

Regenerasi Empat Genotipe Gandum (*Triticum aestivum* L.) Pasca Transformasi Melalui *Agrobacterium tumefaciens*

Aniversari Apriana*, Atmitri Sisharmini, Fitriyani, dan Sustiprijatno

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111
Telp. (0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820; *E-mail: nanas_setyawan@yahoo.com

Diajukan: 16 Oktober 2013; Diterima: 22 Januari 2014

ABSTRACT

Regeneration of Four Wheat (*Triticum aestivum* L.) Genotypes after Transformation Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Aniversari Apriana, Atmitri Sisharmini, Fitriyani, and Sustiprijatno. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens* has not been established yet. This research aimed to obtain the most responsive wheat genotype to be transformed, to select the most effective combination of growth regulator for regenerating transformant calli, and to determine the transformation efficiency. Transformation mediated by *A. tumefaciens* was performed on four genotypes of wheat, namely Combi, Fasan, Perdix, and Naxos-Wew. Transformed calli with green spots in selection media were transferred to regeneration media containing 25 mg/l hygromycin, i.e. R1H25 and R2H25. The obtained plantlets were analyzed by PCR using specific primers for *hygromycin phosphotransferase* gene. The results showed that Fasan was the most responsive genotype in callus formation (95.47%) and regeneration both in R1H25 (27%) and R2H25 (28.6%) media. Fourteen plantlets were successfully acclimatized and PCR analysis showed that there were four positive transformants containing the *hpt* gene. The results are expected to provide information on the development of transgenic wheat in Indonesia, specifically in the success of callus formation and regeneration of wheat after transformation using *A. tumefaciens*.

Keywords: Wheat, transformation study, *Agrobacterium*.

ABSTRAK

Regenerasi Empat Genotipe Gandum (*Triticum aestivum* L.) Pasca Transformasi Melalui *Agrobacterium tumefaciens*. Aniversari Apriana, Atmitri Sisharmini, Fitriyani, dan Sustiprijatno. Metode transformasi genetik pada gandum dengan bantuan *Agrobacterium tumefaciens* belum menjadi suatu metode yang baku. Dalam penelitian ini dilakukan studi transformasi yang bertujuan untuk memperoleh genotipe yang responsif untuk ditransformasi, memilih kombinasi zat pengatur tumbuh yang paling efektif untuk meregenerasikan kalus transforman, dan mengetahui efisiensi transformasi. Dalam kegiatan ini, transformasi dilakukan melalui *A. tumefaciens* pada empat genotipe gandum, yaitu Combi, Fasan, Perdix, dan Naxos-Wew. Kalus hasil transformasi dari keempat genotipe gandum yang berhasil membentuk spot hijau di media seleksi dipindahkan

ke dalam dua macam media regenerasi, yaitu R1H25 dan R2H25. Planlet yang berhasil diperoleh kemudian dianalisis secara molekuler dengan teknik PCR menggunakan primer spesifik untuk gen ketahanan terhadap antibiotik higromisin (gen penyandi *hygromycin phosphotransferase*). Hasil penelitian menunjukkan bahwa genotipe Fasan merupakan genotipe yang paling responsif dalam pembentukan kalus (95,47%) dan regenerasi, baik di media R1H25 (27%) maupun R2H25 (28,6%) pasca transformasi. Empat belas planlet berhasil diaklimatisasi dan hasil analisis PCR menunjukkan terdapat empat transforman yang positif mengandung gen *hpt*. Hasil penelitian ini dapat memberi informasi mengenai tingkat keberhasilan pembentukan kalus dan regenerasi gandum setelah ditransformasi dengan bantuan *A. tumefaciens* sehingga selanjutnya dapat digunakan untuk pengembangan tanaman gandum transgenik di Indonesia.

Kata kunci: Gandum, studi transformasi, *Agrobacterium*.

PENDAHULUAN

Sistem *in vitro* yang efisien dan stabil merupakan salah satu syarat mutlak yang harus dikuasai apabila akan mengembangkan suatu metode transformasi yang efisien. Raja *et al.* (2010) mengungkapkan bahwa keberhasilan transformasi melalui *Agrobacterium tumefaciens* pada tanaman serealia ditentukan oleh beberapa hal, di antaranya genotipe, jenis, umur, dan kondisi eksplan, kerapatan bakteri, lama inokulasi (ko-kultivasi), serta media regenerasi. Tahap regenerasi tanaman merupakan salah satu tahapan yang paling penting dalam menentukan keberhasilan proses transformasi genetik (Carsono dan Yoshida, 2006). Menurut Petri dan Burgos (2005), keberhasilan regenerasi transforman bersifat spesifik genotipe sehingga metode regenerasi pada satu genotipe akan berbeda dengan genotipe lainnya.

Metode transformasi genetik pada gandum dengan bantuan *A. tumefaciens* diketahui belum baku. Keberhasilan transformasi gandum masih rendah karena adanya perbedaan kemampuan regenerasi di antara varietas gandum tersebut (Supartana *et al.*, 2006). Gandum juga merupakan jenis tanaman yang rekalsitrasi terhadap kultur jaringan (Razzaq *et al.*, 2011). Menurut Sarker dan Biswas (2002) dan Tao *et al.* (2011), embrio muda merupakan sumber

eksplan yang paling baik digunakan untuk kegiatan transformasi tanaman gandum sebab embrio muda mempunyai kemampuan beregenerasi yang tinggi dibandingkan dengan organ yang lain, seperti embrio tua, daun muda, dan apikal meristem. Ukuran embrio yang digunakan untuk eksplan antara 1–1,5 mm karena penggunaan eksplan dengan ukuran lebih dari 2 mm mempunyai tingkat ekspresi sementara yang tinggi, namun mempunyai frekuensi regenerasi yang rendah dibandingkan dengan penggunaan eksplan dengan ukuran kurang dari 1,5 mm (Jones *et al.*, 2005). Namun demikian, Parrott *et al.* (2002) serta Shrawat dan Horst (2006) melaporkan bahwa salah satu penyebab menurunnya efisiensi transformasi gandum melalui bantuan *A. tumefaciens* dengan menggunakan eksplan embrio muda adalah terjadinya fenomena nekrosis/pencokelatan setelah proses ko-kultivasi. Hal ini disebabkan sel-sel gandum akan mengeluarkan hidrogen peroksida sebagai pertahanan terhadap infeksi *Agrobacterium* sehingga menyebabkan jaringan cenderung mencokelat ketika kontak dengan *Agrobacterium*.

Transformasi genetik pada tanaman gandum sampai saat ini masih terus dikembangkan untuk mendapatkan metode transformasi yang efektif dan efisien. Penelitian tentang transformasi gandum telah dilakukan menggunakan berbagai macam genotipe, metode transformasi, jenis eksplan, dan media (He *et al.*, 2010; Jones *et al.*, 2005; Pastori *et al.*, 2001; Raja *et al.*, 2010; Sarker dan Biswas, 2002; Tao *et al.*, 2011). Namun demikian, efisiensi transformasi yang dihasilkan masih rendah, yaitu 0,5–5,4% (Jones *et al.*, 2005; Pastori *et al.*, 2001). Pada kegiatan transformasi tanaman yang rekalsitran, sering terjadi suatu genotipe mempunyai kemampuan regenerasi tinggi di media kultur jaringan, namun setelah dilakukan transformasi, kemampuan regenerasinya menurun bahkan hilang.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui genotipe gandum yang responsif untuk ditransformasi, memilih kombinasi zat pengatur tumbuh dalam media regenerasi yang paling efektif untuk meregenerasikan kalus gandum setelah ditransformasi, dan mengetahui efisiensi transformasi. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai tingkat keberhasilan pembentukan kalus dan regenerasi dari empat genotipe gandum setelah ditransformasi dengan bantuan *A. tumefaciens* sehingga selanjutnya dapat digunakan untuk pengembangan tanaman gandum transgenik di Indonesia.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan pada tahun 2010 di Laboratorium Biologi Molekuler dan Laboratorium Fasilitas Uji Terbatas Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (BB Biogen).

Tanaman donor eksplan adalah empat genotipe tanaman gandum yang termasuk dalam jenis *summer wheat* (gandum musim panas), yaitu varietas Combi, Fasan, Perdix, dan Naxos-Wew (Aminasih, 2009). Keempat genotipe tersebut merupakan gandum introduksi yang biasanya digunakan sebagai bahan pembuatan roti dan sebelumnya Sisharmini *et al.* (2010) menggunakan keempat genotipe gandum tersebut sebagai bahan penelitian tentang tingkat keberhasilan induksi kalus dan regenerasi empat genotipe gandum tanpa ditransformasi. Benih keempat genotipe gandum ditanam di Kebun Percobaan Pacet, Cipanas. Eksplan yang digunakan berupa embrio muda (*immature embryo*) gandum berukuran 1–1,5 mm yang diambil dari biji muda gandum yang dipanen dari tanaman donor pada umur 15–20 hari setelah antesis (pengisian biji). Biji-biji muda gandum diambil dari malainya, disterilkan dengan alkohol 70% selama 1 menit, kemudian direndam dengan larutan pemutih komersial 20% (kandungan zat aktif NaOCl 5,25%) selama 20 menit, dan dibilas dengan air steril sebanyak enam kali. Embrio muda diisolasi dari biji yang telah steril, dengan cara memijit biji dengan menggunakan pinset sampai embrio keluar.

Transformasi Gandum

Penyiapan suspensi bakteri

Strain *A. tumefaciens* yang digunakan adalah *Ag1-1* (supervirulen) yang mengandung plasmid rekombinan pCAMBIA1301. Plasmid ini mengandung gen ketahanan terhadap antibiotik higromisin, yaitu gen *higromisin fosfotransferase (hpt)*. Metode transformasi yang digunakan mengacu pada metode Jones *et al.* (2005) serta Sarker dan Biswas (2002), dengan sedikit modifikasi pada konsentrasi dan jenis zat pengatur tumbuh pada media seleksi. Sebanyak 500 µl suspensi *A. tumefaciens* ditumbuhkan dalam media AB padat yang mengandung antibiotik kanamisin 100 mg/l dan karbenisilin 75 mg/l, kemudian diinkubasi selama dua hari pada suhu 28°C. Bakteri yang tumbuh diambil menggunakan spatula dan disuspensikan ke dalam media ko-kultivasi cair sebanyak 10 ml yang mengandung asetosiringon 200 mM. Suspensi bakteri yang digunakan untuk menginokulasi embrio muda diukur kerapatannya hingga mencapai $OD_{600} = 1-1,5$.

Inokulasi embrio muda dengan *Agrobacterium*

Embrio muda yang telah diisolasi dari biji muda gandum ditanam di media ko-kultivasi padat (Tabel 1) dengan posisi skutelum menghadap ke atas. Sebanyak 5 µl suspensi *A. tumefaciens* yang telah disiapkan sebelumnya diteteskan pada setiap embrio muda gandum. Kultur kemudian diinkubasi di ruang gelap pada suhu 25°C selama 3–4 hari sebelum embrio muda dipindahkan ke media *resting* (Tabel 1). Kultur embrio muda di media *resting* diinkubasi di ruang gelap pada suhu 25°C selama satu minggu.

Seleksi dan regenerasi kalus hasil transformasi

Setelah ditumbuhkan di media *resting*, embrio muda hasil transformasi kemudian diseleksi dengan menumbuhkannya di media seleksi (Tabel 1). Kultur embrio muda di media seleksi diinkubasi di ruang dengan penyinaran penuh pada suhu 21°C selama 10–14 hari. Seleksi kedua dilakukan dengan subkultur setelah embrio muda berada dua minggu di media seleksi. Setelah melalui tahap seleksi, kalus yang berhasil tumbuh kemudian dipindahkan ke media regenerasi dengan komposisi zat pengatur tumbuh yang berbeda, yaitu R1H25 atau R2H25 (Tabel 1). Kultur kalus kemudian diinkubasi di ruang terang pada suhu 21°C selama 10–14 hari. Pada media R1H25 digunakan kombinasi zat pengatur tumbuh sitokinin (BAP) 1,5 mg/l + kinetin 0,5 mg/l sesuai dengan penelitian Sisharmuni *et al.* (2010), sedangkan media regenerasi R2H25 mengandung kombinasi zat pengatur tumbuh sitokinin (BAP) 1,5 mg/l + thidiazuron 0,2 mg/l. Telah diketahui bahwa thidiazuron merupakan zat pengatur tumbuh yang mempunyai efek kuat dalam mempengaruhi induksi kalus, induksi kalus embriogenik, inisiasi embrio somatik, inisiasi tunas adventif, dan proliferasi tunas aksiler.

Tunas dari kalus (bukan tunas apikal) yang tumbuh di media regenerasi setelah berukuran 2 cm kemudian dipindahkan ke media perakaran (Tabel 1), diinkubasi di ruang terang pada suhu 21°C selama 10–14 hari sampai akar tumbuh. Pemberian antibiotik higromisin ke dalam media perakaran bertujuan agar

transforman terseleksi pada tingkat planlet sehingga planlet yang diperoleh merupakan planlet transgenik yang mengandung gen *hpt*.

Aklimatisasi

Aklimatisasi dilakukan secara bertahap pada tunas yang telah membentuk akar (planlet). Planlet dikeluarkan dari media perakaran dan dibersihkan dari sisa-sisa agar yang masih menempel dengan air keran. Planlet yang telah bersih ditumbuhkan di media air selama satu minggu di laboratorium sebelum kemudian dipindahkan ke media tanah di polibag dan dipelihara di rumah kaca. Setelah membentuk dua helai daun muda baru, planlet dipindahkan ke dalam pot yang berisi tanah dan pupuk kandang. Keberhasilan aklimatisasi secara umum dihitung berdasarkan perbandingan antara jumlah planlet yang berhasil diaklimatisasi dan jumlah planlet hidup dan berakar normal. Keberhasilan aklimatisasi dinyatakan dalam persen (%).

Analisis molekuler tanaman hasil transformasi

Daun tanaman gandum transgenik putatif dipanen untuk materi isolasi DNA dengan menggunakan metode Dellaporta *et al.* (1983). Analisis molekuler yang digunakan adalah teknik PCR. Amplifikasi gen *hpt* dilakukan menggunakan sepasang primer spesifik untuk gen *hpt* yang mengamplifikasi bagian gen higromisin yang merupakan penanda seleksi yang ada pada plasmid pCAMBIA 1301. Kedua primer memiliki sekuen 5' GAT GCC TCC GCT CGA AGT AGC G 3' dan sekuen 5' GCA TCT GCC GTG CAC ATG 3'. Amplifikasi DNA dilakukan pada total reaksi 20 µl yang terdiri atas 2 µl 10× bufer PCR yang mengandung MgCl₂, 0,4 µl dNTP *mix* (10 mM), 1 µl dari setiap primer (5 µM), 0,16 µl enzim Taq DNA polimerase (5 unit/µl), dan 2 µl DNA gandum sebagai cetakan. Ukuran produk hasil amplifikasi PCR adalah 500 bp. Reaksi PCR dilakukan dengan denaturasi awal pada suhu 94°C selama 3 menit (satu siklus), dilanjutkan dengan 35 siklus yang terdiri atas denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, penempelan primer pada suhu 60°C selama 30 detik, dan pemanjangan primer pada suhu 72°C sela-

Tabel 1. Komposisi media transformasi gandum dengan bantuan *Agrobacterium tumefaciens*.

Media	Komposisi media
Ko-kultivasi	MS L7 + 2,4-D 0,5 mg/l + pikloram 2 mg/l + maltosa 80 g/l + asetosiringon 200 mM
Induksi kalus (<i>resting</i>)	MS L7 + 2,4-D 0,5 mg/l + pikloram 2 mg/l + maltosa 80 g/l + vankomisin 100 mg/l + sefotaksim 100 mg/l
Seleksi	MS L7 + 2,4-D 0,5 mg/l + pikloram 2 mg/l + maltosa 60 g/l + higromisin 25 mg/l + sefotaksim 100 mg/l + vankomisin 100 mg/l
Regenerasi (R1H25)	MS L7 + BAP 1,5 mg/l + kinetin 0,5 mg/l + tirosin 25 mg/l + vankomisin 100 mg/l + sefotaksim 100 mg/l + higromisin 25 mg/l
Regenerasi (R2H25)	MS L7 + BAP 1,5 mg/l + thidiazuron 0,2 mg/l + tirosin 25 mg/l + vankomisin 100 mg/l + sefotaksim 100 mg/l + higromisin 25 mg/l
Perakaran	MS L7+ higromisin 25 mg/l

ma 45 detik. Pemanjangan primer terakhir dilakukan pada suhu 72°C selama 7 menit. Analisis molekuler dilakukan terhadap DNA tanaman gandum transgenik putatif, tanaman gandum tetua non transgenik, ddH_2O sebagai kontrol negatif, dan plasmid pCAMBIA 1301 sebagai kontrol positif.

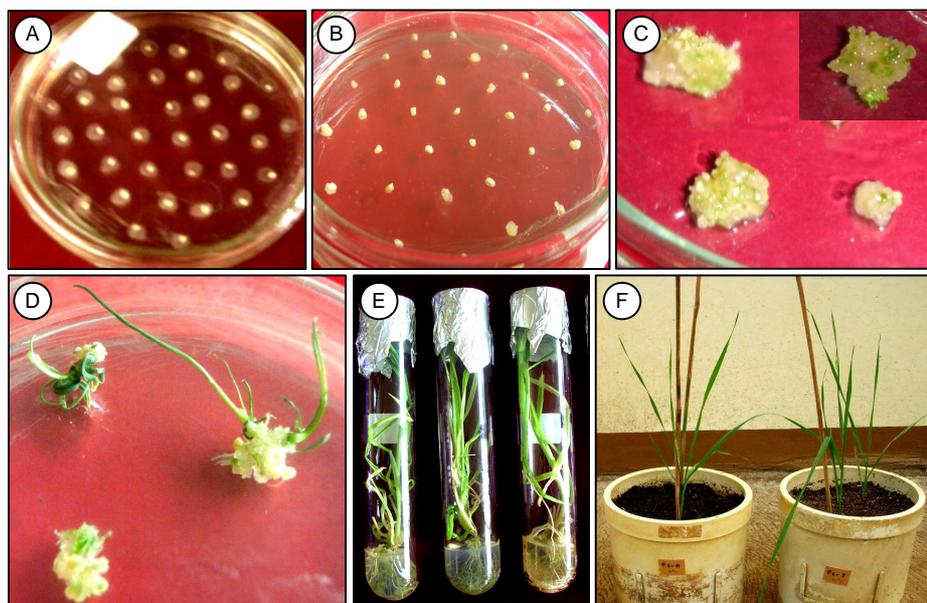
Pengamatan dan analisis data

Pengamatan dilakukan terhadap kalus yang tumbuh baik di media *resting*, seleksi, maupun regenerasi. Selain diamati morfologinya, dilakukan penghitungan jumlah embrio muda yang ditransformasi (jumlah eksplan awal), jumlah kalus yang lolos seleksi di media seleksi, jumlah kalus yang berhasil membentuk spot hijau di media seleksi, jumlah kalus yang berhasil membentuk tunas di media regenerasi (R1H25 atau R2H25), dan jumlah tunas yang mampu membentuk akar di media perakaran. Tingkat *escape* tanaman transgenik putatif diperoleh dari perbandingan antara jumlah tanaman transgenik putatif yang menunjukkan hasil negatif berdasarkan analisis PCR untuk gen *hpt* dan jumlah tanaman transgenik putatif yang dianalisis PCR. Efisiensi transformasi untuk setiap genotipe dilakukan dengan menghitung perbandingan antara jumlah tanaman yang positif mengandung gen *hpt* (yang telah dianalisis secara molekuler/PCR) dan jumlah embrio awal yang ditransformasi. Tingkat *escape* dan efisiensi transformasi dinyatakan dalam persen (%).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil transformasi gandum dengan bantuan *A. tumefaciens* disajikan pada Gambar 1. Semua genotipe gandum yang diuji dapat diinduksi membentuk kalus setelah embrio muda diinfeksi dengan *Agrobacterium*. Persentase pembentukan kalus di media *resting* (induksi kalus) tertinggi dicapai oleh Fasan (95,47%), sedangkan terendah dicapai oleh Perdix (52,51%) (Tabel 2). Media *resting* mengandung dua macam zat pengatur tumbuh auksin kuat, yaitu 2,4-D dan Pikloram. Menurut Jones *et al.* (2005), kedua zat pengatur tumbuh tersebut dapat mempengaruhi proses pembelahan dan perbanyakan sel. Secara visual, bentuk kalus dari Fasan umumnya relatif lebih kompak dan tidak berair. Ukuran kalus pada media *resting* tidak menunjukkan perbedaan antargenotipe.

Kalus yang tumbuh di media *resting* kemudian dipindahkan ke media seleksi yang mengandung antibiotik higromisin untuk menyeleksi kalus yang telah tertransformasi. Apabila dilihat dari jumlah kalus yang mampu bertahan di media seleksi pada tahap 1 sampai dengan tahap 2, Fasan mempunyai persentase paling tinggi dalam menghasilkan kalus yang tahan di media seleksi, yaitu sebesar 30%. Jumlah kalus yang dapat bertahan di media seleksi semakin menurun setelah dua kali ditumbuhkan di media seleksi (Tabel 2). Efektivitas antibiotik higromisin untuk menyeleksi kalus hasil transformasi di media seleksi dapat dilihat dengan terjadinya penghambatan pertumbuhan kalus



Gambar 1. Proses transformasi gandum melalui *Agrobacterium tumefaciens* yang mengandung vektor biner pCAMBIA1301. A = eksplan embrio muda yang diinfeksi dengan *A. tumefaciens* di media ko-kultivasi, B = eksplan di media *resting*, C = kalus di media seleksi tahap 2, D = kalus di media regenerasi, E = planlet di media perakaran, F = planlet yang berhasil diaklimatisasi di rumah kaca.

di media seleksi. Hal ini mulai terlihat setelah kalus ditumbuhkan selama lebih kurang 10 hari di media seleksi yang mengandung higromisin 25 mg/l. Penghambatan pertumbuhan ditunjukkan dengan mulai terjadinya pencokelatan pada beberapa kalus.

Dari hasil pengamatan, kalus yang berhasil lolos di media seleksi tahap 1 akan membentuk spot hijau pada 7–21 hari setelah kalus dipindahkan ke media seleksi pada tahap 2 (Gambar 1). Terdapat perbedaan kemampuan kalus dalam membentuk spot hijau (Tabel 2). Kalus-kalus dari Fasan mempunyai persentase paling tinggi dalam membentuk spot hijau (9,6%), diikuti oleh Perdix (6,5%), Naxos-Wew (5,9%), dan Combi (5,3%). Perbedaan kemampuan genotipe dalam merespon pembentukan kalus dan regenerasi gandum hasil transformasi juga dilaporkan oleh Tao *et al.* (2011). Tahap seleksi ini juga sangat dipengaruhi oleh kandungan zat pengatur tumbuh yang ditambahkan ke dalam media. Zat pengatur tumbuh golongan auksin mempunyai peran penting dalam embriogenesis somatik. Pada media seleksi ini, penggunaan dua macam auksin secara bersamaan, yaitu 2,4-D dan pikloram, mampu menginduksi sel embrio muda menjadi kalus embriogenik.

Umumnya spot hijau yang terbentuk akan berkembang menjadi tunas di media regenerasi. Tunas kecil akan muncul dan berkembang lebih kurang satu minggu setelah spot hijau muncul. Namun demikian, tidak semua kalus dengan spot hijau dapat berkembang menjadi tunas. Pada Fasan dan Combi, spot hijau pada kalus dapat berkembang menjadi tunas, sedangkan pada Perdix dan Naxos-Wew spot hijau mempunyai kecenderungan untuk membentuk struktur akar dan hanya sedikit yang dapat membentuk tunas.

Hasil pengamatan kalus yang dipindahkan ke dalam dua macam media regenerasi menunjukkan bahwa

kalus hasil transformasi dari empat genotipe gandum yang diregenerasikan mempunyai respon yang berbeda terhadap media regenerasi yang digunakan (Tabel 3). Hanya sebagian kecil dari spot hijau pada kalus yang dapat beregenerasi membentuk tunas. Kalus dari Combi dan Fasan memberikan respon yang lebih baik dibanding dengan Perdix dan Naxos-Wew, baik pada media regenerasi R1H25 maupun R2H25. Nilai efisiensi pembentukan tunas dari kedua genotipe tersebut pada dua macam media regenerasi (R1H25 dan R2H25) tidak menunjukkan perbedaan secara mencolok. Nilai efisiensi pembentukan tunas dari kalus dengan spot hijau pada Combi di media R1H25 sebesar 25% dan di media R2H25 sebesar 23,8%, sedangkan Fasan menunjukkan nilai efisiensi pembentukan tunas relatif lebih tinggi, yaitu sebesar 27% di media R1H25 dan 28,6% di media R2H25.

Media regenerasi R1H25 mengandung kombinasi zat pengatur tumbuh BAP dan kinetin, sedangkan media R2H25 mengandung kombinasi zat pengatur tumbuh BAP dan thidiazuron. Zat pengatur tumbuh BAP merupakan jenis zat pengatur tumbuh sintetik yang stabil, tahan terhadap oksidasi, dan dapat merespon secara cepat. Penelitian yang dilakukan Sarker dan Biswas (2002) menyimpulkan bahwa kombinasi BAP dan kinetin merupakan kombinasi terbaik untuk meregenerasikan kalus embrio gandum yang belum masak (*immature embryo*). Menurut Schulze (2007), thidiazuron merupakan jenis sitokinin yang kuat dalam mempengaruhi induksi kalus, induksi kalus embriogenik, inisiasi embrio somatik, inisiasi tunas adventif, dan proliferasi tunas aksilar. Thidiazuron juga mampu meningkatkan jumlah tunas dan dapat mempercepat induksi tunas. Penelitian yang dilakukan oleh Xueyan *et al.* (2000) tentang pengaruh thidiazuron terhadap regenerasi gandum dan *barley* menunjukkan bahwa zat pengatur tumbuh thidiazuron seba-

Tabel 2. Jumlah embrio dan kalus di media *resting*, seleksi, serta jumlah kalus dengan spot hijau.

Genotipe	Jumlah embrio	Jumlah embrio membentuk kalus di media <i>resting</i> (%)	Jumlah kalus tahan di media seleksi I (%)	Jumlah kalus tahan di media seleksi II (%)	Jumlah kalus dengan spot hijau (%)
Combi	777	697 (89,70)	617 (79,41)	154 (19,8)	41 (5,3)
Fasan	750	716 (95,47)	656 (87,47)	225 (30)	72 (9,6)
Perdix	1.295	680 (52,51)	629 (48,57)	297 (22,9)	84 (6,5)
Naxos-Wew	837	538 (64,28)	457 (54,60)	188 (22,5)	49 (5,9)

Tabel 3. Kalus yang tumbuh pada dua macam media regenerasi (R1H25 dan R2H25).

Genotipe	Jumlah kalus dengan spot hijau di media regenerasi		Jumlah tunas di media regenerasi (%)	
	R1H25	R2H25	R1H25	R2H25
Combi	20	21	5 (25)	5 (23,8)
Fasan	37	35	10 (27)	10 (28,6)
Perdix	42	40	8 (19)	4 (10)
Naxos-Wew	24	25	3 (12,5)	4 (16)

nyak 0,2 mg/l berhasil meregenerasikan kalus gandum cv. Bob White dan Hi-Line.

Penggunaan dua macam media regenerasi dalam penelitian ini tidak menunjukkan adanya perbedaan yang mencolok dalam menginduksi tunas pada setiap genotipenya. Persentase kalus yang beregenerasi pada dua jenis media regenerasi (R1H25 dan R2H25) dari tiap genotipe gandum yang sama, nilainya tidak jauh berbeda. Akan tetapi, apabila dilihat dari komposisinya, suatu jenis media regenerasi yang memberikan keberhasilan dalam menginduksi tunas suatu genotipe, belum tentu memberikan keberhasilan yang sama pada genotipe yang lain (Tabel 3).

Kalus Perdix dan Naxos-Wew mempunyai persentase keberhasilan pembentukan tunas relatif lebih rendah bila dibanding dengan genotipe Fasan dan Combi (Tabel 3). Kalus dari Perdix dan Naxos-Wew secara umum berhasil membentuk spot hijau sejak awal tahap regenerasi, namun tidak mampu berkembang lebih lanjut membentuk tunas di media regenerasi. Sulitnya regenerasi ini dapat disebabkan oleh beberapa hal, di antaranya respon yang rendah dari kedua genotipe tersebut terhadap jenis zat pengatur tumbuh yang ditambahkan ke dalam media kultur sehingga tidak mampu membentuk kalus embriogenik. Kemungkinan lain disebabkan oleh pertumbuhan akar yang terlalu banyak pada tahap kalus sehingga mengganggu proses regenerasi.

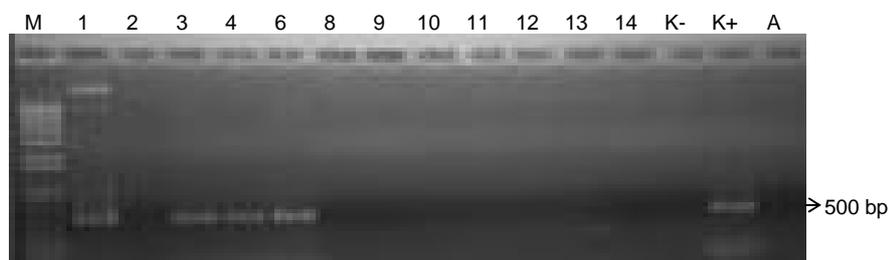
Hasil pengamatan terhadap pembentukan kalus dan keberhasilan kalus beregenerasi dari empat geno-

tipe gandum yang telah ditransformasi menunjukkan bahwa Fasan lebih tanggap bila dibanding dengan Perdix, Combi, dan Naxos-Wew. Hasil ini berbeda dengan hasil penelitian Sisharmini *et al.* (2010) tentang tingkat keberhasilan induksi kalus dan regenerasi dari keempat genotipe gandum yang sama secara *in vitro*, namun tanpa diinfeksi dengan *A. tumefaciens* (tidak ditransformasi). Hasil penelitian Sisharmini *et al.* (2010) menunjukkan bahwa tanpa ditransformasi, Perdix merupakan genotipe yang paling mudah beregenerasi dengan frekuensi regenerasi sebesar 57,33%, sedangkan Fasan tidak mampu membentuk tunas pada media regenerasi. Pada penelitian ini, efisiensi pembentukan tunas pascatransformasi pada Fasan di media R1H25 sebesar 27%, sedangkan pada Perdix hanya 19% (Tabel 3). Media regenerasi yang digunakan pada penelitian Sisharmini *et al.* (2010) sama dengan media R1H25 pada penelitian ini, tetapi tanpa diberi antibiotik higromisin. Higromisin yang ditambahkan pada penelitian ini merupakan alat seleksi pascatransformasi. Dengan demikian, berkurangnya daya regenerasi jaringan tanaman pada penelitian ini kemungkinan selain disebabkan oleh proses transformasi genetik, juga dapat disebabkan oleh penambahan higromisin ke dalam media seleksi.

Planlet yang diduga transgenik seharusnya tetap tumbuh di media perakaran yang diberi higromisin dengan membentuk akar secara sempurna dan akarnya berwarna putih (Gambar 1). Namun ternyata tidak semua planlet dapat bertahan di media perakaran.

Tabel 4. Jumlah planlet di media perakaran, jumlah planlet mati dengan akar cokelat, jumlah planlet hidup yang berhasil membentuk akar normal, dan jumlah planlet yang berhasil diaklimatisasi.

Genotipe	Jumlah planlet di media perakaran		Jumlah planlet mati berakar cokelat		Jumlah planlet hidup berakar normal		Jumlah planlet yang berhasil diaklimatisasi	
	R1H25	R2H25	R1H25	R2H25	R1H25	R2H25	R1H25	R2H25
Combi	4	5	2	3	2	2	1	0
Fasan	9	10	4	3	5	7	3	6
Perdix	8	4	6	1	2	3	1	3
Naxos-Wew	3	4	2	4	1	0	0	0
Jumlah	24	23	14	11	10	12	5	9



Gambar 2. Hasil amplifikasi gen *hpt* dengan metode PCR pada daun gandum hasil transformasi dengan bantuan *Agrobacterium tumefaciens*. M = 1 kb DNA ladder, 1–14 = nomor sampel DNA, K- = kontrol negatif/DNA tanaman non transgenik, K+ = kontrol positif/DNA plasmid, A = air.

Planlet yang tidak dapat bertahan di media perakaran akan terhambat pertumbuhan akarnya, akarnya menjadi cokelat, dan akhirnya planlet mati. Secara umum, jumlah planlet yang tidak dapat bertahan di media perakaran sangat tinggi, yaitu sebesar 53,19%. Persentase tersebut diperoleh dari hasil perhitungan perbandingan antara jumlah total planlet mati berakar cokelat dan jumlah total planlet yang ditumbuhkan di media perakaran.

Tunas-tunas transgenik putatif yang tumbuh baik di media perakaran, kemudian akan tumbuh menjadi planlet. Planlet yang berhasil diaklimatisasi sebanyak empat belas planlet (Tabel 4). Secara umum, persentase keberhasilan aklimatisasi masih cukup tinggi, yaitu sebesar 63,6%. Naxos-Wew tidak menghasilkan planlet yang berhasil diaklimatisasi, sedangkan Combi hanya menghasilkan satu planlet yang berhasil diaklimatisasi. Planlet yang paling banyak berhasil diaklimatisasi dari Fasan, diikuti oleh Perdix (Tabel 4).

Analisis Molekuler Tanaman Hasil Transformasi

Analisis PCR hanya dilakukan pada dua belas sampel DNA tanaman transgenik putatif (generasi T₀) yang berasal dari genotipe Fasan, Perdix, dan Combi. Hasil analisis PCR menunjukkan terdapat empat sampel DNA (33,3%) yang positif menghasilkan amplicon dengan ukuran 500 bp (sama dengan kontrol positif/ DNA plasmid yang mengandung gen *hpt*) (Gambar 2). Dari empat tanaman yang positif mengandung gen *hpt*, tiga tanaman dari Fasan dan satu tanaman dari Combi. Hasil ini menunjukkan hanya empat tanaman yang merupakan transforman gandum karena mengandung gen *hpt* yang telah berhasil diintroduksi ke dalam jaringan tanaman, sedangkan delapan tanaman lainnya bukan transforman.

Tingkat *escape* tanaman hasil transformasi dengan bantuan *A. tumefaciens* yang diperoleh masih sangat tinggi. Jika dilihat dari hasil analisis molekuler, tingkat *escape* mencapai sekitar 66,6%. Hal ini kemungkinan disebabkan karena kurang tingginya konsentrasi higromisin yang ditambahkan ke dalam media seleksi sehingga konsentrasi higromisin 25 mg/l belum mampu menyeleksi secara ketat sel-sel kalus yang benar-benar tertransformasi. Alpeter *et al.* (1996) dalam Zhang *et al.* (2000) melaporkan bahwa tingkat *escape* yang terjadi pada proses transformasi genetik gandum dengan menggunakan metode penembakan partikel juga sangat tinggi, yaitu berkisar antara 55–88%.

Nilai efisiensi transformasi yang diperoleh dari hasil penelitian ini masih sangat rendah. Bila dihitung dari hasil analisis molekuler, nilai efisiensi transformasi Fasan sebesar 0,4%, sedangkan Combi sebesar

0,1%. Jones *et al.* (2005) menyatakan dalam review-nya bahwa rata-rata efisiensi transformasi tanaman gandum dengan eksplan embrio muda pada varietas Florida (*winter wheat*), Filder, dan Cadenza (*spring wheat*) menggunakan bantuan *Agrobacterium* sebesar 1%. Hal ini menunjukkan bahwa keberhasilan transformasi memang *genotype dependent* seperti dikemukakan oleh Raja *et al.* (2010) dan Tao *et al.* (2011).

KESIMPULAN DAN SARAN

Gandum varietas Fasan lebih responsif untuk di-transformasi dengan bantuan *A. tumefaciens* dibandingkan dengan Perdix, Combi, dan Naxos-Wew. Hal ini ditunjukkan dengan adanya respon yang lebih baik dari eksplan embrio muda Fasan yang telah ditransformasi dalam membentuk kalus di media induksi kalus (*resting*), yaitu sebesar 95,47%, dan pembentukan tunas pada media regenerasi dengan persentase sebesar 27% di media R1H25 dan 28,6% di media R2H25, walaupun dengan efisiensi transformasi yang masih rendah (0,04%).

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan melakukan kombinasi perlakuan media dan metode transformasi yang lebih bervariasi untuk mendapatkan sistem transformasi dengan nilai efisiensi transformasi yang lebih tinggi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Nuryati dan Heri Hersusatio atas bantuan teknis selama penelitian berlangsung.

DAFTAR PUSTAKA

- Aminasih, N. 2009. Penentuan kriteria seleksi 45 galur terigu (*Triticum aestivum* L.) introduksi di Dempo Selatan, Pagar Alam, Sumatera Selatan. J. Penelitian Sains 12(1):1-5.
- Carsono, N. and T. Yoshida. 2006. Plant regeneration capacity of calluses derived seed of five rice genotypes. Plant Prod. Sci. 9(1):71-77.
- Dellaporta, S.L., J. Wood, and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. Plant Mol. Biol. Rep. 1(4):19-21.
- He, Y., H.D. Jones, S. Chen, X.M. Chen, D.W. Wang, K.X. Li, D.S. Wang, and L.Q. Xia. 2010. *Agrobacterium*-mediated transformation of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum* cv. Stewart) with improved efficiency. J. Exp. Bot. 61(6):1567-1581.
- Jones, H., A. Doherty, and H. Wu. 2005. Review of methodologies and a protocol for the *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat. <http://www.plantmethods.com>. [25 Februari 2010].

- Parrott, D.L., A.J. Anderson, and J.G. Carman. 2002. *Agrobacterium* induces plant cell death wheat (*Triticum aestivum* L.). *Phys. Mol. Plant Path.* 60:59-69.
- Pastori, G.M., M.D. Wilkinson, S.H. Steele, C.A. Sparks, H.D. Jones, and M.A.J. Parry. 2001. Age-dependent transformation frequency in elite wheat varieties. *J. Exp. Bot.* 52(357):857-863.
- Petri, C. and L. Burgos. 2005. Advances and future perspectives in fruit tree transformation. <http://www.isb.vt.edu/articles/may0502.htm>. [20 Januari 2014].
- Raja, N.I., A. Bano, H. Rashid, Z. Chaudhry, and N. Ilyas. 2010. Improving *Agrobacterium* mediated transformation protocol for integration of *Xa21* gene in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Pak. J. Bot.* 42(5):3613-3631.
- Razzaq, A., I.A Hafiz, I. Mahmood, and A. Hussain. 2011. Development of *in planta* transformation protocol for wheat. *Afr. J. Biotech.* 10(5):740-750.
- Sarker, R.H. and A. Biswas. 2002. *In vitro* planlet regeneration and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Tiss. Cult.* 12(2):155-165.
- Schulze, J. 2007. Improvements in cereal tissue culture by thidiazuron: A review. *Fruit, Veg. Cereal Sci. Biotech.* 1(2):64-79.
- Shrawat, A.K. and L. Horst. 2006. *Agrobacterium*-mediated transformation of cereals: A promising approach crossing barriers. *J. Plant Biotech.* 4:575-603.
- Sisharmini, A., A. Apriana, dan Sustiprijatno. 2010. Induksi kalus dan regenerasi beberapa genotipe gandum (*Triticum aestivum* L.) secara *in vitro*. *J. AgroBiogen* 6(2):57-64
- Supartana, P., T. Shimizu, M. Nogawa, H. Shioiri, T. Nakajima, N. Haramoto, M. Nozue, and M. Kojima. 2006. Development of simple and efficient *in planta* transformation method for wheat (*Triticum aestivum* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Biosci. Bioeng.* 102:162-170.
- Tao, L-l., G-x. Yin, L-p. Du, Z-y. Shi, M-y. She, H-j. Xu, and X-g. Ye. 2011. Improvement of plant regeneration from immature embryos of wheat infected by *Agrobacterium tumefaciens*. *Agric. Sci. China* 10(3):317-326.
- Zhang, L., J.J. Rybczynski, W.G. Langenberg, A. Mitra, and R.C. French. 2000. An efficient wheat transformation procedure: Transformed calli with long-term morphogenic potential for plant regeneration. *Plant Cell Rep.* 19:241-250.
- Xueyan, S., L. Desen, and Q. Rongda. 2000. Thidiazuron promotes *in vitro* regeneration of wheat and barley. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 36:207-210.
-