

Pengaruh L-Sistein terhadap Efisiensi Transformasi Genetik Jagung (*Zea mays*)
Menggunakan *Agrobacterium*

The Effect of L-Cysteine on the Efficiency of Agrobacterium-mediated Transformation of Maize (Zea mays)

Setyo Dwi Utomo¹

Diterima 11 Mei 2005/Disetujui 28 Oktober 2005

ABSTRACT

An efficient procedure of genetic transformation ultimately can accelerate the process of cultivar development of maize. The objective of this study was to evaluate the effect of L-cysteine added to co-cultivation medium on the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of two genotypes of maize. Explants of immature embryos were isolated from immature ears genotypes Hi-II and Tom Thumb harvested 11-13 days after pollination. Then explants were inoculated with *Agrobacterium* strain C58C1 carrying pPTN345 vector and cultured in co-cultivation medium for 2 days then on delay medium for 14 days, on selection medium for 4 x 14 days, on regeneration medium, and finally on germination medium. Co-cultivation media contained either 0 or 100 mg/L L-cysteine. Based on assay at 2 days after inoculation, the transient expression of GUS at scutelar side of explants co-cultivated on medium containing 100 mg/L cysteine was higher than that of the control (0 mg/L cysteine). Transient expression of GUS on the explants of Tom Thumb was higher than that of Hi-II. However, transgenic plants in this study were only produced from Hi-II explants co-cultivated in a medium amended with 100 mg/L L-cysteine. No transgenic plants was produced from explants of Tom Thumb due to low efficiency of induction of embryogenic calli. The efficiency of transformation using explants of Hi-II cocultivated in a medium amended with 100 mg/L L-cysteine was 4 independent transformants or transgenic plants out of 70 explants inoculated or 5.7%.

Key words: *Agrobacterium tumefaciens*, corn, L-cysteine, Hi-II, Tom Thumb

PENDAHULUAN

Perakitan varietas unggul jagung melalui pendekatan biologi molekuler dapat dipermudah jika menggunakan protokol transformasi genetik yang efisien. Transformasi genetik jagung telah berhasil dilakukan menggunakan elektroporasi (D'Halluin *et al.*, 1992), penembak biolistik (Gordon-Kamm *et al.*, 1990; Frame *et al.*, 2000; Sutrisno *et al.*, 2000), dan *Agrobacterium tumefaciens* (Ishida *et al.*, 1996; Negrotto *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 1998; Frame *et al.*, 2002). Transformasi menggunakan *Agrobacterium* lebih disenangi daripada menggunakan penembak biolistik karena penggunaan *Agrobacterium* menghasilkan proporsi transgen tereksresi yang lebih besar dengan jumlah alel atau kopi yang lebih rendah (Ishida *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 1998). Walaupun dengan efisiensi rendah, tanaman jagung transgenik telah berhasil diperoleh melalui transformasi

menggunakan *Agrobacterium* dari eksplan A188 dan Hi-II yang diinokulasi menggunakan strain C58C1 (Dr. Thomas E. Clemente, *University of Nebraska-Lincoln*, Amerika Serikat, data tidak dipublikasi; Utomo, 2004). Hi-II adalah hibrida dari A188 x B73 (Armstrong *et al.*, 1991). Transformasi di *University of Nebraska-Lincoln* tersebut menggunakan eksplan embrio zigotik muda yang diinduksi untuk menghasilkan kalus embriogenik Tipe II (Armstrong dan Green, 1985).

Sel-sel kalus jagung yang diinfeksi *Agrobacterium* sel karena respon hipersensitif atau apoptosis (Hansen, 2000). Respon tersebut dimediasi oleh ledakan oksidatif berupa produksi oksigen reaktif dalam jumlah banyak dalam waktu singkat (Wojtaszek, 1997). Antioksidan *dithiothreitol* dan *polyvinylpyrrolidone* (PVP) dilaporkan mengurangi pengaruh negatif tersebut dan meningkatkan efisiensi transformasi pada anggur (*Vitis vinifera*) (Perl *et al.*, 1996). Pengaruh yang sama juga dilaporkan untuk antioksidan L-sistein pada kedelai

¹ Staf Pengajar jurusan Budidaya Pertanian dan Kepala Laboratorium Bioteknologi Pertanian Fak. Pertanian Univ. Lampung, Jl. S. Brodjonegoro 1 Bandar Lampung 35145
Telp. 0721 781820 Fax. 0721 770347, e-mail: sduto2002@yahoo.com

(Olhoft dan Somers, 2001; Olhoft *et al.*, 2001; Olhoft *et al.*, 2003) dan jagung (Frame *et al.*, 2002). Dengan demikian, diharapkan efisiensi transformasi genetik jagung dapat ditingkatkan dengan cara menambahkan L-sistein pada media kokultivasi. Penelitian ini bertujuan mengevaluasi pengaruh pemberian L-sistein pada media kokultivasi terhadap efisiensi transformasi jagung genotipe Hi-II dan Tom Thumb menggunakan *Agrobacterium*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan dari bulan Agustus – Desember 2002 di *Plant Transformation Core Research Facility, University of Nebraska (PTCRF-UNL)*, Lincoln, Nebraska, Amerika Serikat.

Bahan Tanaman dan Eksplan.

Embrio zigotik muda (1.5 – 2.0 mm) genotipe Hi-II (Armstrong *et al.*, 1991) dan Tom Thumb (Bass *et al.*, 2001) digunakan sebagai eksplan dalam penelitian ini. Hi-II adalah hibrida dari A188 x B73. Walaupun sifat Agronomis A188 tidak disenangi di Amerika Serikat, eksplan A188 dapat diinduksi membentuk kalus embriogenik Tipe II dengan efisien; dan sifat tersebut diwariskan secara aditif kepada keturunan hasil persilangan (Wilkinson dan Thompson, 1987). B73 adalah inbrida elit di Amerika Serikat. Tom Thumb dipilih sebagai salah satu sumber eksplan dalam penelitian ini karena berumur pendek, tongkol masak dapat dipanen pada umur 2 bulan. Embrio tersebut diisolasi dari tongkol muda yang dipanen 11 – 13 hari setelah polinasi. Tongkol dipanen dari tanaman yang dibudidayakan di rumah kaca.

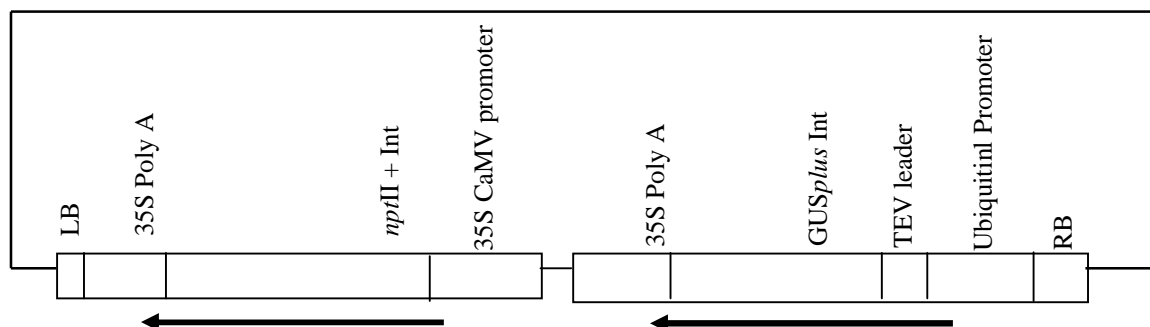
Sebelum embrio diisolasi, tongkol yang telah dikupas (tanpa kelobot) disterilisasi permukaan (dengan cara merendam-kocok) selama 20 menit pada larutan 20% Chlorox (5.5% NaClO) yang ditambah Tween 20 2

tetes/L. Tongkol kemudian dibilas tiga kali menggunakan air akuades steril. Bagian distal biji jagung muda yang masih menempel pada tongkol dipotong sedalam 1 mm menggunakan pisau skalpel no. 22. Embrio zigotik muda dicungkil dari dasar biji menggunakan ujung spatula.

Strain *Agrobacterium* dan Persiapan Inokulum.

Strain *Agrobacterium tumefaciens* yang digunakan dalam penelitian ini adalah C58C1 (Koncz dan Schell, 1986) yang membawa vektor transformasi pPTN345 (Gambar 1). C58C1 membawa kromosom C58 (tipe nopaline) dan Ti-plasmid pMP90 (tipe nopaline). Vektor tersebut dikonstruksi oleh Dr. Thomas E. Clemente dari PTCRF-UNL. pPTN345 membawa T-DNA yang terdiri dari kaset GUS*plus*-Int dan *nptII* untuk ketahanan terhadap kanamisin atau paramomisin. Kaset GUS*plus*-Int terdiri dari promoter *Ubiquitin1*, GUS*plus*-Int, dan terminator polyA dari CaMV 35S. GUS*plus*-Int terdiri dari gen GUS*plus* ditambah intron dari gen *caster bean catalase*. Gen GUS*plus* diisolasi dari *Staphylococcus* (<http://www.cambia.org>). Penambahan intron tersebut berfungsi mencegah ekspresi GUS dalam sel *Agrobacterium*. Kaset *nptII* + Int terdiri promoter CaMV 35S, *nptII* + Int, dan terminator polyA dari CaMV 35S.

Persiapan *Agrobacterium* dimulai dengan menumbuhkan bakteri dalam 50 ml media LB cair (10 g/L tripton, 5 g/L ekstrak ragi, dan 10 g/L NaCl) yang mengandung 50 mg/L rifampisin, 50 mg/L gentamisin, dan 75 mg/L khloramfenikol selama 8-9 jam dalam inkubator 250 rpm, 28 C. Kemudian sel di-suspensi pada media AB minimal (5 g/L glukosa, 4 g/L larutan penyangga AB, 50 mL/L garam AB, 3 mM MES, dan 200 µM asetosiringon) dengan OD₆₅₀ = 0.2 dan diinkubasi selama 12-14 jam. Sel dipanen dan disuspensikan dalam media inokulasi cair. Kepadatan populasi sel disesuaikan sehingga OD₆₅₀ berkisar antara 0.6 – 0.8.



Gambar 1. Skema T-DNA vektor transformasi pPTN345 yang membawa kaset gen *nptII* + Int dan kaset GUS*plus*-Int. Vektor berukuran 13452 bp. Kaset GUS*plus*-Int terdiri dari promoter *Ubiquitin1*, *TEV leader*, GUS*plus*-Int, dan terminator polyA dari CaMV 35S. GUS*plus*-Int terdiri dari gen GUS*plus* ditambah intron dari gen *caster bean catalase*. Gen GUS*plus* diisolasi dari *Staphylococcus* (<http://www.cambia.org>).

Media untuk Transformasi Genetik Jagung dan Perlakuan L-sistein

Media inokulasi, kokultivasi, tunda, dan seleksi mengandung garam-garam dan vitamin-vitamin N6 (Chu *et al.*, 1975), 1 mg/L 2,4-D, 25 mM prolin, 2% sukrosa, 100 mg/L asam kasamino. Modifikasi dilakukan sebagai berikut: media inokulasi dan kokultivasi mengandung setengah konsentrasi dari garam-garam dan vitamin-vitamin yang dilengkapi dengan 1% glukosa, 20 mM MES, dan 200 µM asetosiringon, dengan pH 5.4; media tunda (*delay medium*) mengandung 1.7 mg/L AgNO₃, 50 mg/L carbenicillin, and 3 mM MES (pH 5.8); media seleksi meliputi media tunda yang dilengkapi dengan 100 mg/L paramomisin. Penambahan 2,4-D pada media tunda dan media seleksi dimaksudkan untuk menginduksi kalus embriogenik tipe II (Armstrong dan Green, 1985). Penggunaan antibiotika paramomisin 100 mg/L sebagai agen penyeleksi didasarkan pada studi efikasi (data tidak dipublikasi) yang dilakukan oleh Dr. Thomas E. Clemente (PTCRF-UNL) dan Dr. Stephen Moose (*Dept. Crop Science, University of Illinois, Urbana-Champaign, Illinois, USA*); seleksi menggunakan paramomisin lebih efektif daripada menggunakan kanamisin. Kalus embriogenik yang tumbuh pada media seleksi selama 4 x 14 hari (4 kali sub-kultur, masing-masing selama 14 hari) dikategorikan kalus transgenik putatif. Untuk mendapatkan plantlet transgenik, kalus transgenik dikulturkan pada media regenerasi untuk maturasi embrio dan pengecambahan. Media pengecambahan merupakan media MS tanpa zat pengatur tumbuh.

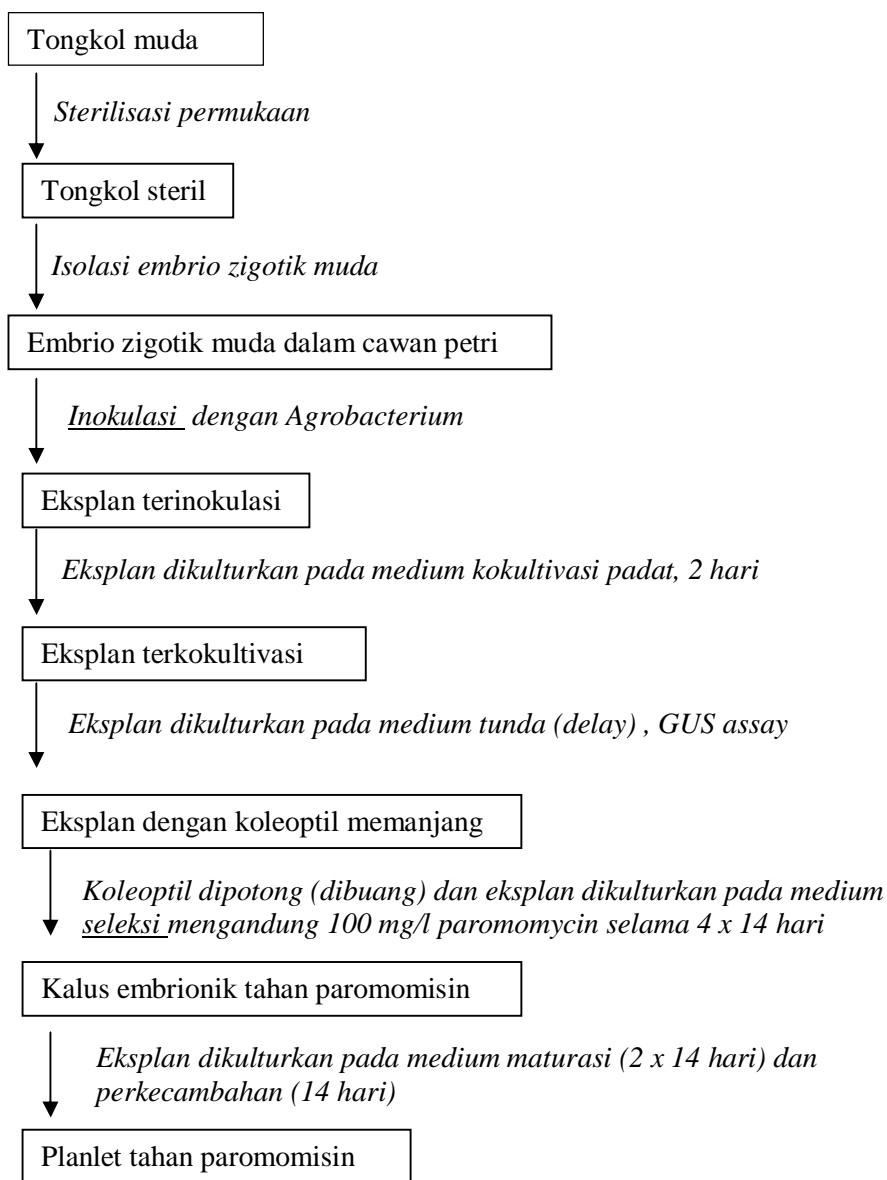
Antioksidan L-sistein ditambahkan pada media kokultivasi. Dalam penelitian ini, dibandingkan dua taraf konsentrasi L-sistein, yaitu 0 dan 100 mg/L. Konsentrasi L-sistein lebih dari 100 mg/L tidak digunakan dalam penelitian ini karena konsentrasi L-sistein yang tinggi dilaporkan menghambat regenerasi (Frame *et al.*, 2002).

Inokulasi, kokultivasi, kultur pada media tunda, dan kultur pada media seleksi

Skema garis besar tahap-tahap transformasi genetik jagung diuraikan pada Gambar 2. Tongkol muda yang digunakan pada awal percobaan terdiri dari 12 tongkol Hi-II dan 5 tongkol Tom Thumb. Data variabel ekspresi transien GUS pada 2 hari setelah

inokulasi (HSI) (Tabel 1) diamati dari 12 tongkol Hi-II dan 5 tongkol Tom Thumb. Karena sebagian eksplan terkontaminasi setelah dipindahkan ke media tunda, data variabel-variabel yang dicantumkan pada Tabel 2 diamati dari 7 tongkol Hi-II dan 2 tongkol Tom Thumb. Eksplan embrio muda yang diisolasi dari satu tongkol dibagi dua, yaitu untuk kokultivasi pada media kokultivasi yang mengandung 0 dan 100 mg/L L-sistein. Data jumlah embrio yang diinokulasi per tongkol bervariasi, tercantum pada Tabel 2 kolom 4. Eksplan embrio muda yang diisolasi dari tongkol dikumpulkan dalam cawan petri berisi media inokulasi cair. Media inokulasi tersebut kemudian dihisap dengan pipet untuk dibuang dan diganti dengan suspensi *Agrobacterium*. Eksplan direndam dalam suspensi *Agrobacterium* selama 5 menit yang selanjutnya suspensi dibuang dengan cara dihisap menggunakan pipet. Eksplan selanjutnya dikulturkan selama 2 hari pada media kokultivasi padat, dengan cara menghadapkan sisi aksilar ke bawah bersentuhan dengan permukaan media. Eksplan kemudian dikulturkan pada media tunda selama 14 hari. Koleoptil yang memanjang dipotong pada 4-5 hari setelah inokulasi (HSI). Jaringan mati dibuang pada saat dilakukan transfer antar-media atau sub-kultur. Jumlah eksplan yang membentuk kalus embriogenik tipe II diamati (dihitung) pada 14 HSI. Pada 16 HSI, kalus embriogenik dipindahkan ke media seleksi yang mengandung 100 mg/L paramomisin. Pada 30 HSI, kalus embriogenik yang tumbuh pada media seleksi tersebut disubkultur atau dipindahkan ke media seleksi yang mengandung 100 mg/L. Kalus embriogenik yang terseleksi (tumbuh pada media seleksi) dipindahkan lagi ke media seleksi pada 44, 58, dan 74 HSI. Kalus embriogenik yang tumbuh pada medium seleksi selama 4 x 14 hari dipindahkan ke media regenerasi untuk maturasi selama 2 x 14 hari dan pengecambahan selama 14 hari. Planlet diaklimatisasi dan ditanam di rumah kaca. Dalam proses pemindahan antarmedia, kalus embriogenik dari satu eksplan tetap disatukan sehingga tidak tercampur dengan kalus dari eksplan lain.

Kokultivasi, kultur pada media tunda, media seleksi, dan media maturasi dilakukan dalam ruang gelap bersuhu 24 C. Kultur pada media perkecambahan dilakukan dalam ruang bersuhu 24 C, 18 jam terang (intensitas cahaya 80 µmol/detik/m²) dan 6 jam terang per hari.



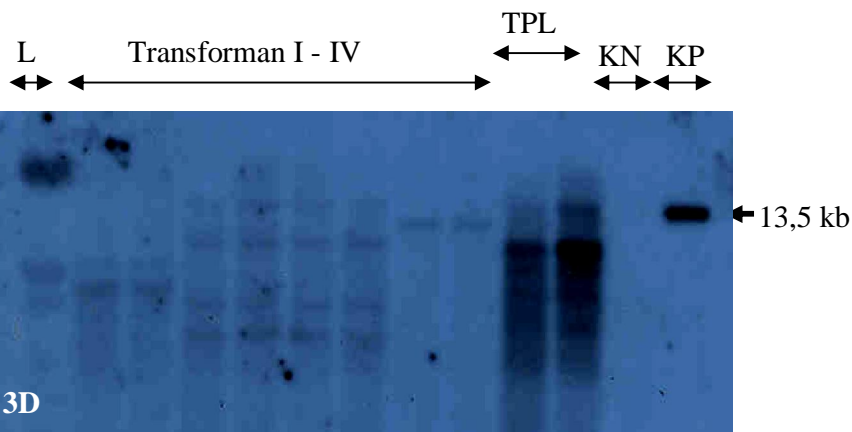
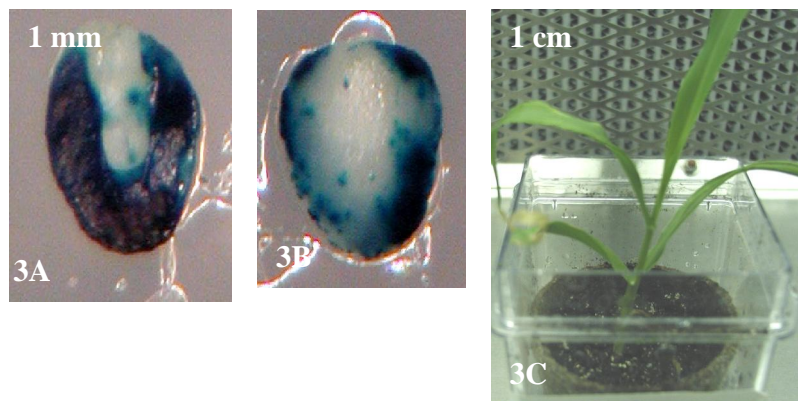
Gambar. 2. Bagan alur transformasi genetik jagung menggunakan *Agrobacterium*. Teks tercetak miring menguraikan tahap-tahap aktivitas, sedangkan teks dalam kotak menguraikan hasil antara dari tiap tahap aktivitas

Tabel 1. Pengaruh konsentrasi L-sistein dan genotipe jagung terhadap ekspresi transien GUS pada sisi skutelar dan aksilar ekplan embrio muda, diamati 2 hari setelah inokulasi (HSI)

Variabel	Konsentrasi L-sistein pada media kokultivasi padat	Genotipe jagung	Skor ekspresi transien GUS		Jumlah sampel ekplan embrio zigotik muda yang menunjukkan skor ekspresi transien GUS			
			Nilai tengah	Galat baku	Total	yang menunjukkan skor ekspresi transien GUS		
						≥ 3	≥5	≥7
Ekspresi transien GUS pada sisi skutelar 2 HSI	0	Hi-II	0.90	0.19	29	1 (3%)	1 (3%)	0
		Tom Thumb	1.15	0.23	20	3 (15%)	0	0
	100	Hi-II	1.82	0.25	22	3 (14%)	1 (5%)	0
		Tom Thumb	2.93	0.59	14	6 (43%)	2 (14%)	1 (7%)
Ekspresi transien GUS pada sisi aksilar 2 HSI	0	Hi-II	2.56	0.48	29	18 (62%)	11 (38%)	7 (24%)
		Tom Thumb	4.05	0.71	20	11 (55%)	9 (45%)	5 (25%)
	100	Hi-II	5.91	0.59	23	18 (78%)	16 (70%)	9 (39%)
		Tom Thumb	4.29	0.81	14	9 (64%)	7 (50%)	3 (21%)

Tabel 2. Pengaruh konsentrasi L-sistein terhadap proporsi ekplan Hi-II dan Tom Thumb yang membentuk kalus embriogenik dan proporsi ekplan yang menghasilkan tanaman transgenik putatif.

Genotipe Jagung	Konsentrasi L-sistein (mg/L)	Nomor tongkol	Jumlah ekplan diinokulasi	Ekplan yang menghasilkan kalus embriogenik dlm media tunda (tanpa seleksi paramomisin) pada 14 HSI		Ekplan yang menghasilkan kalus embriogenik yang tumbuh pada media mengandung 100 mg/L paramomisin, 72 HSI		Ekplan yang menghasilkan tanaman transgenik putatif yaitu bereaksi positif dalam asai histokimia GUS pada 128 HSI		Ekplan yang menghasilkan tanaman transgenik putatif yaitu bereaksi positif dalam asai NPTII ELISA pada 128 HSI	
				Jumlah	Proporsi (%)	Jumlah	Proporsi (%)	Jumlah	Proporsi (%)	Jumlah	Proporsi (%)
A	B	C	D	E	E/D	F	F/D	G	G/D	H	H/D
Hi-II	0	138	17	17	100	0	0	0	0	0	0
		140	2	1	75	0	0	0	0	0	0
		141	9	5	56	0	0	0	0	0	0
		142	5	4	80	0	0	0	0	0	0
		143	10	3	30	0	0	0	0	0	0
		149	11	0	0	0	0	0	0	0	0
		150	15	8	53	0	0	0	0	0	0
		Jumlah	69	38	38/69=55%	0	0	0	0	0	0
	100	138	19	19	100	2	10.5	2	10.5	2	10.5
		140	4	1	25	0	0	0	0	0	0
		141	9	4	44	1	11.1	1	11.1	1	11.1
		142	5	5	100	0	0	0	0	0	0
		143	10	2	20	0	0	0	0	0	0
		149	9	1	11	0	0	0	0	0	0
150		14	8	57	1	7.1	1	7.1	1	7.1	
	Jumlah	70	40	40/70=57%	4	4/70=5.7%	4	4/70=5.7%	4	4/70=5.7%	
Tom Thumb	0	8	17	0	0	0	0	0	0	0	
		9	39	0	0	0	0	0	0	0	
		Jumlah	56	0	0	0	0	0	0	0	
	100	8	15	0	0	0	0	0	0	0	
		9	41	1	2.4	0	0	0	0	0	
	Jumlah	56	1	1/56=1.7%	0	0	0	0	0		



Gambar 3. Transformasi genetik jagung hibrida Hi-II menggunakan *Agrobacterium*

- 3A dan 3B. Ekspresi transien GUS pada sisi aksilar (3A) dan sisi skutelar (3B) embrio zigotik muda dua hari setelah diinokulasi *Agrobacterium* strain C58C1. Gambar 3A dan 3B diambil dari embrio yang sama. (Dalam gambar yang dicetak hitam-putih, warna biru ditunjukkan oleh warna hitam-gelap)
- 3C. Tanaman jagung hasil regenerasi in vitro pada medium seleksi mengandung paramomisin 100 mg/l. Tanaman tersebut diaklimatisasi dengan cara ditumbuhkan pada medium tanah
- 3D. Autoradiogram analisis Southern potongan daun yang diambil dari empat transforman independen (Transforman I – IV). Tiap transforman independen diwakili 2 tanaman R0. Lajur L adalah ladder berupa DNA virus yang dipotong enzim *StyI*. Lajur KN adalah kontrol negatif DNA dari daun Hi-II non-transgenik. Lajur KP adalah kontrol positif yaitu DNA plasmid pPTN345 yang dilinierkan dengan cara dipotong menggunakan enzim *SstI*. Lajur TPL adalah transforman dari penelitian lain. Hibridisasi menggunakan pelacak (*probe*) GUS dari plasmid pPTN286 yang dipotong dengan enzim *BglII* dan *ScaI*.

Variabel yang diamati

Efisiensi transformasi diduga berdasarkan pengamatan variabel-variabel berikut: a) ekspresi transien GUS pada sisi skutelar dan aksilar eksplan embrio zigotik muda pada 2 HSI (Tabel 1); b) proporsi eksplan yang menghasilkan kalus embriogenik Tipe II pada 14 HSI (Tabel 2 kolom E/D), yaitu jumlah eksplan yang menghasilkan kalus embriogenik pada 14 HSI (Tabel 2 kolom E) dibagi jumlah eksplan yang diinokulasi (Tabel 2 kolom D); c) proporsi eksplan yang menghasilkan kalus embriogenik Tipe II yang tumbuh pada media seleksi mengandung 100 mg/L paramomisin pada 72

HSI (Tabel 2 kolom F/D, yaitu nilai pada kolom F dibagi kolom D); d) proporsi eksplan yang menghasilkan tanaman transgenik putatif independen yaitu yang bereaksi positif dalam asai histokimia GUS (Tabel 2 kolom G/D, yaitu nilai pada kolom G dibagi kolom D); e) proporsi eksplan yang menghasilkan tanaman transgenik putatif independen yaitu yang bereaksi positif dalam uji *nptII* ELISA (Tabel 2 kolom H/D, yaitu nilai pada kolom H dibagi kolom D); dan integrasi gen GUS ke dalam genom tanaman jagung berdasarkan analisis hibridisasi Southern. Jika dua tanaman transgenik berasal dari eksplan yang berbeda, dapat dipastikan dua tanaman transgenik tersebut independen

(transforman independen) atau berasal dari dua kejadian transformasi yang berbeda.

Ekspresi transien GUS (β -glucuronidase) pada sisi skutelar dan aksilar eksplan embrio zigotik muda didasarkan pada aktivitas enzim β -glucuronidase yang di-asai secara histokimia pada eksplan atau jaringan kalus pada 2 HSI. Sampel sebanyak 1-3 eksplan per cawan petri diinkubasi (selama 16 jam 37 C) dalam larutan 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-3-glucuronic acid (*X-Gluc*) (Jefferson, 1987). Ekspresi transien dinilai menggunakan skor 0 – 9 berdasar luas penutupan bercak (*stain*) GUS pada permukaan eksplan embrio: 0 menunjukkan tidak ada bercak; 1, 2, ..., 8 berturut-turut menunjukkan penutupan bercak (x), $0 < x \leq 10\%$, $10 < x \leq 20\%$, ..., $70 < x \leq 80\%$; dan 9 menunjukkan luas penutupan $> 80\%$. Pengamatan skor GUS dilakukan menggunakan mikroskop binokular. Data dianalisis menggunakan *Proc Univariate* (SAS Institute, Cary, NC, USA) untuk menentukan nilai tengah, galat baku, dan jumlah dan proporsi eksplan yang menunjukkan skor \geq nilai tertentu (Tabel 1). Proporsi tersebut adalah hasil bagi jumlah sampel eksplan yang menunjukkan skor tertentu dibagi dengan total jumlah sampel.

Untuk mengetahui ekspresi stabil GUS, dilakukan asai GUS terhadap potongan daun tanaman transgenik putatif pada 120 HSI. Sampel potongan daun dengan panjang 1- 2 cm diambil dari daun muda yang sudah membuka. Sebanyak 22 sampel diambil dari empat transforman independen (5-6 sampel per transforman independen). Potongan daun dari tanaman non-transgenik digunakan sebagai kontrol negatif. Sampel tersebut diinkubasi (selama 16 jam 37 C) dalam larutan 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-3-glucuronic acid (*X-Gluc*) (Jefferson, 1987). Reaksi positif ditunjukkan oleh warna biru pada jaringan daun.

Protokol uji *nptII* ELISA (Cat. No. PSP 73000, Agdia Inc., 30380 County Road 6, Elkhart, Indiana 46514 USA) secara terperinci dapat dilihat dalam situs http://www.agdia.com/cgi_bin/catalog.cgi?m1104. Sampel potongan daun (100 – 500 mg) diambil dari tanaman jagung transgenik putatif dan tanaman nontransgenik. Jumlah sampel sama dengan pada asai GUS. Sampel digiling dalam tabung mikro 1,5 ml yang berisi bufer ekstraksi. Sebanyak 100 μ L ekstrak sampel dan kontrol positif (enzim *neomycin phosphotransferase II*) dipipet ke dalam sumur *microplate*. Setelah ditambahkan 100 μ L bufer ekstraksi, dilakukan inkubasi selama 2 jam dalam kotak lembab pada suhu ruangan. Setelah masa inkubasi berakhir, cairan dalam *microplate* dibuang dan dibilas 4 kali dengan PBST, dilanjutkan dengan penuangan 100 μ L konjugat enzim ke dalam sumur; selanjutnya dilakukan inkubasi selama 2 jam dalam kotak lembab pada suhu ruangan. Setelah diinkubasi, cairan dalam *microplate* dibuang dan dibilas 4 kali, 100 μ L substrat TMB dipipet ke dalam

microplate, dan diinkubasi 15 menit. Reaksi diakhiri dengan menambahkan bufer stop 50 μ L asam sulfat 3M. Jika jaringan mengekspresikan gen *nptII* (bereaksi positif), warna substrat berubah dari biru menjadi kuning.

Analisis hibridisasi Southern (Southern, 1975) dilakukan terhadap 10 tanaman transgenik putatif R₀ dari 5 transformasi independen (4 dari hasil penelitian ini, dan satu dari penelitian lain). DNA genomik total diekstrak dari 1,0-1,5 gram daun yang telah membuka penuh menggunakan prosedur Dellaporta *et al.* (1983). DNA (10 μ g) dipotong dengan enzim restriksi *SstI* yang memotong satu tempat di dalam dua batas T-DNA pada ujung 3' GUS. Hibridisasi menggunakan pelacak (*probe*) GUS dari plasmid pPTN286 yang dipotong dengan enzim *BglIII* dan *ScaI*. Pelacak radioaktif diperoleh melalui prosedur *random primed synthesis* (Prime IT II, Stratagene, cat #300385, La Jolla, California, USA) untuk menginkorporasikan dCTP yang mengandung ³²P radioaktif. Hibridisasi dilakukan dalam inkubator bersuhu 65 C dalam larutan 0.5 M Na₂HPO₄, pH 7.2, 7% (w/v) SDS selama 14 jam. Filter dicuci dua kali dalam larutan 40 mM Na₂HPO₄, 5% (w/v) SDS, pH 7.2 pada suhu 65 C selama 15 menit. Pencucian ketiga dilakukan dalam larutan 40 mM Na₂HPO₄, pH 7.2, 1% (w/v) SDS pada suhu 65 C selama 15 menit. Signal radioaktif dari pita DNA pada filter dideteksi dengan cara menginkubasi dengan film sinar X.

HASIL

Ekspresi transien GUS pada sisi skutelar dan aksilar eksplan embrio muda pada 2HSI

Gambar 3A menunjukkan ekspresi transien GUS pada sisi aksilar eksplan Hi-II, sedangkan Gambar 3B menunjukkan ekspresi pada sisi skutelar. Berdasarkan dua gambar tersebut dan data skor ekspresi transien GUS (Tabel 1), ekspresi transien GUS pada sisi aksilar lebih tinggi daripada pada sisi skutelar. Kesimpulan tersebut berlaku untuk dua genotipe jagung yaitu Hi-II dan Tom Thumb.

Nilai tengah ekspresi transien GUS pada sisi skutelar eksplan Hi-II yang dikokultivasi pada media mengandung 100 mg/L L-sistein sebesar 1.82 ± 0.25 (Tabel 1). Nilai tersebut lebih tinggi daripada kontrol Hi-II (0 mg/L L-sistein) sebesar 0.90 ± 0.19 . Pola yang sama juga ditunjukkan oleh eksplan genotipe Tom Thumb, bahwa nilai tengah ekspresi transien GUS pada sisi skutelar eksplan yang dikokultivasi pada media mengandung 100 mg/L L-sistein (sebesar 2.93 ± 0.59) lebih tinggi daripada kontrol (sebesar 1.15 ± 0.23). Kesimpulan bahwa ekspresi transien GUS pada perlakuan 100 mg/L lebih tinggi daripada kontrol juga didukung data jumlah eksplan yang menunjukkan skor

≥ 3 , ≥ 5 , atau ≥ 7 , khususnya pada eksplan Tom Thumb (Tabel 1). Pada perlakuan 100 mg/L L-sistein, 6 eksplan Tom Thumb atau 43% menunjukkan skor ekspresi transien ≥ 3 ; berarti > 20% permukaan sisi skutelar 6 eksplan Tom Thumb tertutup bercak biru GUS. Sebaliknya pada perlakuan tanpa L-sistein, hanya 3 eksplan Tom Thumb atau 15% yang menunjukkan skor ekspresi transien ≥ 3 . Pada perlakuan 100 mg/L L-sistein, sebanyak 1 eksplan Tom Thumb atau 7% menunjukkan skor ekspresi transien ≥ 7 ; berarti > 60% permukaan sisi skutelar 1 eksplan Tom Thumb tertutup bercak biru GUS.

Nilai tengah ekspresi transien GUS pada sisi aksilar eksplan Hi-II yang dikokultivasi pada media mengandung 100 mg/L L-sistein sebesar 5.91 ± 0.59 (Tabel 1). Nilai tersebut lebih tinggi daripada kontrol Hi-II (0 mg/L L-sistein) sebesar 2.56 ± 0.48 . Pada genotipe Tom Thumb, nilai tengah ekspresi transien GUS pada sisi aksilar eksplan yang dikokultivasi pada media mengandung 100 mg/L L-sistein (sebesar 4.29 ± 0.81) tidak nyata lebih tinggi daripada kontrol (sebesar 4.05 ± 0.71).

Proporsi eksplan yang menghasilkan kalus embriogenik Tipe II pada 14 HSI

Selama 14 hari setelah inokulasi, eksplan dikulturkan dalam media kokultivasi (2 hari) dan media tunda (12 hari). Dua media tersebut tidak mengandung paramomisin. Pada perlakuan tanpa L-sistein, rata-rata proporsi eksplan Hi-II yang menghasilkan kalus embriogenik pada 14 HSI adalah $38/69 = 55\%$ (Tabel 2 kolom E/D); sedangkan pada perlakuan 100 mg/L, nilai rata-rata proporsi tersebut sebesar $40/70 = 57\%$. Untuk eksplan Tom Thumb, rata-rata proporsi eksplan yang menghasilkan kalus embriogenik pada perlakuan 0 dan 100 mg/L berturut-turut 0 dan 1/56 atau 2%.

Pertumbuhan kalus embriogenik pada media seleksi dan proporsi eksplan yang menghasilkan kalus embriogenik pada 72 HSI

Mulai 16 HSI, kalus embriogenik dikulturkan pada media seleksi yang mengandung 100 mg/L paramomisin. Berdasarkan pengamatan visual, kalus embriogenik yang tahan dan tidak tahan paramomisin belum dapat dibedakan pada 30 HSI karena sebagian besar kalus embriogenik masih tampak segar pada media seleksi. Pada periode 30 – 44 HSI, kalus embriogenik yang tahan paramomisin mulai dapat diidentifikasi berdasarkan pembentukan kalus embriogenik baru sebagai hasil pembelahan sel. Selain melanjutkan proses seleksi, subkultur kalus embriogenik pada periode 44-72 HSI terutama bertujuan untuk mendapatkan kalus dalam kuantitas yang besar agar diperoleh plantlet dalam jumlah banyak. Berdasarkan pengamatan pada 72 HSI, kalus embriogenik yang tahan

paramomisin yaitu yang tumbuh pada media mengandung 100 mg/L paramomisin hanya diperoleh dari eksplan Hi-II yang dikokultivasi pada media mengandung 100 mg/L L-sistein (Tabel 2 kolom F/D). Kalus tahan paramomisin tidak diperoleh dari eksplan Tom Thumb (0 dan 100 mg/L L-sistein) dan eksplan Hi-II tanpa L-sistein.

Proporsi eksplan Hi-II (perlakuan 100 mg/L L-sistein) yang menghasilkan kalus embriogenik tahan paramomisin pada 72 HSI adalah $4/70 = 5.7\%$ (Tabel 2 kolom F/D). Plantlet atau tanaman berhasil diperoleh dari empat kalus tersebut. Dengan kata lain, dalam penelitian ini diperoleh empat transforman independen.

Proporsi eksplan Hi-II yang menghasilkan tanaman transgenik putatif independen yang bereaksi positif dalam asai GUS dan uji nptII ELISA

Berdasarkan hasil asai GUS dan uji *nptII* ELISA, semua sampel dari empat transforman independen bereaksi positif; sedangkan semua sampel dari Hi-II nontransgenik bereaksi negatif. Proporsi eksplan yang menghasilkan tanaman transgenik putatif independen yang bereaksi positif dalam asai GUS (Tabel 2 kolom G/D) dan uji *nptII* ELISA (Tabel 2 kolom H/D) sebesar 5.7%.

Analisis hibridisasi Southern

Analisis hibridisasi Southern transforman independen I – IV ditunjukkan oleh Gambar 3D. Jumlah kopi gen GUS transforman I, II, III, dan IV adalah berturut-turut 2, 4, 4, dan 1. Pada lajur KN (kontrol negatif) yaitu DNA dari tanaman nontransgenik Hi-II, tidak terdapat pita yang berarti tidak terjadi hibridisasi antara DNA nontransgenik Hi-II dengan probe GUS. Data Southern tersebut membuktikan integrasi gen GUS ke dalam genom tanaman jagung.

PEMBAHASAN

Tanaman jagung transgenik diregenerasikan dari sel atau jaringan transgenik. Sel transgenik adalah sel yang diinfeksi *Agrobacterium* pada tahap kokultivasi. Efisiensi transformasi genetik dalam penelitian ini diduga antara lain berdasarkan data variabel ekspresi transien GUS pada sisi skutelar dan aksilar eksplan (Tabel 1), proporsi eksplan yang menghasilkan kalus embriogenik Tipe II pada 14 HSI (Tabel 2), proporsi eksplan yang menghasilkan kalus embriogenik tahan paramomisin pada 72 HSI, dan proporsi eksplan yang menghasilkan tanaman transgenik putatif (Tabel 2).

Data ekspresi transien GUS pada eksplan digunakan untuk menduga banyaknya sel pada eksplan yang diinfeksi oleh *Agrobacterium*. Nilai tengah ekspresi transien GUS pada sisi skutelar eksplan Hi-II dan Tom Thumb yang dikokultivasi pada media

mengandung 100 mg/L L-sistein lebih tinggi daripada kontrol (0 mg/L L-sistein) (Tabel 1). Dengan kata lain, perlakuan pemberian L-sistein pada media kokultivasi meningkatkan ekspresi transien GUS pada sisi skutelar. Kesimpulan ini sejalan dengan hasil penelitian sebelumnya pada transformasi genetik jagung (Frame *et al.*, 2002) dan kedelai (Olhofs *et al.*, 2001; Olhofs dan Somers, 2001).

Walaupun ekspresi transien pada sisi aksilar lebih tinggi daripada sisi skutelar, data ekspresi pada sisi skutelar lebih penting. Dalam embriogenesis somatik jagung, kalus embriogenik muncul dari sisi skutelar eksplan embrio muda zigotik (Armstrong dan Green, 1985).

Data proporsi eksplan yang menghasilkan kalus embriogenik pada 14 HSI digunakan untuk menduga tingkat kemudahan dalam regenerasi untuk mendapatkan tanaman transgenik dari sel transgenik. Data pada Tabel 2 menunjukkan bahwa proporsi eksplan yang menghasilkan kalus embriogenik pada 14 HSI dari eksplan Tom Thumb sangat rendah, dan jauh lebih rendah daripada Hi-II. Rendahnya efisiensi pembentukan kalus embriogenik dari eksplan Tom Thumb diduga menjadi penyebab utama tidak diperolehnya tanaman transgenik dari eksplan Tom Thumb walaupun tingkat ekspresi transien GUS pada sisi skutelar eksplan Tom Thumb lebih tinggi daripada Hi-II (Tabel 1). Komposisi media yang digunakan dalam penelitian ini tidak optimal untuk induksi atau pembentukan kalus embriogenik dari eksplan Tom Thumb.

Data pada Tabel 2 menunjukkan bahwa tanaman transgenik hanya diperoleh dari eksplan Hi-II yang dikokultivasi pada media mengandung 100 mg/L L-sistein; tidak diperoleh dari eksplan Hi-II yang dikokultivasi pada media tanpa L-sistein. Hasil penelitian ini sejalan dengan hasil yang dilaporkan Frame *et al.* (2002) bahwa L-sistein meningkatkan efisiensi transformasi melalui peningkatan frekuensi pembentukan tanaman transgenik. L-sistein meningkatkan peluang terbentuknya tanaman transgenik dengan cara memperkecil frekuensi kematian sel meristematik khususnya pada sisi skutelar akibat diinfeksi oleh *Agrobacterium*. Dengan menggunakan eksplan dalam jumlah yang lebih besar, tanaman jagung transgenik telah diproduksi dari eksplan Hi-II yang dikokultivasi pada medium tanpa L-sistein dengan efisiensi rendah (1.9%) (Utomo, 2004).

Dalam penelitian ini diperoleh empat transforman transgenik independen (Tabel 2). Tanaman transgenik dari transforman tersebut telah dikonfirmasi yaitu diregenerasikan dari kalus embriogenik yang tumbuh pada media seleksi yang mengandung 100 mg/L paramomisin, bereaksi positif dalam uji *nptII* ELISA dan histokimia GUS, dan bukti integrasi gen GUS berdasar analisis hibridisasi Southern. Jumlah kopi gen GUS yang terintegrasi relatif rendah yaitu berkisar

antara 1 sampai 4. Data Southern pada transformasi genetik jagung menggunakan *Agrobacterium* yang dilaporkan oleh Frame *et al.* (2002) juga menunjukkan jumlah kopi gen terintegrasi berkisar antara 1 sampai 4.

KESIMPULAN

Dibandingkan tanpa L-sistein, pemberian 100 mg/L L-sistein pada media kokultivasi meningkatkan ekspresi transien GUS pada sisi skutelar eksplan Hi-II dan Tom Thumb. Pemberian L-sistein meningkatkan efisiensi transformasi menggunakan eksplan Hi-II melalui peningkatan proporsi eksplan yang menghasilkan tanaman transgenik. Dalam penelitian ini, tanaman transgenik diperoleh dari eksplan Hi-II yang dikokultivasi pada media yang mengandung 100 mg/L L-sistein, dengan efisiensi sebesar 4 transforman independen per 70 eksplan atau 5.7%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dilaksanakan di *Plant Transformation Core Research Facility, University of Nebraska-Lincoln* (PTCRF-UNL), Nebraska, Amerika Serikat sewaktu penulis sebagai *visiting scholar* di tempat tersebut. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. Thomas E. Clemente selaku direktur PTCRF-UNL atas dukungan dana. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Shirley Sato selaku teknisi PTCRF-UNL atas semua bantuan teknis dalam pelaksanaan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Armstrong, C.L., C.E. Green. 1985. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta* 164: 207-214.
- Armstrong, C.L., C.E. Green, R.L. Phillips. 1991. Development and availability of germplasm with high type II culture formation response. *Maize Genet Coop Newslett* 65: 92-93.
- Bass, H.W., L. C. Kang, A. Eyzaguirre. 2001. Tom Thumb, a useful popcorn. *Maize Genet. Coop. Newslett.* 75:62-63.
- Chu, C.C., C.C. Wang, C.S. Sun, C. Hsu, K.C. Yin, C.Y. Chu, F.Y. Bi. 1975 Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen source. *Sci. Sin.* 18: 659-668.

- D'Halluin, K., E. Bonne, M. Bossut, M. De Beuckleer, J. Leemans. 1992. Transgenic maize plants by tissue electroporation. *Plant Cell* 4: 1495-1505.
- Dellaporta, S.L., J. Wood, J.B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol. Biol. Repr.* 1:19-21.
- Frame B, H. Zhang, S. Cocciolone, L. Sidorenko, C. Dietrich, S. Pegg, S. Zhen, P. Schnable, K. Wang. 2000. Production of transgenic maize from bombarded Type II callus: effect of gold particle size and callus morphology on transformation efficiency. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 36:21-29.
- Frame, B. R., H. Shou, R. K. Chikwamba, Z. Zhang, C. Xiang, T.M. Fonger, S. Ellen, K. Pegg, B. Li, D.S. Nettleton, D. Pei, K. Wang. 2002. *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation of Maize Embryos Using a Standard Binary Vector System. *Plant Physiol.* 129:13-22.
- Gordon - Kamm, W.J., T.M. Spencer, M. Mangano, T.R. Adams, R.J. Daines, W.G. Start, J.V. O'Brien, S.A. Chambers, W.R. Adams Jr, N.G. Willetts. 1990. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *Plant Cell* 2: 603-618.
- Hansen, G. 2000. Evidence for *Agrobacterium*-induced apoptosis in maize cells. *Mol Plant-Microbe Interact* 13: 649-657.
- Ishida, Y., H. Saito, S. Ohta, Y. Hiei, T. Komari, T. Kumashiro. 1996. High efficiency transformation of maize (*Zea Mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnol* 14: 745-750.
- Jefferson, R.A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: The *gus* gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5: 287-405.
- Koncz, C, J. Schell. 1986. The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue specific expression of chimeric genes carried by a novel type *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* 204:383-396.
- Negrotto, D., M. Jolley, S. Beer, A.R. Wench, G. Hansen. 2000. The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation. *Plant Cell Rep.* 19: 798-803.
- Olhofs, P.M., D.A.Somers. 2001. L-Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells. *Plant Cell Rep* 20: 706-711.
- Olhofs, P.M., K. Lin, J. Galbraith, N.C. Nielsen, D.A. Somers. 2001. The role of thiol compounds increasing *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cotyledonary-node cells. *Plant Cell Rep.* 20:731-737.
- Olhofs, P.M., L.E. Flagel, C.M. Donovan, D.A. Somers. 2003. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. *Planta* 216:723-735.
- Perl, A., O. Lotan, M. Abu-Abied, D. Holland. 1996. Establishment of an *Agrobacterium*-mediated transformation system for grape (*Vitis vinifera* L.): the role of antioxidants during grape-*Agrobacterium* interactions. *Nature Biotechnol* 14: 624-628.
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-517.
- Sutrisno, M. Herman, S. J. Pardal, E. Listanto, A. Sisharmini, S. G. Budiarti, D. Damayanti, T.J. Santoso, R. Wu. 2000. Regenerasi embrio muda jagung Antasena dan Bisma yang ditembak dengan Plasmid pTW-a dan pRQ6. *Dalam Moejopawiro, S., T. Purwadaria, M. Herman, A. Rukyani, Sutrisno, H. Kasim, dan I. N. Orbani (eds.). Prosiding Ekspose Hasil Penelitian Bioteknologi Pertanian dalam rangka 25 Tahun Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Balitbangtan, Deptan.*
- Utomo, S.D. 2004. Pengaruh Strain *Agrobacterium* terhadap efisiensi transformasi genetik jagung genotype Hibrida Hi-II. *Ilmu pertanian (Agricultural Science)* 11:1-10..
- Wilkinson, T. C. S. A. Thompson. 1987. Genotype, medium, and genotype x medium effects on the establishment of regenerable maize callus. *Maydica* 32:89-105.
- Wojtaszek, P. 1997. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.* 322:681-692.
- Zhao, Z.Y., W. Gu, T. Cai, L.A. Tagliani, D.A. Hondred, D. Bond, S. Krell, M.L. Rudert, W.B. Bruce, D.A. Pierce. 1998. Molecular analysis of T₀ plants transformed by *Agrobacterium* and comparison of *Agrobacterium*-mediated transformation with bombardment transformation in maize. *Maize Genet. Coop. Newslett.* 72: 34-37.

