

**PENGARUH STRAIN *AGROBACTERIUM* TERHADAP
EFISIENSI TRANSFORMASI GENETIK
JAGUNG GENOTIPE HIBRIDA HiII**

***THE EFFECT OF STRAINS OF AGROBACTERIUM ON THE
EFFICIENCY OF GENETIC TRANSFORMATION OF HiII MAIZE HYBRID***

Setyo Dwi Utomo¹

ABSTRACT

Genetic variation in development of maize cultivar can be enhanced using genetic transformation. An efficient procedure of genetic transformation ultimately can accelerate the process of cultivar development. Transgenic maize plants have been produced from Agrobacterium-mediated transformation using explants of immature embryos of A188 and HiII. HiII is a hybrid derived from A188 x B73. The objectives of this study were to evaluate the efficiency of maize transformation using strain of Agrobacterium C58C1; and compare the efficiency of transformation using three strain of Agrobacterium, i.e., C58C1, NTL4-Cry5, dan LBA4404. The evaluation was based on GUS transient expression and the proportion of transgenic plantlets. Explants of immature embryos were isolated from immature ears harvested 11-13 days after pollination. Then explants were inoculated with Agrobacterium, cultured in co-cultivation medium for 1-2 days, then in delay medium for 7-14 days, in selection medium for 4 x 14 days, in regeneration medium, and finally in germination medium. Based on assay at 2 days after inoculation, GUS transient expression at scutelar side of explants inoculated with strain NTL4-Cry5 was higher than that of inoculated with C58C1 or LBA4404. However, the results of four experiments indicated that transgenic plantlets were only produced from explants inoculated with strain C58C1, with efficiency 1,3-5,8 %.

Key words: HiII, genetic engineering, Agrobacterium strain, Zea mays

INTISARI

Keragaman genetik dalam perakitan varietas unggul jagung dapat ditingkatkan menggunakan transformasi genetik. Prosedur transformasi genetik yang efisien pada akhirnya mempercepat proses perakitan varietas. Tanaman jagung transgenik telah diperoleh dari transformasi menggunakan *Agrobacterium* dari eksplan A188 dan HiII. HiII adalah hibrida dari A188 x B73. Penelitian ini bertujuan mengevaluasi efisiensi transformasi genetik jagung menggunakan *Agrobacterium* strain C58C1 dan membandingkan efisiensi transformasi menggunakan tiga strain *Agrobacterium*, yaitu C58C1, NTL4-Cry5, dan LBA4404. Evaluasi didasarkan pada data ekspresi transien GUS dan proporsi plantlet transgenik. Eksplan embrio muda diisolasi dari tongkol muda yang dipanen 11–13 hari setelah polinasi. Selanjutnya eksplan diinokulasi dengan

¹ Dosen Jurusan Budidaya Pertanian dan Kepala Laboratorium Bioteknologi Pertanian
Fakultas Pertanian Universitas Lampung

Agrobacterium; dan berturut-turut dikulturkan pada medium ko-kultivasi, tunda, seleksi, regenerasi, dan pengecambahan. Berdasar ekspresi transien GUS 2 hari setelah inokulasi, ekspresi GUS pada sisi skutelar embrio muda yang diinokulasi strain NTL4-Cry5 lebih tinggi daripada yang diinokulasi C58C1 atau LBA4404. Meskipun demikian, dari empat percobaan yang dilakukan, plantlet transgenik hanya diperoleh dari eksplan yang diinokulasi strain C58C1 dengan efisiensi 1,3 – 5,8%.

Kata kunci: HiII, rekayasa genetika, Strain *Agrobacterium*, *Zea mays*

PENDAHULUAN

Prosedur transformasi genetik yang efisien dapat mempermudah studi biologi molekuler dan perakitan varietas unggul jagung. Transformasi genetik jagung telah berhasil dilakukan menggunakan penembak biolistik (Gordon-Kamm *et al.*, 1990; Frame *et al.*, 2000), elektroporasi (D'Halluin *et al.*, 1992), dan *Agrobacterium* (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 yang lebih besar transgen tereksresi dengan jumlah lokus yang lebih rendah (Ishida *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 1998). Efisiensi transformasi menggunakan *Agrobacterium* dipengaruhi oleh strain *Agrobacterium*. Perbedaan antar-strain *Agrobacterium* ditentukan oleh tipe kromosom dan tipe Ti-plasmid. Tipe kromosom dalam sel bakteri *Agrobacterium* a.l. terdiri dari *octopine*, *nopaline*, dan *chrysoptine*; sedangkan tipe Ti-plasmid a.l. terdiri dari *octopine*, *nopaline*, *chrysoptine*, dan *succinamopine*. Grant *et al.* (2003) melaporkan bahwa strain KYRT1 tiga kali lebih efisien daripada AGL1 dalam transformasi kacang kapri.

Tanaman jagung transgenik telah diperoleh dari transformasi menggunakan *Agrobacterium* dari eksplan A188 dan HiII yang diinokulasi menggunakan strain C58C1 (Dr. Thomas E. Clemente, *University of Nebraska-Lincoln*, komunikasi pribadi). HiII adalah hibrida dari A188 x B73.

Penelitian ini bertujuan 1) Mengevaluasi efisiensi transformasi jagung genotipe HiII menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* strain C58C1; 2) membandingkan efisiensi transformasi jagung genotipe HiII menggunakan tiga strain *Agrobacterium*: C58C1, LBA4404, dan NTL4-Cry5.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di *Plant Transformation Core Research Facility, Center of Biotechnology, University of Nebraska, Lincoln, Nebraska, Amerika Serikat* dari bulan Juni – November 2002. Penelitian terdiri dari empat percobaan, yaitu Percobaan I, II, dan III (transformasi menggunakan *Agrobacterium* strain C58C1); dan Percobaan IV (transformasi menggunakan dan membandingkan tiga strain *Agrobacterium*). Percobaan I, II, dan III pada dasarnya sama tetapi dilaksanakan pada minggu yang berbeda.

Bahan tanaman dan eksplan. Embrio zigotik muda (1.5 – 2.0 mm) genotipe HiII (Armstrong *et al.*, 1991) digunakan sebagai eksplan dalam penelitian ini. Embrio tersebut diisolasi dari tongkol muda yang dipanen 11 – 13 hari setelah polinasi. HiII adalah hibrida dari A188 x B73. 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 2 tetes per liter Tween 20. Tongkol muda kemudian dibilas tiga kali menggunakan air akuades steril. Bagian luar 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*. Strain *Agrobacterium tumefaciens* yang digunakan dalam penelitian ini, C58C1, LBA4404, dan NTL4/Cry5, membawa vektor transformasi pPTN290 (Gambar 1). Vektor tersebut membawa gen *iudA* (GUS) dan *nptII* untuk ketahanan terhadap kanamisin. Ketiga strain berbeda dalam tipe Ti-plasmid dan tipe kromosom (Tabel 1). Ti-plasmid terdiri dari tipe *nopaline*, *octopine*, dan *chrysoptine*, sedangkan tipe kromosom terdiri dari tipe *nopaline* dan *octopine*.

Persiapan inokulum. Kultur sel bakteri *Agrobacterium* dimulai dengan menumbuhkan bakteri dalam 50 ml medium LB cair yang mengandung antibiotika yang sesuai selama 8-9 jam dalam inkubator 250 RPM, 28 C. Kemudian sel di-suspensi pada medium AB minimal dengan OD₆₅₀ = 0,2 dan dibiarkan tumbuh selama 12-14 jam. Sel dipanen dan disuspensikan dalam medium inokulasi cair. Kepadatan populasi sel disesuaikan sehingga OD₆₅₀ berkisar antara 0,6–0,8.

Medium untuk transformasi tanaman. Semua media 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: medium 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; medium tunda mengandung 1,7 mg/L AgNO₃, 50 mg/L carbenicillin, and 3 mM MES (pH 5,8); Medium seleksi meliputi medium tunda yang dilengkapi dengan 100 mg/l paramomisin. Penambahan 2,4-D pada medium tunda dan medium seleksi ditujukan untuk menginduksi kalus embrionik tipe II (Armstrong dan Green, 1985). Kalus embrionik yang tumbuh pada medium seleksi selama 4 x 14 hari dikategorikan kalus transgenik putatif. Untuk mendapatkan plantlet transgenik, kalus transgenik dikulturkan pada medium regenerasi untuk maturasi embrio dan pengecambahan. Medium pengecambahan merupakan medium MS tanpa zat pengatur tumbuh.

Inokulasi, kokultivasi, kultur pada medium tunda, dan kultur pada medium seleksi. Skema garis besar tahap-tahap transformasi genetik jagung diuraikan pada Gambar 2. Eksplan embrio muda yang diisolasi dari tongkol dikumpulkan dalam cawan petri berisi medium inokulasi cair. Medium inokulasi tersebut kemudian diisap dengan pipet untuk dibuang dan diganti dengan suspensi *Agrobacterium*. Eksplan direndam dalam suspensi *Agrobacterium* selama 5 menit yang selanjutnya suspensi dibuang dengan cara diisap menggunakan pipet. Eksplan selanjutnya dikulturkan pada medium ko-kultivasi padat, dengan cara menghadapkan sisi skutelar ke bawah bersentuhan dengan permukaan medium, 25 eksplan per cawan petri. Ko-kultivasi dilakukan dengan cara mengikubasi kultur dalam inkubator 24 C gelap selama 1-2 hari. Kondisi suhu dan cahaya dalam inkubator untuk ko-kultivasi juga berlaku untuk kultur dalam medium tunda dan medium seleksi. Eksplan kemudian dikulturkan pada medium tunda selama 7-14 hari, dan pada medium seleksi selama 4 x 14 hari. Koleoptil yang memanjang dipotong pada 4-5 HSI. Jaringan mati dibuang pada waktu dilakukan transfer antar-medium atau sub-kultur. Kalus embrionik yang tumbuh pada medium seleksi 4 x 14 hari dipindahkan ke medium regenerasi untuk maturasi dan pengecambahan. Planlet di-aklimatisasi dan ditanam di rumah kaca. Variabel yang diamati adalah efisiensi transformasi berdasar a) Ekspresi transien GUS pada eksplan embrio zigotik muda; b) Proporsi plantlet transgenik, yaitu

jumlah plantlet transgenik dibagi jumlah eksplan yang diinokulasi. Plantlet transgenik tumbuh pada medium seleksi yang mengandung paromomisin dan bereaksi positif dalam uji *NPTII ELISA* (Cat. No. 73000, Agdia Inc., 30380 County Road 6, Elkhart, Indiana 46514 USA).

Ekspresi transien GUS (β -glucuronidase) pada sisi skutelar dan aksilar eksplan embrio muda. Ekspresi transien GUS didasarkan pada aktivitas enzim β -glucuronidase yang di-asai secara histokimia pada eksplan atau jaringan kalus pada 2 dan 8 hari setelah inokulasi (HSI). Sampel 1-3 eksplan per cawan Petri diinkubasi selama 16 jam dalam larutan *5-bromo-4-chloro-3-indolyl-3-glucuronic acid (X-Gluc)* seperti yang diuraikan oleh Jefferson. (1987). Ekspresi transien GUS hanya diamati pada Percobaan IV. Pada 2 HSI, ekspresi transien dinilai pada sisi skutelar dan aksilar; sedangkan pada 8 HSI, ekspresi dinilai hanya pada sisi skutelar. 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 > 0 tetapi $\leq 10\%$, > 10 tetapi $\leq 20\%$, ..., > 70% tetapi $\leq 80\%$; dan 9 menunjukkan luas penutupan > 80%. Pengamatan skor GUS dilakukan menggunakan mikroskop binokular. Data dianalisis menggunakan *Proc Univariate* (SAS Institute, Cary, NC, USA) untuk menghitung nilai tengah, galat baku, dan jumlah eksplan yang menunjukkan skor \geq nilai tertentu (Tabel 2).

Analisis molekuler. Analisis blot Southern (Southern, 1975) dilakukan terhadap 10 tanaman transgenik putatif R_0 dari 5 transforman yang independen hasil Percobaan IV yang diinokulasi dengan *Agrobacterium* strain C58C1. 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) didigesti 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 *BglII* 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 32 P radioaktif. Hibridisasi dilakukan dalam inkubator bersuhu 65 C dalam larutan 0.5 M Na_2HPO_4 , pH 7.2, 7% (w/v) SDS selama 14 jam. Filter dicuci dua kali dalam larutan 40 mM Na_2HPO_4 , 5% (w/v) SDS, pH 7.2 pada suhu 65 C selama 15 menit. Pencucian ketiga dilakukan dalam larutan 40 mM Na_2HPO_4 , 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 DAN PEMBAHASAN

Tanaman jagung transgenik diregenerasikan dari sel atau jaringan transgenik. Sel transgenik adalah sel yang diinfeksi *Agrobacterium* selama tahap ko-kultivasi. Prosedur transformasi yang efisien ditunjukkan oleh infeksi *Agrobacterium* pada sel atau jaringan meristematis dan proporsi plantlet transgenik.

Karena vektor transformasi yang digunakan dalam penelitian ini (pPTN290) membawa kaset gen GUS, tingkat infeksi dapat diduga berdasar asai histokimia GUS (Jefferson, 1987). Berdasar pengamatan 2 hari setelah inokulasi (HSI), GUS terekspresi pada eksplan yang diinokulasi oleh tiga strain yang digunakan dalam penelitian ini (Tabel 2). Hal ini menunjukkan bahwa C58C1, NTL4-Cry5, dan LBA4404 mampu menginfeksi eksplan embrio zigotik muda jagung. Dengan kata lain, embrio zigotik muda jagung

dapat diinfeksi oleh ketiga strain tersebut. Dalam embriogenesis somatik jagung, kalus embriogenik muncul dari sisi skutelar eksplan embrio muda zigotik Armstrong dan Green, 1985). Skor ekspresi transien GUS pada sisi skutelar dan aksilar dapat digunakan untuk menduga efisiensi transformasi. Skor yang tinggi pada sisi skutelar menunjukkan transformasi yang efisien. Data ekspresi transien tersebut menunjukkan bahwa sebagian jaringan eksplan telah terinfeksi *Agrobacterium*. Infeksi merupakan salah satu tahap dalam proses transfer gen menggunakan *Agrobacterium*. Dalam proses infeksi, ruas T-DNA dipindahkan dari sel bakteri *Agrobacterium* ke dalam sel tanaman

Dengan menggunakan Proc Univariate (SAS Institute, Cary, NC, USA) diperoleh data nilai tengah dan jumlah atau proporsi eksplan yang menunjukkan skor \geq nilai tertentu (Tabel 2). Berdasar ekspresi transien GUS 2 hari setelah inokulasi, ekspresi GUS pada sisi skutelar embrio muda yang diinokulasi strain NTL4-Cry5 lebih tinggi daripada yang diinokulasi C58C1 atau LBA4404. Walaupun LBA4404 mampu menginfeksi embrio muda jagung, skor ekspresi GUS eksplan yang diinokulasi LBA4404, sebesar $0,15 \pm 0,10$, termasuk katagori sangat rendah. Dengan demikian, LBA4404 sebaiknya tidak digunakan dalam transformasi jagung menggunakan sistem ini. Sebesar 15% atau 2 dari 13 sampel eksplan yang diinokulasi C58C1 menunjukkan skor ≥ 3 ; sedangkan 45% atau 5 dari 11 sampel eksplan yang diinokulasi NTL4-Cry5 menunjukkan skor ≥ 5 .

Dalam penelitian ini, berhasil diperoleh 5 tanaman transgenik R0 transforman independen, masing-masing berasal dari eksplan yang berbeda (Tabel 3 dan Gambar 3C). Meskipun skor tertinggi ekspresi transien GUS ditunjukkan oleh eksplan yang diinokulasi strain NTL4-Cry5, tanaman transgenik dalam penelitian ini hanya berhasil diperoleh dari eksplan yang diinokulasi strain C58C1 dengan efisiensi 1,3 – 5,8%. Dapat disimpulkan bahwa ekspresi transien bukan penduga yang baik terhadap efisiensi transformasi. Meskipun ekspresi transien yang tinggi pada sisi skutelar embrio muda memperbesar peluang diperolehnya tanaman transgenik, hal tersebut tidak menjamin keberhasilan transformasi. Berdasar pengamatan visual, kalus embriogenik muncul dari bagian tengah sisi skutelar, tidak dari bagian pinggir; sedangkan skor ekspresi transien meliputi seluruh permukaan sisi skutelar.

Tanaman jagung transgenik berasal dari kalus embriogenik yang tumbuh pada medium seleksi mengandung paromomisin dan menunjukkan reaksi positif dalam asai histokimia GUS (Gambar 3B). Tanaman jagung transgenik diperoleh dari kalus embriogenik yang dikulturkan dalam medium maturasi dan pengecambahan. Lima tanaman R0 tersebut bereaksi positif dalam NPTII-ELISA, asai histokimia GUS (Tabel 3 dan Gambar 3D), dan analisis blot Southern (Gambar 3E). Karena kaset GUS mengandung intron dalam vektor transformasi pPTN290, bercak biru menunjukkan ekspresi dari sel tanaman, bukan sel *Agrobacterium*.

Tujuan dilakukan analisis blot Southern (Southern, 1975) adalah untuk mendeteksi keberadaan transgen di dalam genom tanaman. Dengan menggunakan pelacak gen GUS untuk hibridisasi, pita-pita DNA muncul pada autoradiogram semua (10) lajur tanaman yang dianalisis (Gambar 3E). Hal ini menunjukkan bahwa gen GUS terintegrasi dalam genom tanaman R0.

KESIMPULAN

Embrio zigotik muda jagung hibrida HiII dapat diinfeksi oleh tiga strain *Agrobacterium*: C58C1, NTL4-Cry5, dan LBA4404. Berdasar ekspresi transien GUS 2

hari setelah inokulasi, ekspresi GUS pada sisi skutelar embrio muda yang diinokulasi strain NTL4-Cry5 lebih tinggi daripada yang diinokulasi C58C1 atau LBA4404. Meskipun demikian, dari empat percobaan yang dilakukan, plantlet transgenik hanya diperoleh dari eksplan yang diinokulasi strain C58C1 dengan efisiensi 1,3 – 5,8%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada Dr. Thomas E. Clemente, (*Director of Plant Transformation Core Research Facility, University of Nebraska-Lincoln (PTCRF-UNL), Nebraska, Amerika Serikat*) dan Dr. Stephen Moose (*Dept. Crop Science University of Illinois, Urbana-Champaign, Illinois, Amerika Serikat*), yang mengundang penulis sebagai peneliti tamu. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Shirley Sato, Research Technologist of PTCRF-UNL, atas semua bantuan teknis dalam pelaksanaan penelitian. Penelitian ini sebagian dibiayai oleh IMBA, USDA. Atas dukungan dana tersebut penulis menyampaikan penghargaan dan ucapan terima kasih.

DAFTAR PUSTAKA

- Armstrong, C.L., C.E. Green, and R.L. Phillips. 1991. Development and availability of germplasm with high type II culture formation response. *Maize Genet Coop Newslett* 65: 92-93
- Armstrong, C.L. and C.E. Green.. 1985. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta* 164: 207-214.
- Chu, C.C., C.C. Wang, C.S. Sun, C. Hsu, K.C. Yin, C.Y. Chu, and 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.
- Dellaporta, S.L., J. Wood, and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol. Biol. Repr.* 1:19-21.
- D'Halluin, K., E. Bonne, M. Bossut, M. De Beuckleer, and J. Leemans. 1992. Transgenic maize plants by tissue electroporation. *Plant Cell* 4: 1495-1505.
- Frame B, H. Zhang, S. Cocciolone, L. Sidorenko, C. Dietrich, S. Pegg, S. Zhen, P. Schnable, and 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, and K. Wang. 2002. *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation of Maize Embryos Using a Standard Binary Vector System. *Plant Physiol.* 129:13-22.
- Grant, J.E., L.M.J. Thomson, M.D.Pither-Joyce, T.M. Dale, and P.A. Cooper. 2003. Influence of *Agrobacterium tumefaciens* strain on the production of transgenic peas (*Pisum sativum* L.). *Plant Cell Rep.* 21:1207-1210.
- 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, and N.G. Willetts. 1990. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *Plant Cell* 2: 603-618.

- 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.
- 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.
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-517.
- 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.

Tabel 1. Tipe Ti-plasmid dan tipe kromosom tiga strain *Agrobacterium*

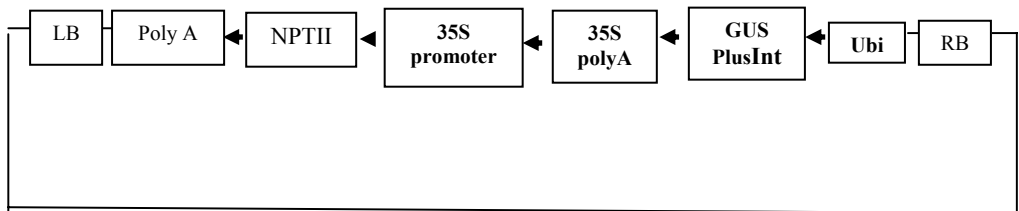
Strain	Tipe Ti plasmid	Tipe kromosom
C58C1	pMP90 (<i>nopaline</i>)	C58 (<i>nopaline</i>)
LBA4404	pAL4404 (<i>octopine</i>)	Ach5 (<i>octopine</i>)
NTL4-Cry5	pKPSF2 (<i>chrysopine</i>)	NTL (<i>nopaline</i>)

Tabel 2. Pengaruh strain *Agrobacterium* terhadap ekspresi transien GUS pada sisi skutelar dan aksilar ekplan embrio muda genotipe HiII, 2 dan 8 hari setelah inokulasi (HSI).

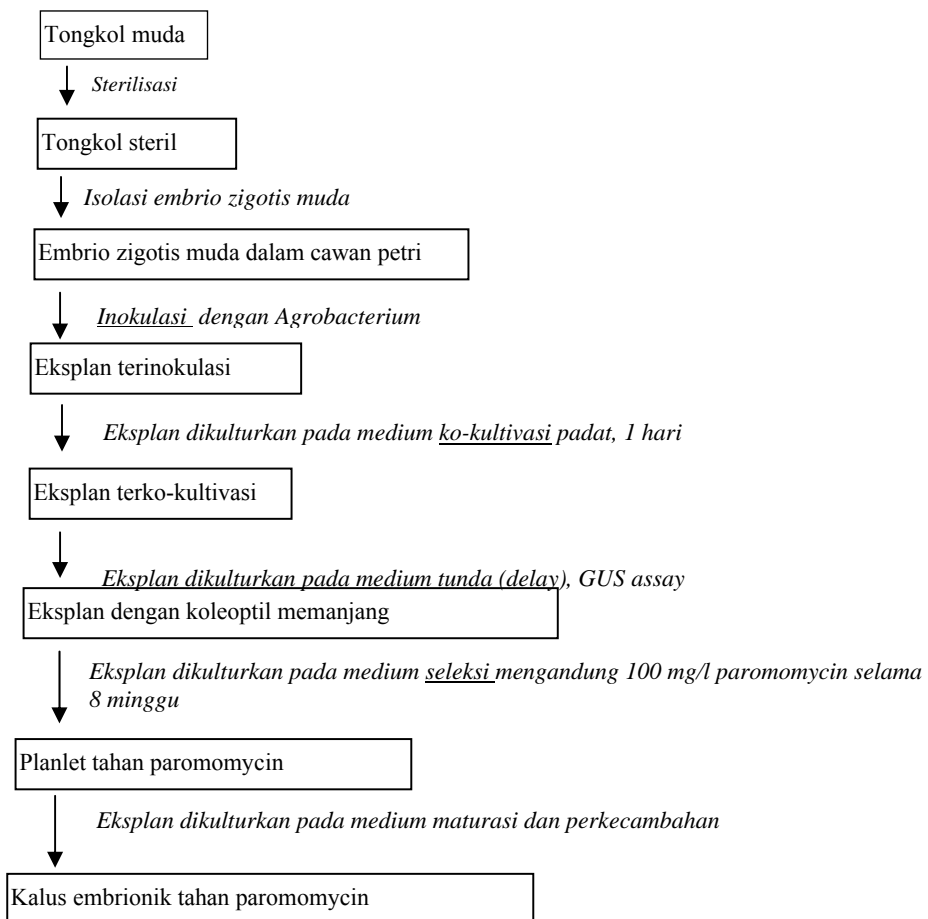
Variabel	Strain <i>Agrobacterium</i>	Skor ekspresi transien GUS		Total	Jumlah sampel ekplan embrio zigotik muda yang menunjukkan skor ekspresi transien GUS		
		Nilai tengah	Galat baku		≥ 3	≥ 5	≥ 7
Ekspresi transien GUS pada sisi skutelar 2 HSI	C58C1	1,92	0,18	13	2 (15%)	0	0
	LBA4404	0,15	0,10	13	0	0	0
	NTL4-Cry5	2,27	0,45	11	5 (45%)	5 (45%)	0
Ekspresi transien GUS pada sisi aksilar 2 HSI	C58C1	7,62	0,66	13	12 (92%)	11 (85%)	10 (77%)
	LBA4404	0,92	0,64	13	2 (15%)	1 (8%)	1 (8%)
	NTL4-Cry5	6,27	0,52	11	11 (100%)	8 (73%)	5 (45%)
Ekspresi transien GUS pada sisi skutelar 8 HSI	C58C1	1,83	0,30	12	4 (33%)	0	0
	LBA4404	0,17	0,11	12	0	0	0
	NTL4-Cry5	1,06	0,33	10	2 (20%)	0	0

Tabel 3. Efisiensi tranformasi genetik jagung genotipe HiII menggunakan *Agrobacterium* strain C58C1 untuk Percobaan I-III dan strain C58C1, NTL4-Cry5, dan LBA4404. Planlet transgenik tumbuh pada medium seleksi yang mengandung paromomisin, bereaksi positif dalam uji *NPTII-ELISA*

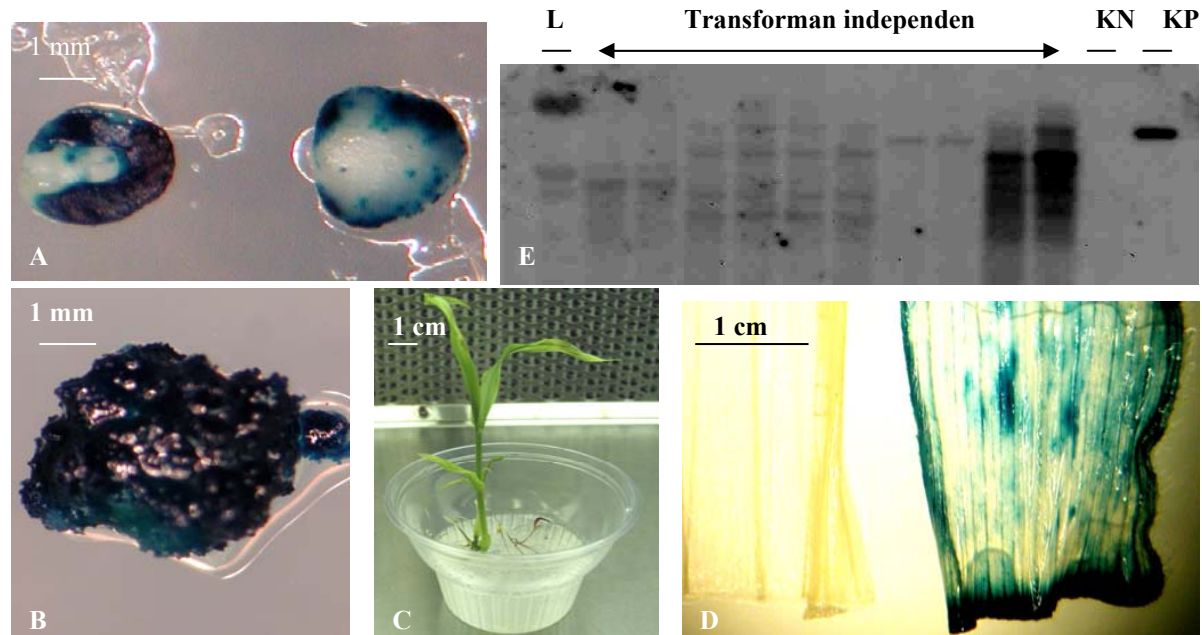
Nomor percobaan	Strain <i>Agrobacterium</i>	Jumlah ekplan embrio muda		Efisiensi transformasi (A/B) (%)
		Diinokulasi (A)	Menghasilkan planlet transgenik (B)	
I	C58C1	86	1	1,3
II	C58C1	59	1	1,7
III	C58C1	20	1	5,0
IV	C58C1	34	2	5,8
	NTL4-Cry5	28	0	0
	LBA4404	39	0	0



Gambar 1. Vektor transformasi pPTN290 yang membawa kaset gen *nptII* dan gen *iudA* (GUS).



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



Gambar 3 Transformasi genetik jagung hibrida HiII menggunakan *Agrobacterium*

3A.. Ekspresi transien GUS pada sisi aksilar (kiri) dan sisi skutelar (kanan) embrio zigotik muda dua hari setelah diinokulasi *Agrobacterium* strain C58C1.

3B. Ekspresi stabil GUS pada kalus embrionik Tipe II, 8 minggu setelah inokulasi.

3C. Tanaman transgenik jagung R0 yang tumbuh medium mengandung paromomycin dan mengekspresikan GUS berdasar asai histokimia pada potongan daun (Gambar 3D)

3D. Ekspresi stabil GUS berupa warna biru pada potongan daun yang diambil dari tanaman transgenik R0 (kanan). GUS tidak terekspresi pada kontrol non-transgenik (kiri).

3E. Autoradiogram analisis Southern potongan daun yang diambil dari lima transforman independen (tiap transforman diwakili 2 tanaman R0 sehingga terdapat 10 lajur di tengah). Lajur L adalah *ladder* berupa DNA virus λ yang dipotong enzim *StyI*. Lajur KN adalah kontrol negatif DNA dari daun HiII non-transgenik. Lajur KP adalah kontrol positif yaitu DNA plasmid pPTN290 yang dilinierkan dengan cara dipotong menggunakan enzim *SstI*. Hibridisasi menggunakan pelacak (*probe*)GUS dari plasmid pPTN286 yang dipotong dengan enzim *BglII* dan *ScaI*.

