

Pembentukan Buah Partenokarpi melalui Rekayasa Genetika

Saptowo Jumali Pardal

Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor

ABSTRACT

The Development of Parthenocarpic Fruit through Genetic Engineering. Saptowo J. Pardal. The fruit provides a proper environment for seeds production, protection, and dispersal. Fruit set and development usually takes places only after pollination and fertilization, and fertilized fruits contain seeds. The development of the fruit in the absence of pollination and fertilization is called parthenocarpy. Parthenocarpy fruits are seedless. Parthenocarpy can have either a genetic basis (genetic or natural parthenocarpy) or it can be artificially induced. On the normal fruits, pollination following with fertilization will increase auxin synthesis and cells division in ovary. It will trigger the fruit set and growth. Fertilized seeds will supply an auxin for fruit development. On the parthenocarpy fruits, seeds as source of auxin are replaced by phytohormones (gibberellins or auxins) or hormone analogues. Parthenocarpy can be artificially induced in several plant species by treating flowers with plant growth factors or by pollination either with incompatible pollen or with X-rays irradiated pollen. In the last few years, several methods have been proposed and/or developed at conferring parthenocarpic fruit development by plant genetic engineering. Recombinant DNA methods aimed to confer parthenocarpy can be distinct in two types of approach (1) to unbalance embryo development and/or to block seed production in transgenic plants without curtailing fruit development, (2) to express the phytohormone in the desired organ, such as ovary and/or its tissues (i.e. ovules) to trigger parthenocarpic fruit development. The second approach was more successful than the first approach. For example, the use of chimeric gene *defh9-iaaM* which expresses the IAA specifically on the placenta and ovule can induce parthenocarpic fruits development in several plant species belonging to four families (i.e. Cucurbitaceae, Solanaceae, Cruciferae, and Rosaceae).

Key words: Parthenocarpic fruit, genetic engineering

Buah merupakan bagian yang penting dari tanaman karena organ ini merupakan tempat yang sesuai bagi perkembangan, perlindungan, dan penyebaran biji. Pada buah normal, pembentukan buah dimulai dengan adanya proses persarian (polinasi) kepala putik (*stigma*) oleh serbuk sari (polen) secara sendiri (*self pollination*) atau oleh bantuan angin, serangga penyerbuk (polinator), dan manusia (*cross pollination*). Selanjutnya polen berkecambah dan membentuk tabung polen (*pollen tube*) untuk mencaipai bakal biji (*ovule*). Peristiwa bertemunya polen (sel jantan) dengan bakal biji (sel telur) di dalam bakal buah (*ovary*) disebut pembuahan (fertilisasi). Kemudian bakal buah akan membesar dan berkembang menjadi buah bersamaan dengan

pembentukan biji. Akhirnya akan dihasilkan buah yang fertil (berbiji).

Beberapa jenis tanaman mempunyai kemampuan untuk membentuk buah tanpa melalui proses polinasi dan fertilisasi. Buah yang terbentuk tanpa melalui polinasi dan fertilisasi ini disebut buah partenokarpi. Dan biasanya buah partenokarpi ini tanpa biji (*seedless*) karena tanpa melalui fertilisasi. Partenokarpi ini kurang menguntungkan bagi program produksi benih/biji, tetapi lebih bermanfaat bagi peningkatan kualitas dan produktivitas buah, khususnya pada jenis tanaman komersial (hortikultura). Sebagai contoh, pada terung partenokarpi dapat meningkatkan kualitas buah, sedangkan pada *Actinidia* dapat meningkatkan produktivitas buah dan tidak membutuhkan bantuan serangga penyerbuk (pollinator).

Partenokarpi dapat terjadi secara alami (genetik) ataupun buatan (induksi). Partenokarpi alami ada dua tipe, yaitu obligator apabila terjadinya tanpa faktor/pengaruh luar dan fakultatif apabila terjadinya karena ada faktor/pengaruh dari luar/lingkungan yang tidak sesuai untuk polinasi dan fertilisasi, misalnya suhu terlalu tinggi atau rendah. Sedangkan partenokarpi buatan dapat diinduksi melalui aplikasi zat pengatur tumbuh (fitohormon) pada kuncup bunga (Schawabe dan Mills, 1981) atau melalui polinasi dengan polen inkompatibel (Tsao, 1980) atau dapat diserbuki dengan polen yang telah diradiasi sinar X (Shozo dan Keita, 1997). Bahkan, kini dengan adanya kemajuan teknologi di bidang biologi molekuler partenokarpi dapat diinduksi secara endogen melalui teknik rekayasa genetika, yaitu dengan cara menyisipkan gen partenokarpi (pengkode IAA/giberelin) ke dalam genom tanaman target melalui proses transformasi genetik (Barg dan Salts, 1996; Rotino *et al.*, 1996; Li, 1997). Tanaman transgenik yang telah mengandung gen partenokarpi akan mengekspresikan senyawa auksin pada plasenta dan *ovule* (Rotino *et al.*, 1996) atau giberelin pada polen sebelum polinasi (Tomes *et al.*, 1996a).

PARTENOKARPI ALAMI

Partenokarpi dapat terjadi secara alami (genetik) pada beberapa jenis tanaman saja (terbatas), misalnya pada pisang (triploid), tomat, dan manggis. Partenokarpi dapat dibedakan menjadi dua tipe, yaitu obligator dan fakultatif. Partenokarpi disebut obligator apabila terjadi secara alami (genetik) tanpa adanya pengaruh dari luar. Hal ini dapat terjadi karena tanaman tersebut secara genetik memiliki gen penyebab

partenokarpi, misalnya pada tanaman pisang yang kebanyakan triploid. Tanaman triploid ini memiliki mekanisme penghambatan perkembangan biji atau embrio sejak awal, sehingga buah yang terbentuk tanpa biji. Sedangkan partenokarpi fakultatif apabila terjadinya karena ada faktor/pengaruh dari luar, misalnya pada tanaman tomat dapat terjadi pembentukan buah partenokarpi pada suhu dingin atau suhu panas.

PARTENOKARPI BUATAN

Aplikasi Zat Pengatur Tumbuh

Pada awal abad ke-19 telah diketahui bahwa polinasi tanpa fertilisasi dapat merangsang pembentukan buah (Fitting, 1909). Kemudian, ekstrak polen diketahui pula dapat menginduksi pembentukan dan perkembangan buah (Yasuda, 1934). Berikutnya diketahui lagi bahwa auksin dapat menggantikan polinasi dan fertilisasi pada proses pembentukan dan perkembangan buah pada beberapa spesies tanaman (Gustafson, 1942).

Percobaan pada tanaman strawberry, di mana bakal biji yang telah dibuahi (achenes) dapat dihilangkan tanpa merusak bagian reseptakel ternyata buah tetap tumbuh dan berkembang setelah achenes tersebut diganti dengan olesan senyawa lanolin yang berisi auksin (Nitsch, 1950). Lebih lanjut, Nitsch membuktikan bahwa kandungan dan sintesis auksin pada bakal biji (achenes) berlangsung hingga 17 hari setelah pembuahan. Hal ini membuktikan bahwa auksin dibutuhkan selama perkembangan buah. Zat pengatur tumbuh (ZPT) lain, seperti giberelin dan sitokinin juga terbukti dapat menggantikan peran biji dalam perkembangan buah (Schwabe dan Mills, 1981). Namun, untuk efisiensi partenokar-

pi perlu kombinasi atau pengulangan aplikasi ZPT tersebut.

Zat pengatur tumbuh berpengaruh langsung maupun tidak langsung terhadap kandungan auksin (IAA) endogen dalam bakal buah (*ovary*), baik setelah polinasi dan fertilisasi ataupun setelah aplikasi ZPT dari luar. Kadar auksin selama perkembangan bakal buah berbeda-beda untuk setiap tanaman, tetapi umumnya meningkat pada saat 20 hari setelah pembungaan (*anthesis*) baik pada bunga yang diserbuki atau yang disempot auksin (Lee *et al.*, 1997). Peningkatan kadar IAA pada bakal buah akan merangsang pertumbuhan dan perkembangan buah pada fase awal pembungaan (Gillapsy *et al.*, 1993). Mekanisme inilah yang mengilhami para ahli bioteknologi pertanian dalam pembentukan buah partenokarpi melalui rekayasa genetika.

Manipulasi Ploidi (*Alteration in Chromosomes Number*)

Partenokarpi dapat pula diinduksi secara genetik, yaitu melalui manipulasi jumlah ploidi (kromosom) pada tanaman. Hal ini dapat ditempuh dengan persilangan biasa, misalnya antara tanaman semangka dikotil (sebagai induk jantan/penyerbuk) dengan tanaman tetraploid (sebagai induk betina) menghasilkan hibrid (F_1) triploid yang ternyata dapat menghasilkan buah partenokarpi tanpa biji (*seedless*). Pada tanaman triploid ini bakal biji (*ovule*) terhambat sejak awal perkembangannya, sehingga embrio tidak berkembang. Akibatnya tanaman hanya menghasilkan buah tanpa biji dengan integumen yang rudimenter (tidak berkembang) (Kihara, 1951).

Metode DNA Rekombinan (Rekayasa Genetika)

Pada beberapa tahun terakhir, beberapa metode telah dicoba dan

dikembangkan untuk menghasilkan partenokarpi melalui rekayasa genetika tanaman. Pembentukan buah partenokarpi melalui teknik DNA rekombinan dapat ditempuh melalui dua pendekatan, yaitu (1) menghambat perkembangan embrio/biji tanpa mempengaruhi pertumbuhan buah dan (2) ekspresi fitohormon pada bagian *ovary/ovule* untuk memacu perkembangan buah partenokarpi.

Cara pendekatan pertama ditempuh melalui penggunaan gen yang bersifat merusak sel (*cytotoxic*). Gen ini akan menghasilkan senyawa toksik terhadap sel-embrio/biji, sehingga akan menghambat bahkan merusak perkembangan embrio/biji. Pertumbuhan buah tetap berlangsung, tetapi tidak menghasilkan biji. Sebagai contoh, penggunaan gen *barnase* yang diisolasi dari bakteri *Bacillus amyloliquefaciens* (Paddon dan Hartley, 1987; Tomes *et al.*, 1996b) atau kombinasi gen sitotoksik, misalnya gen *iaaM* dan *iaaH* dari bakteri yang mengekspresikan senyawa toksik kadar tinggi terhadap sel-embrio/biji. Kombinasi ekspresi dua gen ini akan merubah triptofan menjadi IAA melalui senyawa *indoleacetamide* (Kosuge *et al.*, 1966). Kadar IAA tinggi ini akan bersifat toksik terhadap sel-embrio atau embrio tanaman. Grossniklaus dan Vielle-Calzada, (1999) menggunakan gen regulator yang dapat mengekspresikan senyawa toksik yang mempengaruhi perkembangan embrio atau endosperm. Gen *barnase* akan menghasilkan enzim ribonuklease pada bagian biji di bawah kontrol promoter spesifik bagian kulit biji. Tetapi pembentukan partenokarpi melalui cara pendekatan ini kurang berhasil dan tidak berkembang, karena hingga kini belum ada data hasil percobaan yang mendukung keberhasilan teknik ini.

Cara pendekatan kedua dalam menghasilkan partenokarpi adalah melalui pengekspresian senyawa fitohormon IAA atau analognya pada bagian bakal buah (*ovary*) terlihat lebih efektif. Cara kedua ini didasari oleh pengetahuan sebelumnya bahwa aplikasi fitohormon sejenis auksin/giberelin dapat menggantikan peran biji dalam merangsang pembentukan dan perkembangan buah. Tomes *et al.* (1996a) telah berhasil menginduksi buah partenokarpi melalui penggunaan gen pengkode giberelin, yaitu *giberellin 20-oxidase* yang diekspresikan pada bagian polen (serbuk sari) sebelum polinasi (di bawah kontrol promoter spesifik bagian polen). Buah partenokarpi dapat terbentuk sebelum fertilisasi (*anthesis*). Li (1997) berhasil menggunakan gen pengkode auksin, giberelin atau sitokinin (*iaaM*, *iaaH* atau *ipt*) dari *Agrobacterium tumefaciens* di bawah kontrol sequen regulator spesifik bagian *ovary*. Gen *iaaM* mengkode senyawa triptofan 2-monooxygenase yang akan merubah triptofan menjadi indoleacetic acid (IAA), lalu menjadi indole acetic acid (IAA) dan amonia (Kosuge *et al.*, 1966) menggunakan promoter GH3 dari kedelai (Hagen *et al.*, 1991) atau AGL5 (*Agamous-like 5*) dari *Arabidopsis* (Ma *et al.*, 1991) atau PLE36 dari tembakau (Li, 1997). GH3 merupakan promoter inducible auksin di bagian *ovary*, AGL5 spesifik pada perkembangan karpela (Savidge *et al.*, 1995) dan PLE 36 spesifik untuk *ovary*.

Rotino *et al.* (1997) telah berhasil menggunakan promoter bagian regulator *defh9* (*deficiens homologue 9*) dari *Antirrhinum majus* untuk mengekspresikan gen *iaaM* (pengkode IAA) dari *Pseudomonas syringae* pv *savastanoi* (Yamada *et al.*, 1985) pada bagian plasenta dan bakal biji. Gen kimerik *defh9-iaaM* (Gambar 1) ini telah berhasil

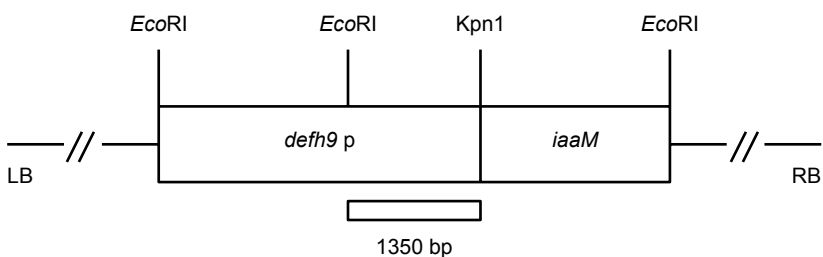
menginduksi buah partenokarpi pada beberapa tanaman dari famili *Solanaceae* seperti terung, tembakau, dan tomat (Rotino *et al.*, 1996; 1997; Ficcadenti *et al.*, 1999). Tanaman hibrid (F₁) terung yang mengandung gen *defh9-iaaM* menunjukkan peningkatan produksi pada musim dingin (Dozella *et al.*, 2000). Demikian juga terjadi pada tomat transgenik yang ditanam pada kondisi atau cuaca yang kurang menguntungkan bagi perkembangan polen (Acciarri *et al.*, 2000) (Tabel 1). Bahkan saat ini, di Italia sedang dilakukan pengujian lapang untuk tanaman transgenik melon, strawberry, dan anggur. Sehingga gen partenokarpi *defh9-iaaM* telah berhasil dicoba pada empat famili, yaitu *Solanaceae*, *Cucurbitaceae*, *Rosaceae*, dan *Cruciferae*. Dari semua tanaman transgenik partenokarpi tersebut ditemukan kadar ekspresi auksin yang sangat rendah pada mRNA yang diekstrak dari kuncup bunga (Rotino *et al.*, 1997; Ficcadenti *et al.*, 1999).

Dari hasil percobaan ternyata

terdapat faktor penting di dalam pembuatan buah partenokarpi melalui rekayasa genetika, yaitu terletak pada penggunaan bagian regulator (*regulator region*) dalam konstruksi gen kimerik. Bagian regulator merupakan informasi genetik yang sangat penting dalam mengontrol ekspresi gen *interest* baik secara *temporal* atau *spatial*. Dua parameter ini sangat penting dalam memperoleh partenokarpi dan meyakinkan ekspresi yang optimal dari gen partenokarpi tanpa menghambat pertumbuhan vegetatif (buah) pada tanaman transgeniknya. Dengan demikian, semua gen regulator yang digunakan diarahkan ekspresinya ke bagian *ovary* dan bagian-bagiannya. Sebagai contoh gen kimerik *defh9-iaaM* (Rotino *et al.*, 1997), bagian regulator *defh9* (promoter) dapat mengontrol ekspresi gen *iaaM* (pengkode IAA) hanya pada bagian plasenta, *ovule*, dan bagian *ovule* (Ficcadenti *et al.*, 1999). Ekspresi IAA pada bagian *ovule* di-tujukan untuk menggantikan peran biji dalam

Tabel 1. Produksi buah tomat dan terung transgenik pada awal produksi dan total produksi

	Produksi awal (g/tanaman)		Total produksi (g/tanaman)	
	Kontrol	Transgenik	Kontrol	Transgenik
Tomat				
H.F1 Giasone ^a	1152 ^d	3359 ^a	1968 ^c	4940 ^a
H.F1 95-514 ^a	1122 ^d	2863 ^b	1828 ^c	4088 ^a
H.F1 95-516 ^a	1895 ^c	3392 ^a	3105 ^b	4999 ^a
L.CM x L. 4 ^b	177 ^b	866 ^a	437 ^b	1533 ^a
Terung				
Tal 1/1 x DR2 ^c	76 ^b	1547 ^a	488 ^b	2241 ^a
Tal 1/1 x DR2 ^d	206 ^b	1251 ^a	2490 ^b	6418 ^a



Gambar 1. Konstruksi gen partenokarpi *defh9-iaaM*. Promoter *defh9* untuk ekspresi spesifik pada bagian plasenta dan *ovule* (diambil dari *Antirrhinum majus*) dan gen *iaaM* pengkode indoleacetamide (IAA) diambil dari *Pseudomonas syringae* pv *savastanoi*

memacu pertumbuhan buah, sedangkan ekspresi IAA pada bagian plasenta untuk meyakinkan bahwa partenokarpi terjadi sebelum polinasi (*anthesis*). Hal ini dimaksudkan untuk membandingkan dengan buah hasil penyerbukan biasa atau aplikasi ZPT. Buah par-tenokarpi tanpa biji dapat terbentuk pada bunga tomat dan terung yang diemaskulasi atau dikastrasi (dihilangkan bagian benang sarinya) terlebih dahulu. Sedangkan ekspresi IAA pada bagian jaringan *ovule* di-maksudkan untuk menjaga kelangsungan pertumbuhan dan perkembangan buah hingga dewasa. Ekspresi IAA yang sangat rendah diperlukan untuk memperoleh perkembangan buah partenokarpi secara normal, karena apabila ekspresi terlalu tinggi dapat menyebabkan pertumbuhan yang abnormal (*malformation*), terutama pada jenis tanaman yang sensitif terhadap auksin.

KESIMPULAN

Beberapa pendekatan dan percobaan telah dilakukan dalam rangka pembentukan buah partenokarpi pada tanaman transgenik. Pembentukan buah partenokarpi mela-lui rekayasa genetika akan dapat menjawab tuntutan konsumen yang menginginkan adanya buah tanpa biji dengan kualitas lebih baik dan produktivitas yang tinggi, khususnya pada tanaman hortikultura yang bernilai tinggi (komersial).

Sejalan dengan itu, pendekatan secara molekuler dengan teknik *microarray* juga dapat digunakan untuk studi perbandingan dan studi perubahan pola ekspresi gen selama perkembangan buah baik pada buah partenokarpi maupun buah normal (hasil pembuahan). Dengan demikian, sintesis fitohormon secara endogen pada bunga

atau bakal buah akan dapat terkontrol baik waktu (*timing*), tempat (lo-kasi), dan kekuatan (*strength*) ekspresi serta pengaruhnya bagi pertumbuhan dan perkembangan buah.

PUSTAKA

- Acciarri, N., V. Ferrari, G. Vitelli, N. Ficcadenti, T. Pandolfini, A. Spena, and G.L. Rotino. 2000.** Effetto della partenocarpia in ibridi di pomodoro geneticamente modica-ti. *Informatore Agrario* 4:117-121.
- Barg, R. and Y. Salts. 1996.** Method for the induction of genetic parthenocarp in plants. Application No. IL19960117139. Patent No. WO9730165.
- Dozella, G., A. Spena, and G.L. Rotino. 2000.** Transgenic parthenocarpic eggplants: Superiro germplasm for increased winter production. *Mol. Breed.* 6:79-86.
- Ficcadenti, N., S. Sestili, T. Pandolfini, C. Cirillo, G.L. Rotino, and A. Spena. 1999.** Genetic engineering of parthenocarpic fruit development in tomato. *Mol. Breed.* 5:463-470.
- Fitting, H. 1909.** Die beeinflussung der Orchideenbluten durch die Bestäubung und durch andere Umstände. *Zeitschrift fuer Botanik* 1:1-86.
- Gillapsy, G., H. Ben-David, and W. Grulsem. 1993.** Fruits: A development perspective. *The Plant Cell* 5:1439-1451.
- Grossniklaus, U. and J.P. Vielle-Calzada. 1999.** Seed specific polycomb group gene and methods of use for same. Patent Application Number US19980061769. PN WO9953083.
- Gustafson, F.G. 1942.** Parthenocarp: Natural and Artificial. *Botanical Review* 8:599-654.
- Hagen, G., G. Martin, Y. Li, and T.J. Guilfoyle. 1991.** Auxin-induced expression of soybean GH3 promoter in transgenic tobacco plants. *Plant Mol. Biol.* 17(3):567-579.
- Kihara, H. 1951.** Triploid watermelon. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 58:217-230.
- Kosuge, T., M.G. Heskett, and E.E. Wilson. 1966.** Microbial synthesis and degradation of the indole-3-acetic acid. *J. Biol. Chem.* 241:3738-3744.
- Lee, T.H., A. Sugiyama, K. Takeno, H. Ohno, and S. Yamaki. 1997.** Changes in content of indole-3-acetic acid and activities of sucrose metabolizing enzyme during fruit growth in eggplant (*Solanum melongena* L.). *J. Plant Physiol.* 150:292-296.
- Li, Y. 1997.** Transgenic seedless fruit and methods. Patent Application Number US1997060045725. WO9849888A1.
- Ma, H., M.F. Yanofsky, and E.M. Meyerowitz. 1991.** AGL1-AGL6, an Arabidopsis gene family with similarity to floral homeotic and transcription factor genes. *Genes and Dev.* 5:484-495.
- Nitsch, J.P. 1950.** Growth and morphogenesis of strawberry as related to auxin. *Am. J. Botany* 37:211-215.
- Paddon, C.J. and R.W. Hartley. 1987.** Expression of *Bacillus amyloliquefaciens* extracellular ribonuclease (barnase) in *E. coli* following an inactivating mutation. *Gene* 53(1):11-19.
- Rotino, G.L., H. Sommer, H. Saedler, and A. Spena. 1996.** Methods for producing parthenocarpic or female sterile transgenic plants and methods for enhancing fruit setting and development. Priority Number EPO 96120645.5.
- Rotino, G.L., E. Perri, M. Zottini, H. Sommer, and A. Spena. 1997.** Genetic engineering of parthenocarpic plants. *Nature Biotech.* 15:1398-1401.
- Savidge, B., S.D. Rounsley, and M.F. Yanofsky. 1995.** Temporal relationship between the transcription of two Arabidopsis MADS box genes and the floral organ identity genes. *Plant Cell* 7(6):721-733.
- Schwabe, W.W. and J.J. Mills. 1981.** Hormones and parthenocarpic fruit set: A literature survey. *Hort. Abstracts* 51:661-698.
- Shozo, M. and S. Keita. 1997.** Creation of seedless fruit. Patent Application

Number JP19970279331. PN
JP11103705.

Tomes, D.T., P.D. Miller, and R.J. Bensen. 1996a. Transgenic methods and compositions for producing parthenocarpic fruits and vegetables. US Patent Application Number 641479. PN US5877400.

Tomes, D.T., B. Huang, and P.D. Miller. 1996b. Genetic constructs and methods for producing fruit with very little or diminished seed. US Patent Application Number 636283. PN: US5773697.

Tsao, T. 1980. Growth substances: Role in fertilization and sex expression. *In* Skoog, F. (Ed.). Plant Growth Sub-stances. Spring-Verlag, N.Y. p. 345-348.

Yamada, T., C.J. Palm, B. Brooks, and T. Kosuge. 1985. Nucleotide sequence of the *Pseudomonas savastanoi* indoleacetic acid genes show homology with *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 82:6522-6526.

Yasuda, S. 1934. Parthenocarpy caused by the stimulus of pollination in some plants of Solanaceae. Agriculture and Horticulture 9:647-656.
