

## Identifikasi homolog *TcAGL-15* untuk penanda embriogenesis tanaman kakao

*Identification of TcAGL-15 homolog for embryogenesis marker of cacao plant*

Oktaviany Ferry TRIASTANTO<sup>1</sup>, Muhammad JUSUF<sup>1</sup> & Djoko SANTOSO<sup>2\*)</sup>

<sup>1)</sup> Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor, Indonesia

<sup>2)</sup> Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Bogor 16151, Indonesia

### Summary

One of the major problems encountered in micropropagation of cacao through tissue culture is very low frequency of embryo formation. Embryogenesis is believed to have key regulatory gene determining the process. Understanding such gene may help to solve problems in the regeneration process. One of the genes reported to involve in the embryogenesis is *AGAMOUS-like 15 (AGL-15)*. This gene has an important role in the regulation of early embryogenesis in several plants. This experiment aimed to identify *AGL-15* homolog in cacao through bioinformatics approach. The first step of this experiment is to identify the *AGL-15* homolog using heterologous primers from DNA genomic isolated from leaves of cacao plants. The sequence of the *AGL-15* fragment was used in designing specific primers for longer *AGL-15* fragment. These primers were then used to identify *AGL-15* gene using total RNA isolated from cultured zygotic embryos. Differential pattern of *AGL-15* gene expression was observed in zygotic embryos cultured for five weeks. *AGL-15* heterologous primers designed from several plants could be used to identify cacao *AGL-15* homolog. The putative cacao *AGL-15* gene could be identified from zygotic embryos. The differential pattern of the *AGL-15* gene expression up to five weeks is a strong indication that *AGL-15* can be used as an embryogenesis marker in cacao plants.

[Keywords: *Theobroma cacao*, embryogenesis, *AGAMOUS - LIKE* gene, bioinformatics]

\*) Penulis korespondensi

### Ringkasan

Salah satu kendala perbanyakan kakao melalui kultur jaringan adalah rendahnya frekuensi pembentukan embrio, yang diduga melibatkan satu atau lebih gen kunci yang menentukan proses tersebut. Keberhasilan mengidentifikasi gen-gen kunci akan membantu menyelesaikan masalah dalam regenerasi embrio kakao. Salah satu gen yang diduga terlibat dalam proses ini adalah *AGAMOUS-like 15 (AGL-15)*. Gen ini berperan pada regulasi selama masa awal perkembangan embrio beberapa tanaman. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi homolog *AGL-15* pada kakao melalui pendekatan bioinformatika dan RT-PCR. Penelitian diawali dengan identifikasi homolog *AGL-15* dari DNA genomik daun kakao menggunakan primer heterologus. Sekuen fragmen homolog *AGL-15* yang diperoleh, kemudian digunakan untuk merancang primer spesifik *AGL-15* yang berukuran lebih panjang. Primer ini selanjutnya digunakan untuk mengidentifikasi gen *AGL-15* dari RNA total embrio zigotik. Pengamatan pola pita gen *AGL-15* dilakukan pada kultur *in vitro* embrio zigotik yang berumur lima minggu. Primer heterologus gen *AGL-15* yang berasal dari berbagai tanaman, mampu mengidentifikasi keberadaan homolog gen tersebut pada tanaman kakao. Fragmen homolog *AGL-15* putatif tanaman kakao teridentifikasi pada tingkat RNA embrio. Dengan adanya pola diferensial dari ekspresi gen *AGL-15* hingga lima minggu pertama perkembangan embrio, ada indikasi kuat bahwa fragmen homolog *AGL-15* dapat menjadi penanda embriogenesis pada tanaman kakao.

## Pendahuluan

Kakao (*Theobroma cacao* L) merupakan salah satu komoditas perkebunan dan perdagangan serta sumber penerimaan devisa negara yang cukup penting. Data pada tahun 2003, devisa yang dihasilkan dari komoditas ini mencapai US\$ 701 juta. Dengan total produksi sekitar 572.640 ton dari total area 917.000 Ha, Indonesia termasuk dalam tiga besar produsen kakao dunia bersama Ghana dan Pantai Gading (Direktorat Jenderal Bina Produksi Perkebunan, 2004).

Berbagai permasalahan yang dihadapi dalam budidaya kakao antara lain adalah hama penggerek buah kakao, layu pentil, kualitas biji yang rendah dan regenerasi embrio melalui kultur jaringan. Usaha perbanyak kakao melalui kultur jaringan untuk memperoleh tanaman klonal telah dilakukan namun masih menemui banyak kendala. Berbagai macam eksplan seperti kelopak bunga, staminode dan daun telah diuji namun belum berhasil dengan baik. Kendala yang sering dijumpai antara lain inisiasi kalus dan embriogenesis. Terbentuknya senyawa fenolik teroksidasi dan lendir yang sangat cepat, menghambat proses diferensiasi. Demikian juga reproduktibilitas prosedur dan kondisi regenerasi tergolong sangat rendah (Tahardi & Mardiana, 1995). Embriogenesis somatik dapat diperoleh tetapi hanya dengan menggunakan eksplan tertentu yaitu embrio zigotik muda dan organ bunga dengan frekuensi yang sangat rendah (Lopez-Baez et al., 1993).

Proses embriogenesis diduga melibatkan satu atau lebih gen kunci yang menentukan proses tersebut. Keberhasilan mengidentifikasi gen-gen kunci diharapkan dapat membantu menyelesaikan masalah dalam regenerasi embrio kakao. Salah satu gen yang diduga terlibat dalam proses ini adalah *AGAMOUS-like 15 (AGL-15)*. *AGL-15* merupakan gen yang berperan pada regulasi selama masa awal perkembangan embrio

beberapa tanaman. Gen ini adalah anggota dari keluarga MADS-domain yang berfungsi sebagai regulator, biasanya terakumulasi pada organ dan jaringan yang diturunkan dari proses fertilisasi ganda pada pembungaan tanaman, seperti pada embrio, suspensor dan endosperma (Perry, 1999).

*Arabidopsis AGAMOUS (AG)* diperlukan untuk perkembangan bunga terutama pada bagian stamen dan karpel (Bowman et al., 1989; Yanofsky et al., 1990). Karpel merupakan bagian penting dari bunga terutama untuk reproduksi seksual tanaman karena menjadi wadah dari ovul yang kemudian berkembang menjadi buah yang berfungsi untuk melindungi dan memberi nutrisi pada biji. (Pinyopich, 2003). Over-ekspresi *AGL-15* berpengaruh pada proses penebaran bunga dan pemasakan buah (Fang & Fernandez, 2002), mengawali pembentukan embrio somatik setelah tahap perkecambahan (Alvarez-Buylla, 2000) serta berkaitan langsung dengan regulasi ekspresi dari gen lainnya yang mengkode enzim yang terlibat dalam proses metabolisme gibberellin (Wang, 2004). Potensi ekspresi embriogenesis pada kultur *in vitro* dapat ditingkatkan melalui ekspresi konstitutif gen *AGL-15* (Harding et al., 2003).

Transisi dari fase vegetatif ke generatif pada kakao diatur di tingkat ekspresi gen sebagaimana pada tanaman lainnya. Gen-gen yang berkaitan dengan fase generatif seperti pembungaan dan regenerasi memiliki daerah yang terkonservasi (*conserved regions*) dengan homologi yang signifikan terhadap gen yang berfungsi sama pada spesies lainnya. Pada tingkat tertentu, diduga ada persamaan antara gen-gen pembungaan dan regenerasi pada kakao dengan *Arabidopsis*. Berdasarkan kelengkapan informasi tentang alur pembungaan dan regenerasi dari *Arabidopsis* (Blasquez, 2000), bisa dilakukan suatu ekstrapolasi untuk menduga proses yang sama pada tanaman kakao.

Tujuan penelitian ini adalah merancang primer heterologus berdasarkan informasi gen *AGL-15* pada berbagai tanaman kemudian mengidentifikasi gen *AGL-15* pada kakao. Hipotesis yang dikemukakan adalah (1) *AGL-15* terdapat juga pada tanaman kakao sebagaimana pada spesies tanaman lainnya dan (2) *AGL-15* diekspresikan pada proses embriogenesis tanaman kakao secara *in vitro*, yang dapat dideteksi dengan teknik PCR spesifik.

### Bahan dan Metode

#### Perancangan primer degenerasi untuk gen AGL-15

Pengumpulan data sekuen nukleotida gen *AGL-15* berbagai tanaman diperoleh dari database di internet ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)). Sekuen nukleotida tersebut dikonversi ke sekuen asam amino menggunakan program Bioedit 7.0 dengan memperhatikan adanya mekanisme *splicing* (penghilangan intron). Pencarian daerah konservatif (homologi tinggi) berdasarkan sekuen asam amino, dilakukan menggunakan algoritma Clustal-W. Setelah diperoleh *output* dari program Clustal-W, maka sekuen asam amino kembali dikonversi menjadi sekuen nukleotida. Dengan demikian daerah konservatif dapat diperoleh berdasarkan sekuen nukleotida tersebut. Sekuen yang mengandung daerah konservatif, diproses dengan program Primer3, untuk perancangan primer. Dari program Primer3 diperoleh beberapa pasang primer yang siap untuk digunakan. Program Primer3 tersebut telah mengantisipasi adanya kondisi tidak optimal antara lain, selisih  $T_m$  yang terlalu besar, struktur sekunder yang mungkin terbentuk serta primer dimer.

#### Isolasi DNA genomik daun kakao

Isolasi DNA dilakukan berdasarkan metode Orozco-Castillo *et al.* (1994) yang dimodifikasi. Sebanyak 1 g daun kakao digerus dengan  $N_2$  cair di dalam mortar sampai halus dan ditambah dengan 8 – 12 mL bufer MPIS pH 6 (100 mM Natrium sitrat; 0,35 M Glukosa; 5 mM EDTA; 1 % BSA; 2 % PVP; 1 %  $\beta$ -Merkaptoetanol), kemudian disaring dengan kain kasa steril dan ditampung di dalam botol. Filtratnya ditambah dengan 2 sampai 3 mL bufer BED (100 mM Tris-HCl pH 8; 250 mM EDTA; 1,5 NaCl; 2,5 % CTAB; 1 % PVP; 0,2 %  $\beta$ -Merkaptoetanol), dibolak-balik dan dipindahkan ke tabung Eppendorf. Sampel dalam tabung diinkubasi pada suhu 60°C selama satu jam. Setelah dingin, suspensi diekstraksi dengan kloroform:isoamil alkohol (24:1) sebanyak satu volume dan dibolak-balik selama 5-10 menit pada suhu 4°C. Sampel disentrifugasi pada 12.000 g, dengan suhu 4°C selama 10 menit. Lapisan atas dipindahkan ke tabung Eppendorf baru dan suspensi DNA dipresipitasi dengan menambah 0,5 V NaCl 5 M dan 0,6 V isopropanol kemudian dibolak-balik 15-30 kali sebelum didiamkan di dalam es selama satu jam. Tabung Eppendorf disentrifugasi pada suhu 4°C dengan kecepatan 12.000 g selama 10 menit. Setelah filtratnya dibuang, pelet dibilas dengan etanol 70%. Pelet dikeringkan dengan *speed vac* kemudian dilarutkan dalam 100  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O.

Kualitas DNA diuji melalui elektroforesis menggunakan gel agarosa 0,8% dalam bufer TBE 0,5X. Disamping itu kuantitas dan kemurnian DNA ditentukan dengan membandingkan absorbansinya pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm (*A<sub>260</sub> dan A<sub>280</sub>*) menggunakan spektrofotometer.

### *Embriogenesis somatik dari eksplan embrio zigotik*

Buah kakao berumur 90-120 hari dipetik kemudian didesinfeksi dengan alkohol 70% selama 10 menit. Embrio zigotik diisolasi dari bakal biji, dipilih yang berukuran sekitar 2-4 mm kemudian ditanam pada medium. Medium dasar yang digunakan adalah medium B5 yang dimodifikasi dengan menambahkan zat pengatur tumbuh *indole butyric acid* (IBA) 2 mg/L, air kelapa 100 mL/L, sukrosa 30 g/L dan phytigel 2 g/L. Medium diatur pH-nya 5,8 kemudian diautoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit. Medium dituang ke dalam cawan Petri diameter 10 mm. Setiap Petri diisi 30 mL medium dan ditanami 10 eksplan. Kultur disimpan pada ruang gelap suhu 26°C. Pengamatan yang dilanjutkan ke isolasi RNA dilakukan pada jangka waktu 0 sampai 5 minggu.

### *Isolasi RNA total dari jaringan embrio zigotik*

RNA total diisolasi dari jaringan embrio zigotik pada berbagai umur kultur dengan metode yang dimodifikasi oleh Santoso & Maagd (2003). Sebanyak 5 µL β-merkaptotanol ditambahkan ke dalam setiap mL bufer ekstrak. Selain itu, PVPP ditambahkan ke dalam ekstrak sebagai antioksidan. Penambahan kedua antioksidan tersebut dilakukan sesaat sebelum bufer ekstraksi digunakan. Ekstraksi dengan pelarut dilakukan tiga kali masing-masing dengan kloroform: isoamilalkohol (24:1), fenol: kloroform: isoamilalkohol (25:24:1) dan dengan kloroform:isoamilalkohol (24:1). Ekstraksi pertama dilakukan bersamaan dengan tahapan inkubasi pada suhu 65°C selama satu jam. Sentrifugasi dilakukan pada 12.000 g selama 20 menit. Sampel ditambah dengan LiCl kemudian diendapkan selama semalam untuk memisahkan RNA dari DNA.

### *Analisis PCR*

Analisis PCR dilakukan dengan total reaksi 20 µL, mengandung DNA genomik 30-40 ng, dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP) 0,1 µM, primer heterologus, enzim *Taq DNA polymerase* 1 unit dalam larutan bufer 1X. Program PCR terdiri dari predenaturasi pada suhu 94°C selama lima menit, dilanjutkan dengan 30 siklus yang terdiri dari denaturasi pada suhu 94°C selama satu menit, penempelan pada suhu 46°C selama 30 detik dan ekstensi pada suhu 72°C selama 90 detik. Pada tahap terakhir proses PCR dilakukan ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 15 menit. Sebanyak 10 µL produk PCR hasil amplifikasi dianalisis dengan elektroforesis pada gel agarosa 1% (w/v).

### *Reamplifikasi PCR*

Hasil PCR sebelumnya diencerkan dengan tingkat pengenceran satu, lima dan sepuluh kali untuk digunakan sebagai templat pada proses PCR berikutnya. PCR terdiri dari predenaturasi pada suhu 94°C selama lima menit, dilanjutkan dengan 30 siklus yang terdiri dari denaturasi pada suhu 94°C selama satu menit, penempelan pada suhu 53°C (untuk penempelan situs spesifik) dan ekstensi 72°C selama 90 detik. Pada tahap terakhir proses PCR dilakukan ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 15 menit. Sebanyak 10 µL produk PCR hasil amplifikasi dianalisis dengan elektroforesis pada gel agarosa 1% (w/v).

### *Sekuensing dan analisis BLAST*

Hasil PCR yang sudah direamplifikasi kemudian disekuensi di Lembaga Biologi Molekuler Eijkman di Jakarta. Hasilnya dianalisis BLAST pada situs NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.

### Analisis RT-PCR dan perancangan primer spesifik

RNA total yang digunakan dalam RT-PCR harus memiliki kualitas bagus, yaitu mempunyai kemurnian tinggi, rasio  $\lambda_{260}/\lambda_{280} \geq 1,6$  dan  $\lambda_{260}/\lambda_{230} \geq 1,0$ . Reaksi RT-PCR dilakukan melalui dua proses, yaitu pembuatan *first strand* cDNA dan reaksi PCR biasa yang menggunakan *first strand* cDNA sebagai cetakan.

Untuk pembuatan *first strand* cDNA, cetakan yang digunakan adalah RNA total yang diisolasi dari jaringan hasil kultur embriogenesis pada umur 0 sampai 5 minggu. Primer yang digunakan adalah oligo dT(18) dari kit Invitrogen. Sedangkan untuk reaksi PCR selanjutnya, primer yang digunakan adalah primer spesifik yang dirancang ulang dari hasil sekuensing. Amplikon dielektroforesis menggunakan gel agarosa 1,4%. Pengamatan dilakukan terhadap pola pita yang terbentuk dari hasil PCR. Intensitas pita DNA hasil RT-PCR digunakan untuk mengestimasi tingkat ekspresi gen terlacak.

### Hasil dan Pembahasan

Setelah RNA yang terikut pada hasil dihilangkan dengan RNase, DNA genomik kakao diperiksa baik dengan elektroforesis gel agarosa (0,8%) maupun dengan spektrofotometer untuk menetapkan kualitas dan kuantitasnya. Pengujian menunjukkan bahwa DNA genomik yang dihasilkan memiliki kualitas yang cukup baik, tidak terdegradasi dan relatif murni (data tidak ditunjukkan). Selanjutnya, DNA ini yang digunakan dalam reaksi PCR.

Untuk mendeteksi keberadaan gen *AGL-15*, dilakukan PCR menggunakan primer spesifik. Primer heterologus spesifik *AGL-15*

dirancang berdasarkan situs homologi *AGAMOUS* dan *AGAMOUS-like* pada berbagai tanaman antara lain apel, poplar, *Arabidopsis* dan kapas. Dengan metode primer degenerasi seperti yang dijelaskan pada Metode Penelitian, diperoleh primer dengan sekuen dan karakteristik sebagai berikut:

EMF1: 5'-GAGATTAAGAGGATCGA - 3'  $T_m = 49^\circ\text{C}$

EMR2: 5'-GAGAAGACGATGAGAGC - 3'  $T_m = 52^\circ\text{C}$

Amplifikasi fragmen DNA spesifik kakao dengan PCR menggunakan pasangan primer EMF1 dan EMR2 dan suhu penempelan  $46^\circ\text{C}$  menghasilkan pita dengan ukuran 150 bp. Karena intensitas pita DNA hasil amplifikasi ini tidak cukup kuat (Gambar 1 lajur 1), maka dilakukan reamplifikasi. Templat yang digunakan dalam reamplifikasi adalah hasil purifikasi pita tersebut dari gel agarosa. Dengan optimasi pengenceran satu, lima dan sepuluh kali serta dengan peningkatan suhu penempelan menjadi  $53^\circ\text{C}$  untuk peningkatan spesifitas, diperoleh bahwa pengenceran 10 kali mampu menghasilkan amplikon yang terbaik. Sedangkan untuk pengenceran satu dan lima kali, diduga kuantitas amplikon masih tinggi sehingga menghasilkan pita yang *smear* (Gambar 1 lajur 2 dan 3). Untuk keperluan sekuensing, fragmen DNA murni dalam jumlah yang lebih banyak didapat dari gel preparatif (Gambar 1 lajur 6).

Sekuensing dilakukan di Laboratorium Eijkman menggunakan alat Sequencer ABI Prism 371. Prinsip kerja sekuensing ini didasarkan pada metode penyetopan dideoksi yang dikembangkan oleh Sanger. Dari hasil sekuensing diperoleh sekuen DNA dengan ukuran 100 bp (sekuen tidak ditampilkan). Sekuen putatif *AGL-15* kakao digunakan sebagai *input* pada analisis BLAST-N dan menghasilkan *output* seperti Gambar 2.

*tomentosa* dengan *E-value* di bawah  $1.10^{-7}$ . Nilai ini menunjukkan adanya indikasi kuat bahwa sekuen tersebut merupakan varian dari *AGAMOUS-like*.

Dengan menggunakan *contig* antara sekuen *AGL-15 putative* dan *AGAMOUS-like* buah kakao dari klon Indonesia, serta menggunakan software Primer3, didapatkan primer spesifik dengan karakteristik sebagai berikut :

Forward: 5'-GCCTATGAACTGTCTGTGCT-3'  $T_m = 62^\circ\text{C}$   
Reverse: 5'-CAGCAGTCATTCCTTTTGG-3'  $T_m = 59^\circ\text{C}$

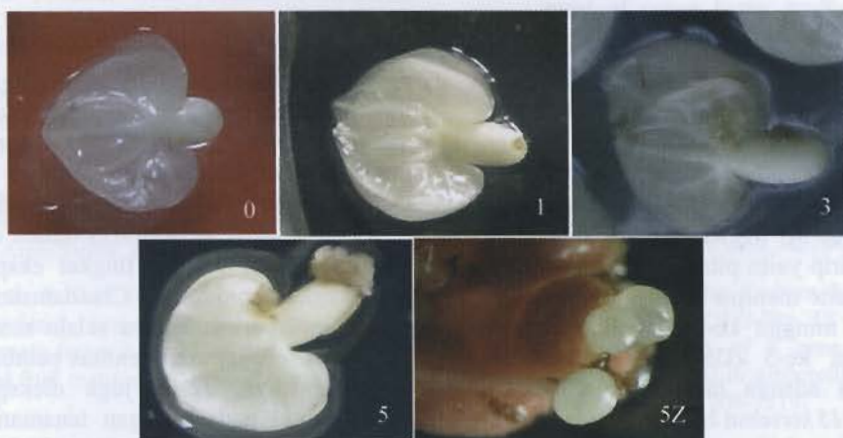
Pasangan primer tersebut selanjutnya digunakan dalam RT-PCR untuk menganalisis ekspresi *TcAGL-15* pada berbagai umur kultur embrio zigotik kakao.

Kultur embrio zigotik (EZ) dari umur 0 hingga 5 minggu adalah seperti pada Gambar 3. Data ini menunjukkan bahwa eksplan tersebut mengalami perkembangan embriogenesis, dan terlihat jelas pada umur 4 – 5 minggu. Pada umur kultur lima minggu embrio somatik fase globular yang berkembang dari eksplan EZ jelas terlihat di bawah mikroskop dengan pembesaran 10

hingga 40 kali (Gambar 3. 5Z). Pada subkultur 2 – 3, fase globuler akan berkembang menjadi fase torpedo atau hati. Selanjutnya embrio kultur tersebut digunakan sebagai sumber RNA total. Larutan asam nukleat dianggap murni dari karbohidrat kompleks ataupun senyawa polifenolik apabila rasio antara serapan pada  $\lambda_{260}$  nm dengan  $\lambda_{230}$  nm ( $\lambda_{260}/\lambda_{230}$ ) sama dengan satu atau lebih (Lewinsohn *et al.*, 1994).

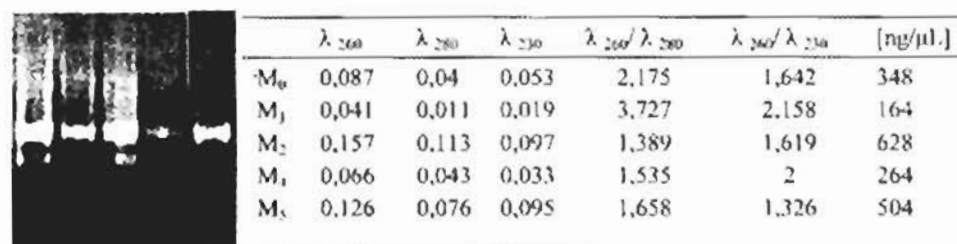
Kandungan kedua senyawa tersebut di dalam jaringan kakao relatif sangat tinggi. RNA total hasil isolasi dari kultur embrio zigotik ditampilkan pada Gambar 4. Visualisasi elektroforesis ini menunjukkan bahwa kualitas RNA total relatif baik dan masih utuh. Hal tersebut ditunjukkan dengan adanya dua pita diskrit RNA ribosomal. Data spektrofotometer di sebelah kanan juga menunjukkan bahwa kemurnian RNA total relatif baik.

Berdasarkan gambar dan data tersebut diduga bahwa RNA hasil isolasi dapat digunakan untuk analisis ekspresi gennya dengan metode RT-PCR. Pada percobaan ini digunakan RT-PCR melalui pembentukan



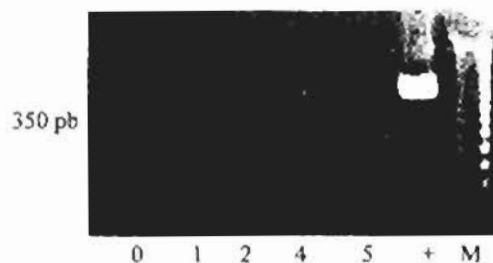
Gambar 3. Kultur embrio zigotik secara *in vitro* pada minggu ke 0, 1, 3, 5. 5Z adalah kultur pada minggu ke lima dilihat di bawah mikroskop.

Figure 3. Zygotic embryos cultured for 0, 1, 3, 5 weeks. 5Z is a microscopic view of the five-week culture.



Gambar 4. Hasil isolasi RNA total eksplan kakao dari kultur minggu ke 0 - 5 beserta serapan spektrofotometri.

Figure 4. Electrophoretic profile and spectrophotometrics of total RNA isolated from ZE cultured for 0 to 5 weeks.



Gambar 5. Hasil RT-PCR pada suhu penempelan 60°C menunjukkan pola pita diferensial (lajur 0 hingga 5).

Figure 5. RT-PCR products at annealing temperature 60°C indicates a differential banding pattern (lanes 0 to 5).

*first strand* cDNA terlebih dahulu baru kemudian diteruskan dengan proses PCR. Dari dua kali proses PCR dengan menggunakan suhu penempelan yang berbeda (60 dan 64°C) dengan cetakan *first strand* dari RNA pada M<sub>0</sub>, M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>4</sub> dan M<sub>5</sub>, diperoleh pola yang mirip yaitu pita tebal pada minggu ke-0, berangsur menipis pada minggu ke-2, hilang pada minggu ke-4 dan muncul lagi pada minggu ke-5 (Gambar 5). Hal itu menunjukkan adanya indikasi kuat bahwa sekuen *AGL-15* tersebut berperan pada proses embriogenesis. Di awal kultur, eksplan diduga masih memiliki identitas embrio. Pada minggu kedua sel embriogenik mulai berubah

menjadi sel somatik. Pada minggu ke-4 identitas embriogenik hilang dan pada minggu ke-5 karakteristik embriogenik muncul kembali sejalan dengan proses embriogenesis somatik. Peranan gen *MADSBOX* jenis *AGAMOUS* dalam embriogenesis sejalan dengan tingkat ekspresinya pada organ reproduktif. Chaidamsari *et al.* (2006) melaporkan bahwa selain menunjukkan peran sebagai gen identitas pembungaan, gen sejenisnya, *TcAG* juga diekspresikan relatif tinggi pada jaringan tanaman kakao ovari dan buah yang sedang berkembang yang dapat diasosiasikan dengan perkembangan embrio biji buah kakao tersebut.

### Kesimpulan

1. Primer heterologus untuk gen *AGL-15* yang berasal dari berbagai tanaman, mampu mendeteksi keberadaan homolog gen tersebut pada tanaman kakao.
2. Fragmen homolog *AGL-15* putatif tanaman kakao terdeteksi pada tingkat RNA embrio.
3. Pola ekspresi differensial mengindikasikan bahwa fragmen homolog *AGL-15* dapat digunakan sebagai penanda embriogenesis pada tanaman kakao.

### Daftar Pustaka

- Alvarez-Buylla, E. (2000). An ancestral MADS-box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals. *PNAS*, **97** (10), 5328-5333.
- Chaidamsari, T., Samanhuri, H. Sugiarti, D. Santoso, G. C. Angenent & R.A. de Maagd (2006). Isolation and characterization of an *AGAMOUS* homologue from cocoa. *Plant Sci.*, **170**, 968-975.
- Direktorat Jenderal Bina Produksi Perkebunan (2004). *Statistik Perkebunan Indonesia 2001-2003, Kakao*. Jakarta, Dirjenbun. p. 47.
- Blasquez, M. A. (2000). Flower developmental pathways. *Cell Science at a Glance*, **354**, 6-7.
- Bowman, J. L., D. R. Smyth & E. M Meyerowitz (1989). Genes directing flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **1**, 37-52.
- Fang, S.C. & D.E. Fernandez (2002). Effect of regulated overexpression of the MADS domain factor *AGL-15* on flower senescence and fruit maturation. *Plant Physiol.*, **130**, 78-89.
- Harding, E.W., W. Tang, K. W. Nichols, D. E. Fernandez & S. E. Perry (2003). Expression and maintenance of embryogenic potential is enhanced through constitutive expression of *AGAMOUS-like 15*. *Plant Physiol.*, **13**, 653-663.
- Lewinsohn E., C.L. Steele & R. Croteau (1994). Simple isolation of functional RNA from woody stems of Gymnosperms. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **12**, 20-25.
- Lopez-Baez, O., H. Bollon, A. Eskes & V. Petiard (1993). Embryogenesis somatique de cacaoyer *Theobroma cacao* L. a partir de pieces florales. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Serie III - Sciences de la Vie*. **316**, 579-584.
- Orozco-Castillo, K.T. Chalmerna, B. Wough & W. Powell (1994). Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD marker. *Theor. Appl. Genet.*, **87**, 934-935.
- Perry, S.E. (1999). The MADS-domain protein *AGAMOUS-like 15* accumulates in embryonic tissues with diverse origin. *Plant Physiol.*, **120**, 121-129.
- Pinyopich, A. (2003). Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development. *Nature*, **424**, 85-88.
- Santoso, D. & R.A Maagd (2003). Molecular and genetic engineering studies toward improvement of cocoa bean production, *Internal Report of RUTI*.
- Tahardi, J. S. & N. Mardiana (1995). Tissue culture of *Theobroma cacao* L. *Menara Perkebunan*, **52**, (3), 174-178.
- Thiessen, G. (2001). Development of floral organ identity: Stories from the MADS house. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **4**, 75-85.
- Wang, H. (2004). The Embryo MADS domain protein *AGAMOUS-like 15* directly regulates expression of a gene encoding an enzyme involved in gibberellin metabolism. *Plant Cell*, **16**, 1206-1219.
- Yanofsky, M. F. (1990). The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature*, **346**, 35-39.