

*Seminar Hasil Penelitian IPB 2009
Bogor, 22-23 Desember 2009*

TRANSFORMASI GENETIK *JATROPHA CURCAS* DENGAN GEN PEMBUNGAAN *Hd3a* PADI

Suharsono
Yohana Sulistyaningsih
Utut Widyastuti

- Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi, IPB
 - Departemen Biologi, FMIPA, IPB



Latar Belakang

- *Jatropha curcas*
 - sumber minyak bakar (BDF), bukan sumber pangan
 - tanaman tahunan
 - produktivitas rendah
- Produktivitas *Jatropha* rendah
 - bunga betina (hermaprodit) sedikit (10-20%)
 - perbaikan genetik belum dilakukan secara intensif
- Produktivitas
 - Jumlah bunga total: florigene
 - Hd3a menginduksi pembungaan
- Pemecahan masalah
 - Perbaikan genetik tanaman
 - over ekspresi gen pembungaan

Tujuan Penelitian

- Merakit *J. curcas* transgenik yang mengandung *Hd3a* melalui perantara *Agrobacterium tumefaciens*

BAHAN

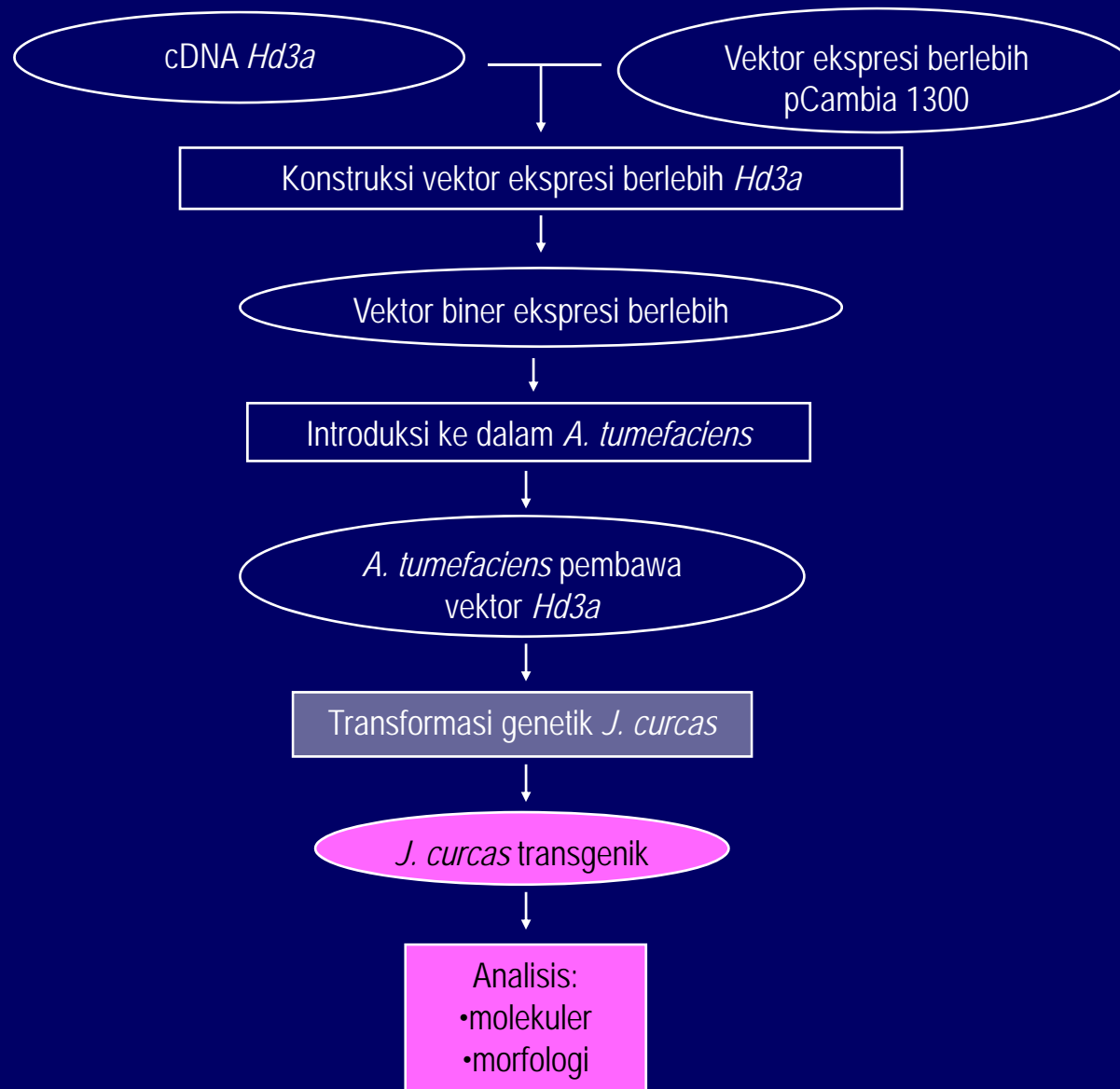
- Tanaman: *J. curcas* IP-2P



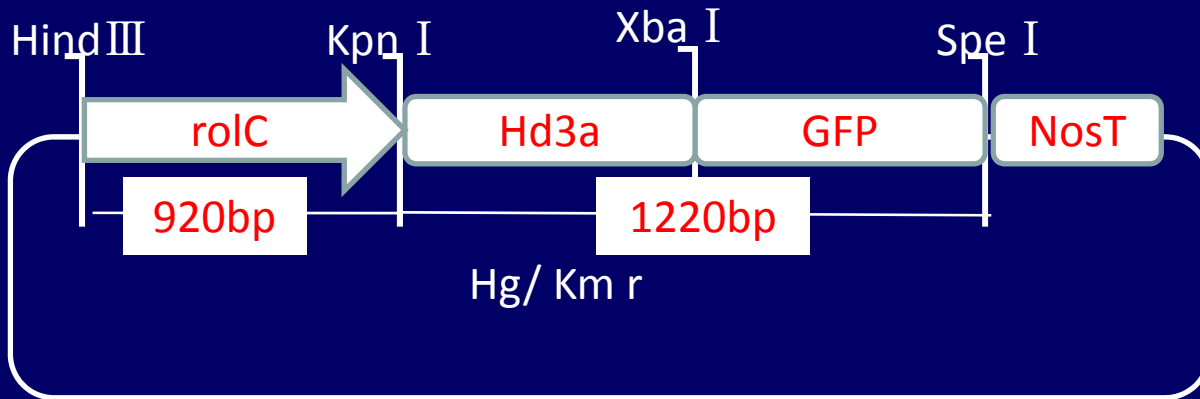
Gen & vektor:

- cDNA *Hd3a* dari padi (Tamaki *et al.*, 2007) – Prof. Shimamoto, NAIST
- pCambia 1300 (gift: Dr. Charng, Natl Taiwan Univ)
- A. tumefaciens* LBA4404
- pGEMT-Easy (Promega)

Lingkup kegiatan perakitan *J. curcas* transgenik pada penelitian ini

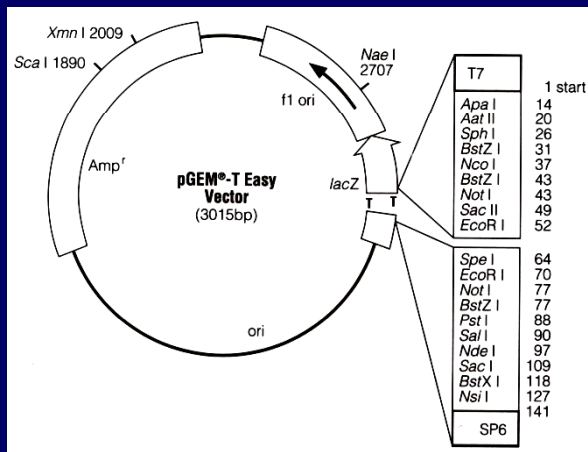


Konstruksi Vektor Ekspresi



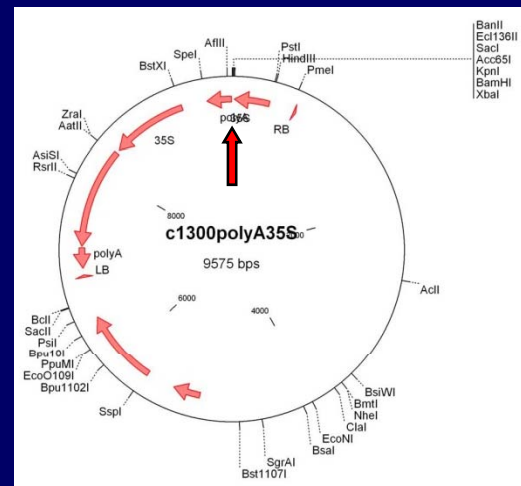
A. tumefaciens
LBA4404

Isolasi *Hd3a* (+ *KpnI*) dengan PCR



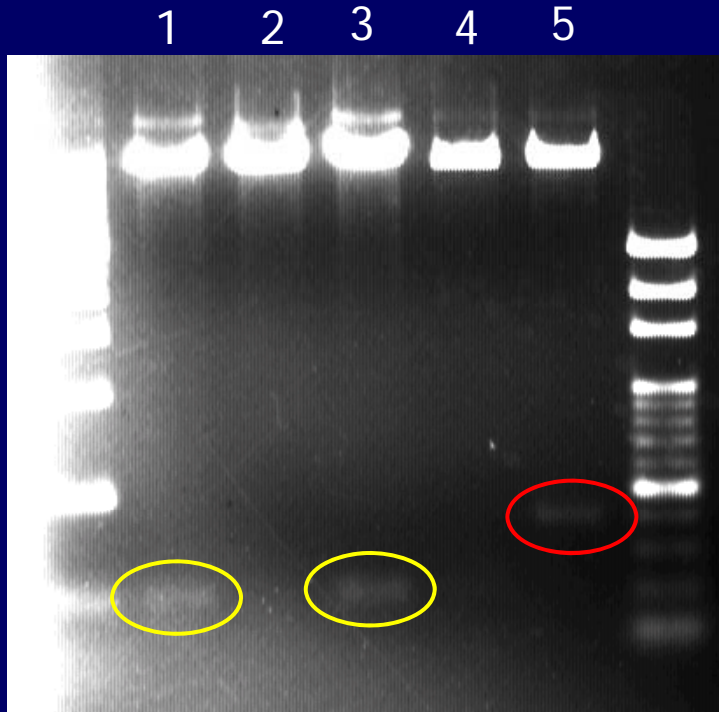
Introduksi vektor rekombinan

Penyisipan *Hd3a* pada *KpnI*



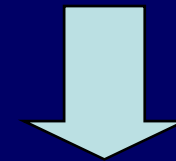
modified pCambia 1300

- Konfirmasi vektor ekspresi



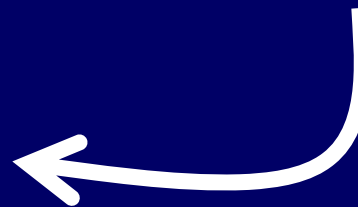
pCambia+ *Hd3a* dipotong *Bam*HI:

- 1 & 3: sisipan berlawanan arah dengan p35S CaMV (*antisense*)
- 2 & 4: tidak ada sisipan
- 5: sisipan searah dengan p35SCaMV (*sense*)



1, 3 & 5 diintroduksi ke *A. tumefaciens* dan diperbanyak

Transformasi genetik *J. curcas*



REGENERASI *J. CURCAS* (NAIST)

Sterization of *Jatropha* seeds



Dark, 5 days at 26°C on MS plates



Seedling: light, 7 days at 26°C on MS bottle



Cut out cotyledons (5 mm x 5 mm)



callus-inducing medium (CIM)

BA	0.5~4.5 mg l ⁻¹
IBA	0.05~0.5 mg l ⁻¹
TDZ	0~1 mg l ⁻¹

↓ 26°C, light for 10 days

Shoot-regeneration medium (SRM)

BA	1.5~4.5 mg l ⁻¹
IBA	0.05 mg l ⁻¹
GA3	0~0.5 mg l ⁻¹

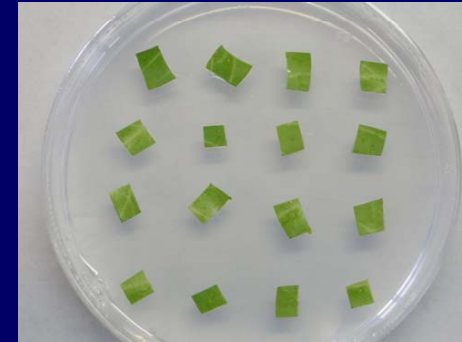
↓ 26°C in the light for 4 weeks

Cut the shoot, placed onto Root-induction medium (RIM)

MS or 1/2MS	
IBA	0.25 mg l ⁻¹

↓ 26°C in the light for 4 weeks

Transferred into soil and cultured in the growth chamber



Callus induction



Shoot induction



Root induction

Agrobacterium-mediated transformation for *Jatropha*

Cut out cotyledons (5 mm x 5 mm)



Incubated with *Agrobacterium* cells (OD_{600nm} : 0.4-0.5) in CIM, 10 min, 28°C



Placed on CIM medium, 26°C, dark, 3 days



Washed with sterilized H₂O containing 500 mg l⁻¹ cefotaxime to remove *Agrobacteria*

Placed onto CI+antibiotics medium

IBA 0.05 mg l⁻¹, TDZ 1 mg l⁻¹, 1% polyvinylpyrrolidone (PVP), 30µM 2-monooxy-3-phenylpropionic acid) AOPP

cefotaxime 250 mg l⁻¹

hygromycine 2.5 mg l⁻¹

↓ 26°C in the light for 10 days

Placed onto SR+antibiotics medium

BA 1.5 mg l⁻¹, IBA 0.05mg l⁻¹, GA3 0.5 mg l⁻¹, 1% PVP, 30µM AOPP

cefotaxime 250 mg l⁻¹

hygromycine 2.5 mg l⁻¹

↓ 26°C in the light for 2 weeks, replace the new fresh medium every week

Cut the shoot and placed onto shoot-elongation medium (SEM)

1/2MS

0.1% activated charcoal, 1% PVP, 30µM AOPP

↓ 26°C in the light for 2 weeks

Cut the shoot and placed onto Root-induction medium (RIM)

1/2MS

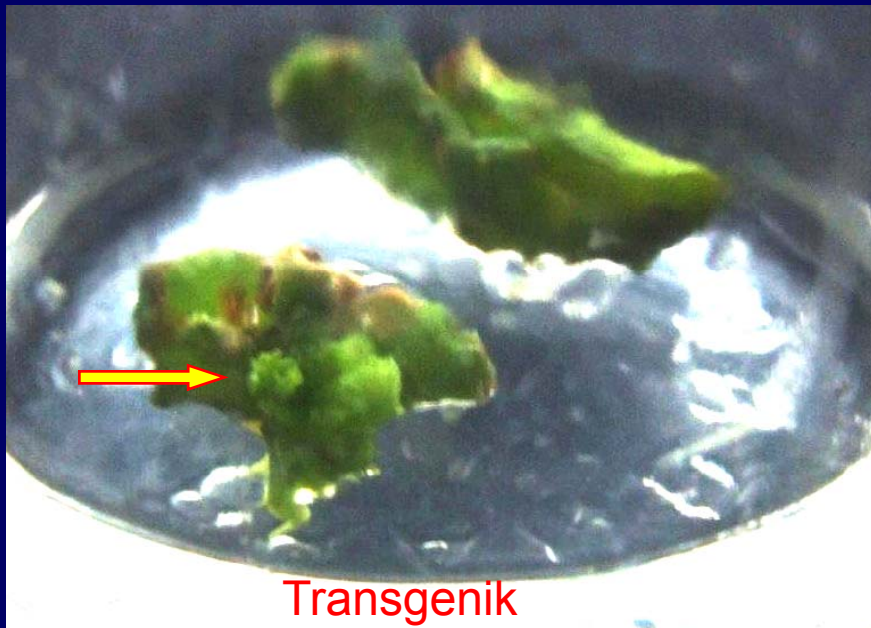
IBA 0.25mg l⁻¹, 0.1% activated charcoal, 1% PVP, 30µM AOPP

Transformasi genetik *J. curcas* dengan *Hd3a*

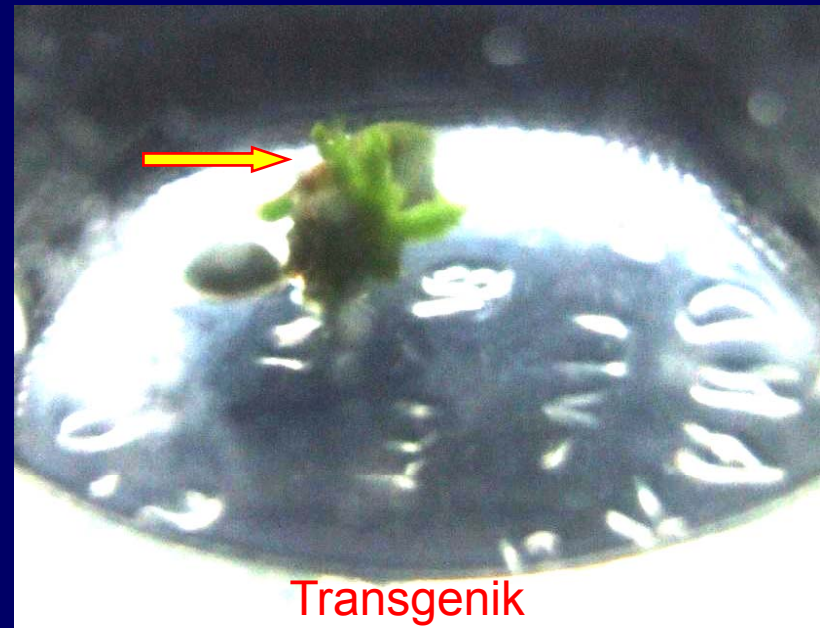


Kontrol (non-transgenik)

•Umur: 3 minggu di media regenerasi



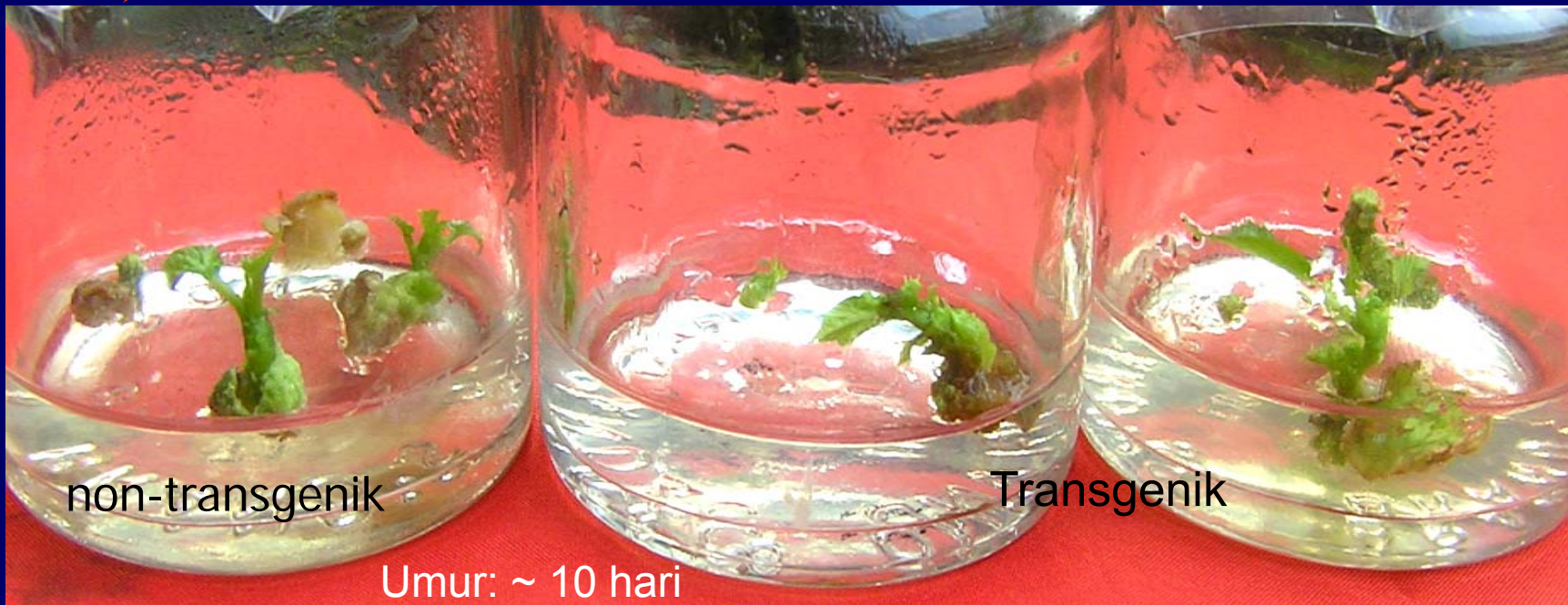
Transgenik



Transgenik

Transformasi genetik *J. curcas* dengan Hd3a

pemanjangan batang



KESIMPULAN

- Vektor ekspresi yang mengandung *Hd3a* sudah dikonstruksi dan sudah dimasukkan ke dalam *A. tumefaciens* LBA4404
- Metode transformasi genetik *J. curcas* sudah diperoleh
- Beberapa kalus transgenik yang mengandung *Hd3a* sedang/sudah beregenerasi membentuk tunas
- Beberapa tunas transgenik sedang ditumbuhkan di media pertumbuhan

Ucapan Terima Kasih

- Departemen Pertanian melalui Kerjasama Kemitraan Penelitian dengan Perguruan Tinggi (KKP3T) dengan judul 'Perbaikan genetik *Jatropha curcas* untuk produksi biji dan toleransinya terhadap pH rendah dan aluminium melalui pendekatan biologi molekuler' atas nama Suharsono
- Prof. Ko Shimamoto, Nara Institute of Science and Technology (NAIST), Japan: cDNA *Hd3a*
- Prof. Akiho Yokota, NAIST: informasi regenerasi
- Dr. Charng, NTU, Rep. China: pCambia 1300



TERIMA KASIH