak Pos 1, Darmaga, Bogor 16610

Diterima 6 September 1994 / Disetujui 15 Maret 1995

Male-sterile plants are very useful for hybrid seed productions. An incompatibility between nucleus and mitochondrion could arise male sterility in plants. This phenotype was determined histologically by a defective function of the tapetal cells in the anther. The cytoplasmic male sterility phenotype is closely associated with an aberration of mitochondrial genome. Male-sterile plants can be produced by: (i) interspecies sexual hybridization, (ii) somatic hybridization, and (iii) genetic engineering.

PENDAHULUAN

Sterilitas jantan pada tanaman ditandai oleh ketidak-mampuan tanaman untuk menghasilkan serbuk sari yang hidup (viabel). Tanaman steril jantan mempunyai beberapa karakter morfologi pada bunganya, yaitu: (i) tidak mempunyai tangkai sari (Rosenberg dan Bonnett, 1983), (ii) mempunyai tangkai sari, tetapi kepala sari tidak normal (Burns dan Gerstel, 1981), (iii) mempunyai kepala sari normal, tetapi tidak menghasilkan serbuk sari yang hidup. Pada prinsipnya, setiap gangguan pada setiap tahap dari proses mikrospo-rogenesis akan menyebabkan tanaman menjadi steril jantan.

Tanaman steril jantan sangat bermanfaat bagi program pemuliaan tanaman, terutama untuk menghasilkan tanaman hibrid F1. Tanaman hibrid F1 didapat dari persilangan antara dua tetua yang berbeda, sehingga persilangan sendiri harus dihindarkan. Hal ini biasanya dilakukan dengan pembuangan bagian bunga penghasil serbuk sari secara mekanis. Penggu-naan tanaman steril jantan sebagai induk betina lebih mengun-tungkan karena mengurangi biaya produksi yang dikeluarkan untuk pembuangan alat reproduksi jantan. Selain mengurangi biaya produksi, penggunaan tanaman steril jantan menjamin produksi benih hibrid karena penyerbukan sendiri pada tanaman ini tidak terjadi. Penggunaan tanaman steril jantan juga sangat bermanfaat untuk menghasilkan hibrid pada tanaman berumah satu yang mempunyai alat reproduksi jantan sulit untuk dikastrasi, misalnya tanaman wortel, bunga mata-hari, dan *Brassica napus*, dan tanaman yang proses penyer-bukannya terjadi sebelum bunga membuka, misalnya padi.

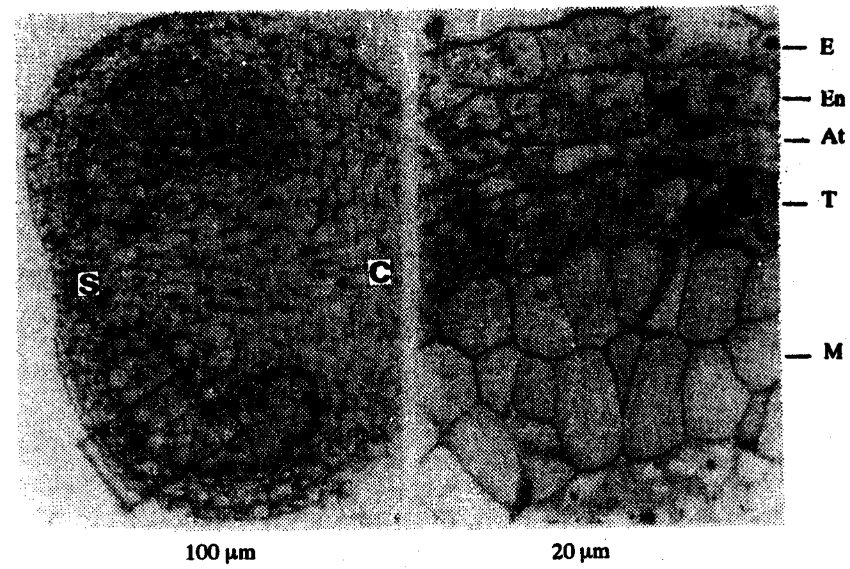
Sterilitas jantan dapat dibagi kedalam dua kelompok, yaitu sterilitas jantan nukleus (sjn) (*nuclear male sterility*) dan sterilitas jantan sitoplasma (sjs) (*cytoplasmic male sterility*). Sterilitas jantan nukleus terjadi karena adanya mutasi gen pada kromosom, yang biasanya bersifat resesif. Mutan tanaman sjn secara spontan di alam atau terinduksi telah dilaporkan ada pada sekitar 175 spesies (Kaul, 1988).

Sifat sjn ini diwariskan ke generasi berikutnya dengan mengikuti hukum klasik Mendel. Tanaman sjn yang terjadi secara alami jarang dimanfaatkan untuk program pemuliaan, karena sifat steril jantan ini biasanya diikuti oleh penurunan fertilitas betinanya dan kurang stabil (Renard *et al.*, 1992).

Tanaman sjs disebabkan oleh kelainan pada bahan genetik sitoplasma. Sifat sjs ini diwariskan ke generasi berikutnya lewat jalur induk betina. Sterilitas jantan sitoplasma pada tanaman ditemukan pada sekitar 140 spesies (Edwardson, 1970). Kalau tujuan akhir penanaman untuk menghasilkan benih, tanaman sjs hanya dapat digunakan untuk program pemuliaan tanaman, jika terdapat gen pemulih fertilitas *Rf* (*fertility restorer gene*). Gen *Rf* disandikan terdapat di dalam inti, bersifat dominan dan dapat menekan ekspresi gen penyandi fenotipe sjs. Untuk tanaman yang dipanen bagian vegetatifnya, seperti rumput-rumputan yang digunakan sebagai makanan ternak, tanaman sjs dapat digunakan untuk merakit tanaman hibrid tanpa memerlukan adanya gen *Rf*.

STRUKTUR KEPALA SARI PADA TANAMAN STERIL JANTAN

Kepala sari merupakan alat reproduksi jantan pada tanaman. Pertumbuhan dan perkembangan serbuk sari berlangsung di dalam kepala sari. Kepala sari tersusun dari dua bilik dan setiap bilik tersusun oleh dua kantong serbuk sari yang dihubungkan oleh jaringan penghubung (*connectivum*). Kantong-kantong serbuk sari ini berisi sel-sel induk serbuk sari yang masing-masing akan mengalami proses meiosis untuk menghasilkan empat serbuk sari. Di antara kedua kantong serbuk sari terdapat stomium, yaitu tempat pecahnya kantong serbuk sari. Sel-sel induk serbuk sari diselubungi oleh empat lapisan sel atau jaringan, yaitu: epidermis, endotesium, lapisan tengah, dan sel tapetum (Gambar 1).



Gambar 1. Potongan Melintang Kepala Sari Tembakau (*Nicotiana tabacum*): C. Jaringan penghubung, S. Stomium, E. Epidermis, En. Endotesium, At. Lapisan tengah, T. Tapetum, M. Meiosit (Suharsono, 1993)

Sel tapetum memegang peranan penting dalam perkembangan serbuk sari karena: (i) menyalurkan nutrisi bagi sel induk serbuk sari, (ii) mengeluarkan enzim -1,3-glukanase yang diperlukan untuk membebaskan serbuk sari dari kalos (*callose*) yang menyelimuti tetrad, dan (iii) menghasilkan senyawa yang diperlukan untuk biosintesis dinding luar (eksin) dari serbuk sari (Bedinger, 1992). Oleh karenanya, kelainan pada sel tapetum dapat menyebabkan kegagalan proses mikrosporogenesis, yang akhirnya membuat tanaman menjadi steril jantan.

Analisis histologi pada kepala sari dari tanaman steril jantan menunjukkan adanya degenerasi dini dari sel tapetum pada saat mikrosporogenesis, sebelum terbentuknya serbuk sari (Grant, 1986). Degenerasi dini dari sel tapetum ini menyebabkan tanaman menjadi steril jantan (Mariani *et al.*, 1990). Pada *Petunia hybrida*, sifat sjs disebabkan oleh adanya vakuolisasi yang intensif pada sel tapetum sebelum terjadinya degenerasi sel (Bino, 1985a,b). Vakuolisasi intensif pada sel tapetum yang menyebabkan pembengkakan (*hipertrophia*) sel juga diamati pada tembakau transgenik steril jantan (Worrall *et al.*, 1992; Suharsono, 1993). Analisis ultrastruktural sel tapetum dari tanaman steril jantan menunjukkan bahwa sel ini mempunyai mitokondria yang mengalami pembengkakan akibat vakuolisasi. Adanya vakuolisasi ini menyebabkan protein matriks dari mitokondria terdesak ke arah pinggir dan jumlah lekukan di dalam mitokondria (krista) sangat sedikit (Suharsono, 1993).

Sebelum terjadinya meiosis, sel induk serbuk sari mensintesis dinding yang tersusun dari kalos. Kalos ini berfungsi untuk: (i) mencegah terjadinya kohesi atau fusi dari sel-sel induk serbuk sari (Waterkeyn, 1962), (ii) memisahkan sel mikrospora yang satu dengan sel mikrospora yang lain dan dari jaringan di sekitarnya, dan melindungi pembengkakan yang terjadi secara dini (Heslop-Harrison dan Mackenzie, 1967), dan (iii) membentuk dinding luar serbuk sari yang telah masak (Waterkeyn dan Beinfait, 1970). Hilangnya kalos yang terlalu dini dapat menyebabkan gagalnya perkembangan serbuk sari sehingga tanaman tidak dapat menghasilkan serbuk sari yang hidup (Izhar dan Frankel, 1971).

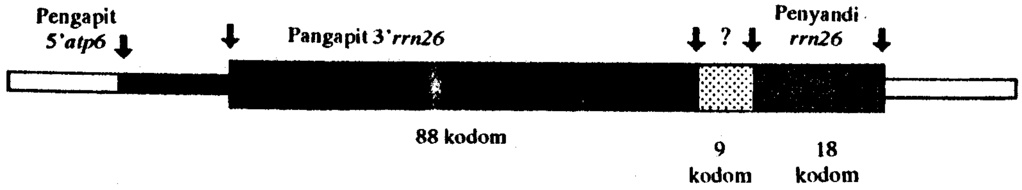
KARAKTERISTIK MOLEKUL TANAMAN STERIL JANTAN SITOPLASMA

Sterilitas jantan sitoplasma pada tanaman terjadi karena adanya ketidakcocokan antara inti dengan sitoplasma. Fenotipe ini sering dijumpai pada tanaman aloplasma (Lonsdale, 1987) yang tersusun dari kombinasi antara bahan genetik inti dari satu spesies dan sitoplasma dari spesies lain.

Analisis molekul tanaman sjs menunjukkan fenotipe ini berhubungan erat dengan genom mitokondria, dan tidak dengan genom kloroplas (Levings dan Pring, 1976; Beliard *et al.*, 1978; Forde *et al.*, 1978). Adanya pengaturan kembali DNA mitokondria (mtDNA) telah ditemukan pada tanaman sjs (Leaver dan Gray, 1982; Clark *et al.*, 1985). Pengaturan kembali mtDNA menimbulkan terbentuknya gen kimera, yang pada kasus tertentu dapat ditranslasikan menjadi protein baru, seperti pada jagung (Dewey *et al.*, 1986; Wise *et al.*, 1987), dan *Petunia* (Young dan Hanson, 1987; Nivison dan Hanson, 1989; Rasmussen dan Hanson, 1989).

Contoh tanaman sjs yang telah digunakan secara luas untuk memproduksi benih hibrid ialah jagung. Berdasarkan sitoplasmanya, tanaman jagung digolongkan ke dalam empat kelompok, yaitu N (Normal), C (Charrua), S (USDA), dan T (Texas) (Laughnan dan Gabay-Laughnan, 1983). Sitoplasma T mengandung gen mitokondria T- *urf13* yang menyandi sebuah polipeptida (URF13) sebesar 13 kilodalton (kD) yang terdapat pada membran dalam dari mitokondria. Daerah penyandi T-*urf13* tersusun dari 115 kodon: 88 kodon yang pertama mempunyai homologi dengan daerah pengapit 3' (*3' flanking region*) dari gen penyandi rRNA 26S (*rrn26*), diikuti dengan 9 kodon yang tidak diketahui asalnya (*unknown origin*), dan 18 kodon yang mempunyai homologi dengan daerah penyandi dari *rrn26* (Gambar 2). Selain T-*urf13*, pada tempat lain di dalam mitokondria yang sama terdapat gen *rrn26* yang normal (Levings, 1990).

Pemulihan fertilitas pada tanaman sjs-T ini dapat dilakukan dengan mengintroduksikan gen dominan *Rf1* dan *Rf2* yang berasal dari inti (Laughnan dan Gabay-Laughnan, 1983). Dengan adanya gen *Rf1*, proses transkripsi dari gen



Gambar 2. Gen T-*urf13* pada Jagung Steril Jantan Sitoplasma-T. Kotak horizontal yang sempit menunjukkan daerah 5' dan 3' yang tidak menyandi protein, dan yang lebar menunjukkan daerah penyandi protein; daerah homologi dengan gen mitokondria lainnya ditunjukkan di atas kotak horizontal; ? menunjukkan sekuen DNA yang tidak diketahui asalnya; ↓ menunjukkan situs rekombinasi (Levings, 1990)

T-*urf13* menurun, dan menyebabkan penurunan sekitar 80% polipeptida URF13 (Dewey *et al.*, 1987; Kennell *et al.*, 1987; Kennell dan Pring, 1989). Gen *Rf2* secara terpisah tidak mempengaruhi ekspresi T-*urf13*.

Reversi dari sjs-T ke tanaman fertil jantan berkaitan erat dengan hilangnya gen T-*urf13* (Rottmann *et al.*, 1987; Fauron *et al.*, 1990). Bukti bahwa gen T-*urf13* bertanggung jawab terhadap fenotipe sjs pada tanaman jagung dikuatkan oleh penelitian Chaumont (1993). Chaumont memfusikan gen T-*urf13* dengan presekuen dari subunit *ATP synthase Nicotiana plumbaginifolia*. Presekuen ini menyandi peptida transit yang digunakan untuk mengekspor peptida dari sitoplasma ke dalam mitokondria. Gen kimera ini diintroduksikan ke dalam sel *N. tabacum* dan menghasilkan tanaman steril jantan.

Analisis molekul tanaman sjs juga telah dilakukan pada *Petunia*. Fenotipe sjs pada *Petunia* berkaitan erat dengan proses pengaturan kembali mtDNA (Boeshore *et al.*, 1983, 1985; Clark *et al.*, 1985, 1988; Hanson *et al.*, 1985). Hasil analisis molekul menunjukkan bahwa tanaman *Petunia* sjs mempunyai gen S-*Pcf* yang terdiri dari tiga gen: *Pcf, nad3*, dan *rps12* (Gambar 3). Ketiga gen ini ditranskripsikan secara bersamaan (*co-transcription*) (Young dan Hanson, 1987; Rasmussen dan Hanson, 1989). Gen *Pcf* itu sendiri merupakan gen kimera yang terdiri dari sekuen penyandi 35 asam amino yang pertama dari subunit 9 *ATP synthase*, dua sekuen ekson penyandi subunit II *cytochrome c oxydase* (69 dan 89 asam amino), dan sekuen kerangka bacaan terbuka (*ORF= open reading frame*) yang tidak teridentifikasi. Kerangka bacaan terbuka ini disebut *urfS (unidentified reading frameS)* yang menyandi 205 asam amino. Ekspresi gen kimera ini dikontrol oleh sekuen regulator gen *atp9*.

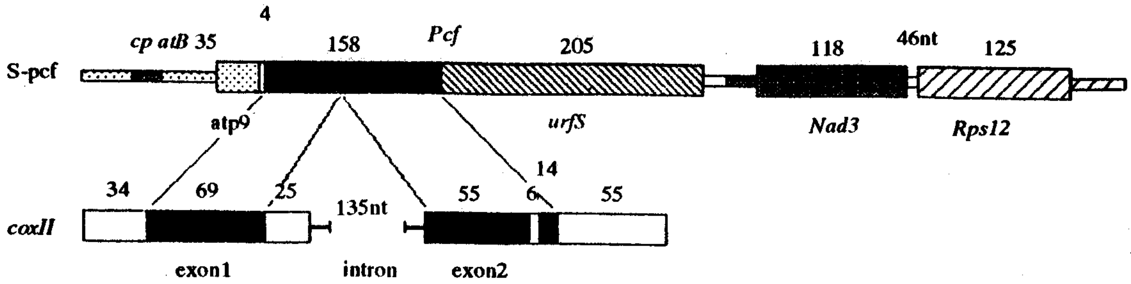
Pemulihan fertilitas pada *Petunia* sjs terjadi karena adanya gen tunggal *Rf* dari inti. Pada jaringan kepala sari, *Rf* ini mempengaruhi ekspresi gen *Pcf* pada tingkat transkripsi (Pruitt dan Hanson, 1991). Rendahnya tingkat transkripsi ini menyebabkan penurunan jumlah protein PCF di dalam kotak sari. Penurunan jumlah protein PCF ini diduga sebagai penyebab terjadinya pemulihan fertilitas pada tanaman tersebut.

Setiap kelainan proses transkripsi dan translasi pada gen mitokondria dapat mengganggu fertilitas jantan pada tanaman. Pada rumput *Lilium perenne*, sterilitas jantan berasosiasi dengan kelainan transkripsi gen *atp6* dan *coxI* (Rouwendal *et al.*, 1992). Pada bit gula (*Beta vulgaris*), fenotipe sjs berhubungan erat dengan adanya kelainan pada gen *coxII* (Senda *et al.*, 1991). Reversi dan pemulihan fertilitas pada buncis (*Phaseolus vulgaris*) sjs diikuti oleh hilangnya fragmen mtDNA sebesar 25 kb (kilo pasangan basa). Fragmen ini mengandung segmen DNA yang tidak diulang pada daerah lain di dalam genom mitokondria tanaman sjs, sehingga diduga fragmen 25 kb ini berasosiasi dengan sifat sjs (Mackenzie dan Chase, 1990).

TANAMAN HIBRID SOMATIK STERIL JANTAN

Hibridisasi somatik melalui fusi protoplas memberi kemungkinan untuk merakit tanaman baru yang mengandung kombinasi bahan genetik intra- atau interspesies, bahkan antar famili, yang tidak dapat dilakukan dengan metode klasik lewat persilangan konvensional.

Sifat steril jantan dapat dipindahkan dari satu spesies ke spesies lainnya. Bannerot *et al.* (1974) telah berhasil menyilangkan lobak (*Raphanus sativus*) steril jantan dengan *B. napus* dan menghasilkan *B. napus* aloplasma steril jantan yang



Gambar 3. Gen *S-pcf* pada *Petunia* Steril Jantan Sitoplasma. Kotak horizontal yang sempit menunjukkan daerah 5' dan 3' yang tidak menyandi protein, dan yang lebar menunjukkan daerah penyandi protein; angka di atasnya menunjukkan jumlah kodon, huruf dibawahnya menunjukkan daerah homologi dengan gen lainnya (modifikasi dari Hanson, 1991)

mempunyai inti sel dari *B. napus* dan sitoplasma dari *R. sativus*. Sifat steril jantan yang diperoleh diikuti oleh kelainan fungsi klorofil akibat adanya ketidak-cocokan antara kloroplas dari *R. sativus* dan inti sel dari *B. napus*. Kelainan ini dapat diperbaiki dengan jalan memfusikan protoplas dari galur steril jantan aloplasma dengan protoplas dari galur fertil (Pelletier *et al.*, 1983). Di antara individu hibrid yang dihasilkan, terdapat tanaman steril jantan yang mempunyai klorofil normal. Tanaman ini mempunyai inti dan kloroplas dari *B. napus*, dan mitokondria dari *R. sativus*. Hal ini menjadi bukti yang menguatkan bahwa mitokondria berperanan penting di dalam menentukan sifat steril jantan.

Jourdan *et al.* (1989) telah berhasil menggabungkan sifat steril jantan dan resistensi terhadap herbisida atrazine dengan teknik hibridisasi somatik untuk merakit *B. napus* sintetik diploid (2n=2x=19). Fusi protoplas antara *B. oleracea* ssp. *botrytis* (n=9), yang membawa sitoplasma Ogura yang mengandung sifat steril jantan pada mitokondrianya, dan *B. campestris ssp. oleifera* cv. Candle (n=10) yang membawa sifat resistensi terhadap atrazine pada kloroplasnya, menghasilkan hibrid yang mengandung mitokondria dari *B. campestris* dan kloroplas dari *B. oleracea*. Tanaman hasil fusi ini mempunyai sifat steril jantan dan resisten terhadap atrazine. Proses eliminasi mitokondria dari *B. oleracea* dan kloroplas dari *B. campestris* belum diketahui mekanismenya.

Sifat steril jantan pada tanaman sebagai akibat dari ketidakcocokan antara inti dengan sitoplasma, khususnya mitokondria, dapat diperoleh melalui fusi protoplas tanpa harus diikuti silang balik berulang kali yang memakan banyak waktu seperti yang dijumpai pada sistem aloplasma untuk mempertahankan salah satu inti sel dari induknya. Melchers *et al.* (1992) telah memanfaatkan fenomena ketidakcocokan ini untuk mendapatkan tanaman tomat steril jantan yang mengandung inti dari Lycopersicon esculentum (tomat) dan sitoplasma dari *Solanum acaule* atau *S. tuberosum* (kentang). Untuk mendapatkannya, protoplas dari *L. esculentum*, yang sebelumnya telah diperlakukan dengan iodoasetamida untuk merusak mitokondria, difusikan dengan protoplas dari *S. acaule* atau *S. tuberosum*, yang sebelumnya telah diiradiasi dengan sinar X atau sinar untuk merusak inti sel. Tanaman hibrid somatik asimetrik yang dihasilkan mempunyai morfologi, fisiologi dan jumlah kromosom yang sama dengan *L. esculentum*, tetapi mempunyai tingkat fertilitas jantan yang bervariasi: fertil, semi-fertil, dan steril. Sifat steril jantan yang diperoleh dengan metode ini diwariskan ke generasi berikutnya melalui jalur induk betina.

TANAMAN STERIL JANTAN HASIL REKAYASA GENETIKA

Tanaman transgenik pertama lahir pada tahun 1983 oleh kelompok peneliti M. van Montagu dan J. Schell (de Block *et al.*, 1984) yang mengintroduksikan gen resisten terhadap antibiotik kanamisin ke dalam sel tanaman tembakau dengan perantaraan T-DNA dari *Agrobacterium tumefaciens*. Tanaman transgenik ini mempunyai pertumbuhan yang normal, baik secara vegetatif maupun generatif, resisten terhadap kanamisin, dan sifat resisten ini diwariskan ke generasi berikut-nya. Sejak saat itu rekayasa genetika mulai memberikan banyak warna pada bidang pertanian, termasuk untuk mendapatkan tanaman transgenik steril jantan. Beberapa strategi untuk mendapatkan tanaman steril jantan melalui rekayasa genetika akan dibahas di bawah ini.

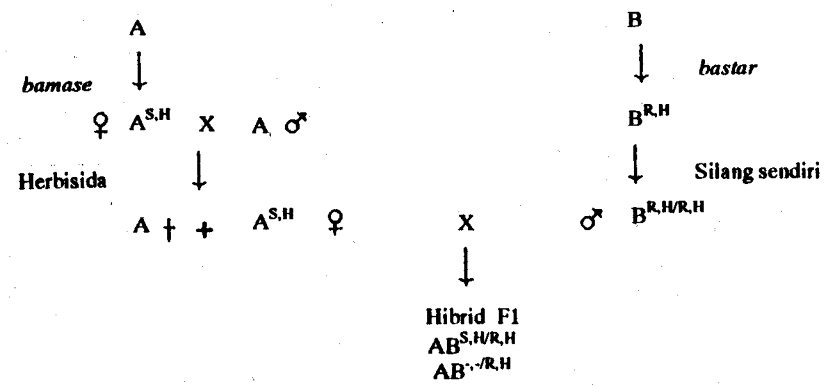
Mariani *et al.* (1990) merakit tanaman transgenik steril jantan nukleus dengan menggunakan gen *RNase* yang diekspresikan di dalam sel tapetum. Ekpresi gen *RNase* di dalam sel tapetum akan menyebabkan sel ini tidak dapat mensintesis protein karena semua RNA hasil transkripsi didegradasi oleh enzim ribonuklease. Akibatnya, proses metabolisme pada sel tersebut akan mengalami kegagalan. Gen *RNase* yang digunakan ialah *barnase* yang diisolasi dari *Bacillus amyloliquefaciens* (Hartley, 1988, 1989). Gen ini difusikan dengan promoter spesifik untuk sel tapetum dari kepala sari TA29 (Koltunow *et al.*, 1990; Seurinck *et al.*, 1990). Gen *bar* yang menyebabkan resisten terhadap herbisida Basta, digunakan sebagai gen penanda selektif. Gen kimera ini diintroduksikan ke dalam tanaman tembakau dan *B. napus* dengan perantara *A. tumefaciens*. Transformasi ini menghasilkan tanaman transgenik steril jantan. Sifat steril jantan ini diwariskan ke generasi berikutnya dengan mengikuti hukum mendel dan merupakan sifat yang dominan.

Untuk melakukan pemulihan fertilitas dari tanaman steril jantan ini, Mariani *et al.* (1992) merakit tanaman transgenik yang mengandung gen *barstar* yang diisolasi dari *B. amyloliquefaciens* (Hartley, 1988, 1989). Gen *barstar* menyandi sebuah protein inhibitor untuk RNase. Gen *barstar* difusikan dengan promoter TA29. Gen kimera ini juga difusikan dengan gen penanda selektif *bar*, kemudian diintroduksikan ke dalam tanaman melalui *A. tumefaciens*. Transformasi ini menghasilkan tanaman transgenik yang mempunyai fertilitas jantan normal. Dengan menyilangkan tanaman yang mengandung gen *barstar* sebagai tetua jantan dan yang mengandung gen *barnase* sebagai tetua betina, diperoleh tanaman F1 yang fertil. Strategi untuk mendapatkan tanaman steril jantan ini dikonfirmasi oleh Denis *et al.* (1993) pada *B. napus*. Aplikasi dari strategi ini di dalam produksi benih hibrid F1disajikan pada Gambar 4.

Strategi lain untuk mendapatkan tanaman steril jantan yaitu dengan menggunakan teknik RNA antisense. Ekspresi RNA antisense dilakukan dengan mengekspresikan utas DNA pendamping dari gen yang bersangkutan, atau mengekspresikan gen dengan arah yang berlawanan dari arah transkripsi yang normal. Ekspresi gen dengan arah terbalik ini dapat menetralkan ekspresi gen yang bersangkutan. *Chalcone synthetase* yang disandi oleh gen *chs*, merupakan enzim penting untuk biosintesis flavonoid yang berlangsung di dalam sel tapetum (Herdt *et al.*, 1978; Kehrel dan Wiermann, 1985 ; Beerhues *et al.*, 1989). Gangguan pada proses biosintesis flavonoid akan menyebabkan gangguan pada proses mikrosporogenesis yang dapat mengakibatkan tanaman menjadi steril jantan.

Ekspresi gen *chs* antisense di dalam jaringan kepala sari menghambat sintesis flavonoid. Ketidakhadiran flavonoid di dalam sel mikrosporosit menyebabkan terhentinya pertumbuhan sel ini sehingga tanaman tidak mampu menghasilkan serbuk sari yang hidup (van der Meer *et al.*, 1992). Untuk mengekspresikan gen ini di dalam jaringan kepala sari, gen *chs* antisense difusikan dengan promoter *35S* CaMV yang telah mengalami modifikasi sehingga dapat mengontrol ekspresi gen pada jaringan tersebut. Modifikasi promoter ini dilakukan dengan menyisipkan sekuen DNA *synthetic anther box* (van Tunen *et al.*, 1990). Gen kimera ini diintroduksikan ke dalam tanaman *Petunia hybrida* dan menghasilkan tanaman steril jantan.

Ekspresi gen *rolC* yang diisolasi dari T-DNA *A. rhizogenes* strain A4 dibawah kontrol promoter *35S* CaMV



Gambar 4. Strategi Penggunaan Gen Pengontrol Fertilitas Jantan dalam Produksi Benih Hibrid. A. Induk betina, B. Induk jantan, S. Gen *barnase* penyandi steril jantan, R. Gen pemulih fertilitas jantan *barstar*, H. Gen resisten terhadap herbisida Basta. Induk betina $A^{S,H}$ diperbanyak dengan silang balik menggunakan tanaman nontransgenik, keturunannya diseleksi dengan perlakuan herbisida Basta. Induk jantan B dijadikan homozigot dan diperbanyak dengan silang sendiri (modifikasi dari Leemans, 1992)

pada tembakau menyebabkan tanaman menjadi steril jantan yang diikuti oleh penurunan: tinggi tanaman, dominansi apikal, dan pigmentasi daun. Sifat-sifat ini diwariskan ke generasi berikutnya sebagai sifat yang dominan dengan mengikuti hukum Mendel (Schmülling *et al.*, 1988). Tanaman steril jantan ini dapat dipulihkan kembali fertilitasnya dengan menyilangkannya dengan tanaman yang mengekspresikan gen *rolC* antisense, atau dengan mengekspresikan gen *rolC* antisense pada tanaman yang mengekspresikan gen *rolC*. Pemulihan fertilitas ini diikuti oleh pemulihan tinggi tanaman, dominansi apikal dan pigmentasi daun (Schmülling *et al.*, 1993). Hal ini menunjukkan bahwa ekspresi gen *rolC* dihambat oleh ekspresi gen *rolC* antisense.

Cara lain untuk mendapatkan tanaman steril jantan yaitu dengan mengekspresikan secara dini gen *PR (pathogenesis-related) glucanase* yang telah mengalami modifikasi di dalam jaringan kepala sari. Untuk itu, gen *PR glucanase* difusikan dengan promoter A3 atau A9 (Scott *et al.*, 1991; Paul *et al.*, 1992) dan diintroduksikan ke dalam tembakau (Worrall *et al.*, 1992). Enzim -1,3-glukanase hasil ekspresi gen *PR glucanase* termodifikasi yang disekresikan secara dini mendegradasi kalos setelah profase I, sehingga sel-sel meiosit (*meiocyte*) akan kehilangan kalos. Hal ini menyebabkan terganggunya proses pembentukan dinding sel mikrospora, walaupun proses meiosis dan pembelahan sel berlangsung normal.

Strategi lain untuk mendapatkan tanaman steril jantan didasari oleh penelitian terdahulu tentang proses biosintesis energi mitokondria (*mitochondrial energetic biosynthesis*) yang terjadi pada membran dalam dari mitokondria dan fenomena alam *RNA editing*. Setiap modifikasi yang terjadi pada salah satu kompleks polipeptida untuk biosintesis energi pada membran dalam dari mitokondria dapat menurunkan produksi ATP. Penurunan ini dapat menyebabkan gangguan pada proses mikrosporogenesis sehingga tanaman menjadi steril jantan. ATP9 merupakan salah satu penyusun kompleks *FoF1 ATP synthase* yang merupakan saluran bagi proton. Aliran proton (H^+) dari ruang inter membran ke dalam matriks melalui kompleks *FoF1 ATP synthase* akan menyebabkan terbentuknya molekul ATP dari ADP dan fosfat. Dengan memodifikasi gen penyandi protein ini, maka proses aliran proton akan terganggu. Pada tanaman gandum fertil, gen *atp9* diekspresikan melalui proses *editing* yang berlangsung setelah transkripsi mRNA (*post-transcription editing*), sedangkan pada tanaman sjs, gen *atp9* tidak mengalaminya (Bégu *et al.*, 1990). Dengan dasar ini disimpulkan bahwa ekspresi gen *atp9* yang tidak mengalami pengeditan (*non-edited atp9 gene*) akan menghasilkan protein yang tidak berfungsi. Introduksi gen *atp9* yang tidak mengalami pengeditan yang difusikan dengan presekuen *coxIV* dari khamir ke dalam inti sel dibawah kontrol promoter *35S* CaMV dengan metode transfer gen secara langsung menggunakan PEG 4000 (Paszkowski *et al.*, 1984) menghasilkan tanaman tembakau steril jantan (Araya *et al.*, 1993; Hernould *et al.*, 1993; Suharsono, 1993).

KESIMPULAN DAN PERSPEKTIF

Tanaman steril jantan sangat bermanfaat bagi pemuliaan tanaman terutama untuk menghasilkan benih hibrid F1. Tanaman ini dapat dihasilkan baik dengan menggunakan metode konvensional melalui persilangan seksual, dengan hibridisasi somatik, maupun dengan rekayasa genetika. Pemilihan strategi untuk mendapatkan tanaman jantan steril bergantung tujuan, jenis tanaman, dan pertimbangan ekonomi. Tanaman transgenik jantan steril sekarang sudah digunakan untuk memproduksi benih hibrid secara besar-besaran seperti jagung dan *oilseed rape* di Eropa dan Amerika, dan akan terus dicoba untuk jenis lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

Araya, A., D. Bégu, P. V. Grave, M. Hernould, S. Litvak, A. Mouras, and S. Suharsono. 1993. Of RNA Editing and Cytoplasmic Male-Sterility in Plants, p. 83-91. *In* A. Brennicke, and U. Kück (ed.), *Plant Mitochondria*. Weinheim, Germany: VCH Verlagsgesellschaft/VCH Publishers.

Bannerot, H., L. Boulidard, Y. Cauderon, and J. Tempé. 1974. Transfer of Cytoplasmic Male Sterility from *Raphanus sativus* to *Brassica oleracea*, p. 52-54. *In Proc. Eucarpia Meeting Cruciferae*. UK: Scottish Hortic. Res. Inst. Intergovrie.

Bedinger, B. 1992. The Remarkable Biology of Pollen. *Plant Cell* 4:879-887.

Beerhues, L., G. Forkmann, H. Schöpker, G. Stotz, and R. Wiermann. 1989. Flavanone 3-hydroxylase and Dihydroflavonol Oxygenase Activities in Anthers of Tulipa. The Signification of the Tapetum Fraction in Flavonoid Metabolism. *J. Plant Physiol.* **133**:743-746.

Bégu, D., P. V. Grave, C. Domec, G. Arselin, S. Litvak, and A. Araya. 1990. RNA Editing of Wheat Mitochondrial ATP Synthase Subunit 9: Direct Protein and cDNA Sequencing. *Plant Cell* **2**:1283-1290.

Belliard, G., G. Pelletier, F. Vedel, and F. Quetier. 1978. Morphological Characteristics and Chloroplast DNA Distribution in Different Cytoplasmic Parasexual Hybrids of *Nicotiana tabacum*. *Mol. Gen. Genet.* **165**:231-237.

Bino, R. J. 1985a. Histological Aspects of Microsporogenesis in Fertile, Cytoplasmic Male Sterile and Restored Fertile *Petunia hybrida*. *Theor. Appl. Genet.* **69**: 423-428.

Bino, R. J. 1985b. Ultrastructural Aspects of Cytoplasmic Male Sterility in *Petunia hybrida*. *Protoplasma* **127**:230-240.

Boeshore, M. L., M. R. Hanson, and S. Izhar. 1985. A Variant Mitochondrial DNA Arrangement Specific to *Petunia* Stable Sterile Somatic Hybrids. *Plant Mol. Biol.* **4**:125-132.

Boeshore, M. L., I. Lifshitz, M. R. Hanson, and S. Izhar. 1983. Novel Composition of Mitochondrial Genomes in *Petunia* Somatic Hybrids Derived from Cytoplasmic Male Sterile and Fertile Plants. *Mol. Gen. Genet.* **190**:459-467.

Burns, J. A. and D. U. Gerstel. 1981. Role of Nucleolar Chromosomes in Anther-Restoration of Male-Sterile Tobacco. *J. Hered.* **72**:413-418.

Chaumont, F. 1993. Caractérisation et Exploitation du Mécanisme d'Import de Protéines dans les Mitochondries de Plantes. PhD Thesis. Belgium: Université Catholique de Louvain.

Clark, E. M., Y. Gafni, and S. Izhar. 1988. Loss of CMS-Specific Mitochondrial DNA Arrangement in Fertile Segregants of *Petunia* hybrids. *Plant Mol. Biol.* **11**:249-253.

Clark, E. M., S. Izhar, and M. R. Hanson. 1985. Independent Segregation of the Plastid Genome and Cytoplasmic Male Sterility in *Petunia* Somatic Hybrids. *Mol. Gen. Genet.* **199**:440-445.

de Block, M., L. Herrera-Estrella, M. van Montagu, J. Schell, and P. Zambryski. 1984. Expression of Foreign Genes in Regenerated Plants and in their Progeny. *EMBO J.* **3**:1681-1689.

Denis, M., R. Delourme, J.-P. Gourret, C. Mariani, and M. Renard. 1993. Expression of Engineered Male Sterility in *Brassica napus*. *Plant Physiol.* **101**: 1295-1304.

Dewey, R. E., C. S. Levings III, and D. H. Timothy. 1986. Novel Recombinations in the Maize Mitochondrial Genome Produce a Unique Transcriptional Unit in the Texas Male Ssterile Cytoplasm. *Cell* **44**:439-449.

Dewey, R. E., D. H. Timothy, and C. S. Levings III. 1987. A Mitochondrial Protein Associated with Cytoplasmic Male Sterility in the T Cytoplasm of Maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:5374-5378.

Edwardson, J. R. 1970. Cytoplasmic Male Sterility. *Bot. Rev.* **36**:341-420.

Fauron, C. M.-R., M. Havlik, and R. I. S. Brettell. 1990. The Mitochondrial Genome Organization of a Maize Fertile CmsT Revertant Lines is Generated through Recombination between Two Sets of Repeats. *Genetics* **124**:423-428.

Forde, B. G., R. J. C. Oliver, an4 C. J. Leaver. 1978. Variation in Mitochondrial Translation Products Associated with Male-Sterile Cytoplasms in Maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**:3841-3845.

Grant, I. 1986. A Comparative Light and Electron Microscopic Study of Microspore and Tapetal Development in Male Fertile and Cytoplasmic Male Sterile Oilseed Rape (*Brassica napus* L.). *Can. J. Bot.* **94**:1055-1068.

Hanson, M. R. 1991. Plant Mitochondrial Mutations and Male Sterility. *Annu. Rev. Genet.* **25**:461-486.

Hanson, M. R., M. Rothenberg, M. L. Boeshore, and H. T. Nivison. 1985. Organelle Segregation and Recombination Following Protoplast Fusion: Analysis of Sterile Cytoplasms, p. 129-144. *In* M. Zaitlin, P. Day, and A. Hollaender (ed.), *Biotechnology in Plant Science*. New York: Acad. Press.

Hartley, R. W. 1988. Barnase and Barstar. Expression of its Cloned Inhibitor Permits Expression of a Cloned Ribonuclease. *J. Mol. Biol.* **202**:913-915.

Hartley, R. W. 1989. Barnase and Barstar: Two Small Proteins to Fold and Fit Together. *Trends Biochem. Sci.* **14**:450-454.

Herdt, E., R. Sütfeld, and R. Wiermann. 1978. The Occurence of Enzymes Involved in Phenylpropanoid Metabolism in the Tapetum Fraction of Anthers. *Eur. J. Cell. Biol.* **17**:433-441.

Hernould, M., S. Suharsono, S. Litvak, A. Araya, and A. Mouras. 1993. Male-Sterility Induction in Transgenic Tobacco Plants with an Unedited *atp9* Mitochondrial Gene from Wheat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:2370-2374.

Heslop-Harrison, J. and A. Mackenzie. 1967. Autoradiography of Soluble (2- ^{14}C) Thymidine Derivatives during Meiosis and Microsporogenesis in *Lilium* Anthers. *J. Cell Sci.* **2**:387-400.

Izhar, S. and R. Frankel. 1971. Mechanisms of Male Sterility in *Petunia*: The Relationship between pH, Callase Activity in the Anthers, and the Breakdown of the Microsporogenesis. *Theor. Appl. Genet.* **41**:104-108.

Jourdan, P. S., E. D. Earle, and M. A. Mutschler. 1989. Synthesis of Male Sterile, Triazine-Resistant *Brassica napus* by Somatic Hybridization between Cytoplasmic Male Sterile *B. oleracea* and Atrazine-Resistant *B. campestris*. *Theor. Appl. Genet.* **78**:445-455.

Kaul, M. L. H. 1988. Male Sterility in Higher Plants, p. 15-95. *In* R. Frankel, M. Grossman, H. F. Linskens, P. Maliga, and R. Riley (ed.), *Monographs on Theoritical and Applied Genetics*, Vol. 10. New York: Springer-Verlag.

Kehrel, B. and R. Wiermann. 1985. Immunochemical Localization of Phenylalanine Ammonia-Lyase and Chalcone Synthase in Anthers. *Planta* **167**:183-190.

Kennell, J. C. and D. R. Pring. 1989. Initiation and Processing of *atp6*, T-*urf13* and *ORF221* Transcripts from Mitochondria of T Cytoplasm Maize. *Mol. Gen. Genet.* **216**:16-24.

Kennell, J. C., R. P. Wise, and D. R. Pring. 1987. Influence of Nuclear Background on Transcription of a Maize Mitochondrial Region Associated with Texas Male Sterile Cytoplasm. *Mol. Gen. Genet.* **210**:399-406.

Koltunow, A. M., J. Truettner, K. H. Cox, M. Wallroth, and R. B. Goldberg. 1990. Different Temporal and Spatial Gene Expression Pattern Occur during Anther Development. *Plant Cell* **2**:1201-1224.

Laughnan, J. R. and S. Gabay-Laughnan. 1983. Cytoplasmic Male Sterility in Maize. *Ann. Rev. Genet.* **17**:27-48.

Leaver, C. J. and M. W. Gray. 1982. Mitochondrial Genome Organization and Expression in Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **33**:373-402.

Leemans, J. 1992. Genetic Engineering for Fertility Control, p. 101-106. *In* Y. Dattée, C. Dumas, and A. Gallais (ed.), *Reproductive Biology and Plant Breeding*. Berlin Heidelberg, Germany: Springer-Verlag.

Levings, C. S. III. 1990. The Texas Cytoplasm of Maize: Cytoplasmic Male Sterility and Disease Susceptibility. *Science* **250**:942-947

Levings, C. S. III and D. R. Pring. 1976. Restriction Endonuclease Analysis of Mitochondrial DNA from Normal and Texas Cytoplasmic Male-Sterile Maize. *Science* **193**:158-190.

Lonsdale, D. M. 1987. Cytoplasmic Male Sterility: a Molecular Perspective. *Plant Physiol. Biochem.* **25**:265-271.

Mackenzie, S. A. and C. D. Chase. 1990. Fertility Restoration is Associated with Loss of a Portion of the Mitochondrial Genome in Cytoplasmic Male-Sterile Common Bean. *Plant Cell* **2**:905-912.

Mariani, C., M. de Beukeleer, J. Truettner, J. Leemans, and R. B. Goldberg. 1990. Induction of Male Sterility in Plants by a Chimaeric Ribonuclease Gene. *Nature* **347**:737-741.

Mariani, C., V. Gossele, M. de Beuckeleer, M. de Block, R. B. Goldberg, W. de Greef, and J. Leemans. 1992. A Chimaeric Ribonuclease-Inhibitor Gene Restores Fertility to Male Sterile Plants. *Nature* **357**:384-387.

Melchers, G., Y. Mohri, K. Watanabe, S. Wakabayashi, and K. Harada. 1992. One-Step Generation of Cytoplasmic Male Sterility by Fusion of Mitochondrial-Inactivated Tomato Protoplasts with Nuclear-Inactivated *Solanum* Protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:6832-6836.

Nivison, H. T., and M. R. Hanson. 1989. Identification of a Mitochondrial Protein Associated with Cytoplasmic Male Sterility in *Petunia*. *Plant Cell* **1**: 1121-1130.

Paszkowski, J., R. D. Shillito, M. Saul, V. Mandák, T. Hohn, and I. Potrykus. 1984. Direct Gene Transfer to Plants. *EMBO J.* 3: 2717-2722.

Paul, W., R. Hodge, S. Smartt, J. Draper, and R. Scott. 1992. The Isolation and Characterisation of Tapetum- Specific *Arabidopsis thaliana A9* Gene. *Plant Mol. Biol.* **19**:611-622.

Pelletier, G., C. Primard, F. Vedel, P. Chetrit, R. Remy, P. Rousselle, and M. Renard. 1983. Intergeneric Cytoplasmic Hybridization in Cruciferae by Protoplast Fusion. *Mol. Gen. Genet.* **191**:244-250.

Pruitt, K. D., and M. R. Hanson. 1991. Transcription of the *Petunia* Mitochondrial CMS-Associated *Pcf* Locus in Male Sterile and Fertility-Restored Lines. *Mol. Gen. Genet.* **227**:348-355.

Rasmussen, J. and M. R. Hanson. 1989. A NADH Dehydrogenase Subunit Gene is Co-Transcribed with the Abnormal *Petunia* Mitochondrial Gene Associated with Cytoplasmic Male Sterility. *Mol. Gen. Genet.* **215**:332-336.

Renard, M., R. Delourme, J. Mesquida, G. Pelletier, C. Primard, L. Boulidard, C. Doré, V. Ruffio, Y. Herve, and J. Morice. 1992. Male Sterilities and F1 Hybrids in *Brassica*, p. 107-119. *In* Y. Dattée, C. Dumas, and A. Gallais (ed.), *Reproductive Biology and Plant Breeding*. Berlin Heidelberg, Germany: Springer-Verlag.

Rosenberg, S. M., and H. T. Bonnett. 1983. Floral Organogenesis in *Nicotiana tabacum*: a Comparison of Two Cytoplasmic Male-Sterile Cultivars with a Male-Fertile Cultivar. *Am. J. Bot.* **70**:266-275.

Rottmann, W. H., T. Brears, T. P. Hodge, and D. M. Lonsdale. 1987. A Mitochondrial Gene is Lost via Homologous Recombination during Reversion of CMS T Maize Fertility. *EMBO J.* **6**:1541-1546.

Rouwendal, G. J. A., J. Creemers-Molenaar, and F. A. Krens. 1992. Molecular Aspects of Cytoplasmic Male Sterility in Perennial Ryegrass (*Lolium perenne* L.): mtDNA and RNA Differences between Plants with Male-Sterile and Fertile Cytoplasm and Restriction Mapping of their *atp6* and *coxI* Homologous Regions. *Theor. Appl. Genet.* **83**:330-336.

Schmülling, T., H. Rohrig, S. Pilz, R. Walden, and J. Schell. 1993. Restoration of Fertility by Antisense RNA in Genetically Engineerd Male Sterile Tobacco Plants. *Mol. Gen. Genet.* **237**:385-394.

Schmülling, T., J. Schell, and A. Spena. 1988. Single Genes from *Agrobacterium rhizogenes* Influence Plant Development. *EMBO J.* **7**:2621-2629.

Scott, R., E. Dagless, R. Hodge, W. Paul, I. Soufleri, and J. Draper. 1991. Pattern of Gene Expression in Developing Anthers of *Brassica napus*. *Plant Mol. Biol.* **17**:195-207.

Senda, M., T. Harada, T. Mikami, M. Sugiura, and T. Kinoshita. 1991. Genomic Organization and Sequence Analysis of the Cytochrome Oxidase Subunit II Gene from Normal and Male-Sterile Mitochondria in Sugar Beet. *Curr. Genet.* **19**:175-181.

Seurinck, J., J. Truettner, and R. B. Goldberg. 1990. The Nucleotide Sequence of an Anther Specific Gene. *Nucl. Acids Res.* **18**:3403.

Suharsono. 1993. Effet du Gène Mitochondrial *atp9* Non-édité Sur la Fertilité, Chez des Plantes Transgéniques de *Nicotiana tabacum*. PhD Thesis. France: Université de Bordeaux II.

van der Meer, I. M., M. E. Stam, A. J. van Tunen, J. M. N. Mol, and A. R. Stuitje. 1992. Antisense Inhibition of Flavonoid Biosynthesis in *Petunia* Anthers Results in Male Sterility. *Plant Cell* **4**:253-262.

van Tunen, A. J., L. A. Mur, G. S. Brouns, J.-D. Riemstra, R. E. Koes, and J. M. N. Mol. 1990. Pollen- and Anthers-Specific *chi* Promoters from Petunia: Tandem Promoter Regulation of the *chiA* Gene. *Plant Cell* **2**:393-401.

Waterkeyn, L. 1962. Les Parois Microsporocytaires de Nature Callosique chez *Helleborus* et *Tradescantia*. *Cellule* **62**:225-255.

Waterkeyn, L., and A. Beinfait. 1970. On a Possible Function of the Callosic Special Wall in *Ipomoea purpurea* (L.) Roth. *Grana* **10**:13-20.

Wise, P. R., D. R. Pring, and B. G. Gengenbach. 1987. Mutation to Male Fertility and Toxin Insensitivity in Texas (T)-Cytoplasm Maize is Associated with a Frameshift in a Mitochondrial Open Reading Frame. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:2858-2862.

Worrall, D., D. L. Hird, R. Hodge, W. Paul, J. Draper, and R. Scott. 1992. Premature Dissolution of the Microsporocyte Callose Wall Causes Male Sterility in Transgenic Tobacco. *Plant Cell* **4**:759-771.

Young, E. G., and M. R. Hanson. 1987. A Fused Mitochondrial Gene Associated with Cytoplasmic Male Sterility in Developmentally Regulated. *Cell* **50**:41-49.