

Kontrol Auksin dan PIN1 dalam Perkembangan dan Venasi Daun

SELIS MERIEM

Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Alauddin Makassar
Jl. H.M Yasin Limpo No. 36, Kab. Gowa, Sulawesi Selatan 92113
Email: selis.meriem@uin-alauddin.ac.id

ABSTRACT

Leaves are the primary photosynthetic organs of vascular plants and have diversity in the morphological aspects of leaf shape, leaf reinforcement or venation and leaf position in plant architecture (phylotaxis). Vesikel tissue arranged in venation organization forms a leaf frame facilitating the assimilation export and import of water and minerals. Physiological mechanism is activated by the induction of specific gene expression. This topic also became a concern that intrigued researchers to create a model of canalization of leaf reinforcement. Several studies have reported that auxin and a transport protein called PIN1 hold the venation and phylotaxis of leaf vegetative growth. Through a series of experiments comparing the growth of wild type *Arabidopsis* leaves with *pin1* mutants, and by reducing auxin transport, in fact, reduced the number of leaves, leaf shape abnormalities and venation disorders and changed the degree of leaf phylotaxis.

Keywords: leaf development, venation pattern, auxin, PIN1

PENDAHULUAN

Meristem tajuk atau *shoot apical meristem* (SAM) merupakan titik tumbuh berbagai pembentukan organ di atas permukaan tanah meliputi batang, daun, meristem aksilar, dan meristem floral. Secara umum, letak pembentukan daun terjadi di daerah marginal SAM, mekanisme ini juga berlangsung pada daun dengan berbagai bentuk baik daun tunggal maupun daun majemuk.

Auksin diketahui berperan penting dalam perkembangan daun seperti (1) inisiasi daun melalui poliferasi sel-sel meristematik dari meristem tajuk atau *shoot apical meristem* (SAM) ke arah lateral membentuk primordia daun, (2) letak susunan daun (*phylotaxy*), dan bentuk daun. Kedua proses tersebut membutuhkan transpor auksin dan lokal auksin yang maksimum. Dalam konteks perkembangan daun, sel-sel akan membesar seiring dengan pembelahan sel-sel pada daerah proksimodistal, sentrolateral, dan adaksial-abaksial. Pertumbuhan tersebut terjadi bersamaan dengan proses diferensiasi sel yang telah terdeterminasi sejak embrio menjadi jaringan-jaringan yang menyusun organ daun.

Jaringan pembuluh angkut yaitu xilem dan floem yang berdiferensiasi dari sel-sel prokambium merupakan jaringan yang tersebar di seluruh organ tumbuhan dan saling terkoneksi untuk mendukung transpor asimilat melalui floem dan transpor air dan mineral

terlarut melalui kolom xilem. Diferensiasi vaskular tersebut juga melibatkan peran auksin. Peran auksin sebagai regulator dalam kasus perkembangan jaringan vaskular, fungsi PIN1 sebagai transpor polar auksin dalam pola jaringan pembuluh dan penentu filotaksis daun, dan model kanalisasi venasi daun merupakan topik yang fokus dibahas dalam review ini.

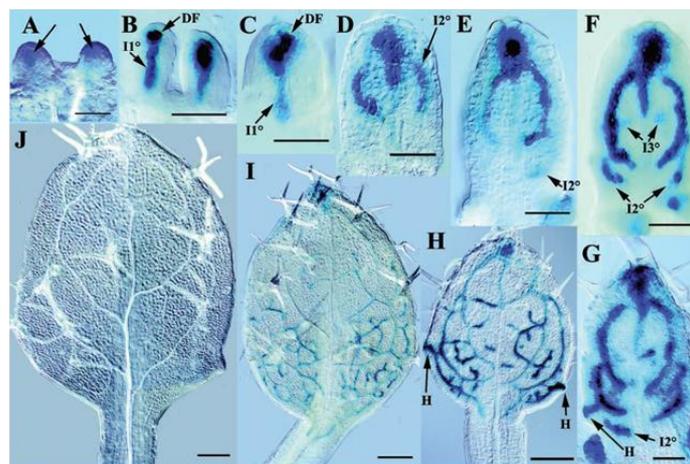
PERAN AUKSIN MAKSIMUM DAN PIN1 DALAM PROSES DIFERENSIASI VENASI DAUN

DR5 merupakan produk ekspresi gen reporter GUS dengan promoter AuxRE yang teraktivasi sebagai respon terhadap auksin. Protein ini digunakan sebagai marker (berwarna biru) yang menandakan konsentrasi auksin dalam tahapan perkembangan jaringan pembuluh daun. DR5 terdeteksi sejak awal terbentuknya primordia daun, pembentukan venasi: primer, sekunder, tertier, dan quartener. Selama proses perkembangan tersebut, auksin dibutuhkan dalam jumlah yang maksimum. Sinyal ini mulai berkurang pada daun dewasa yang sudah mencapai pertumbuhan dan perkembangan daun yang maksimum.

Hal ini dapat dijelaskan melalui hasil penelitian Mattsson, et al. (2003) pada Gambar 1 yang menggunakan *Arabidopsis* sebagai model. Lokalisasi DR5 terkonsentrasi mulai dari daerah apikal meristem. Pada tahap

pembentukan daun pertama, DR5 melakukan ekspansi secara membujur ke arah apikal yang akan membentuk tulang daun primer. Ekspresi DR5 semakin kuat pada pembentukan tulang daun sekunder yang terbentuk dari tulang daun primer secara paralel menuju daerah marginal dan membentuk lobus tulang sekunder baru. Pada perkembangan selanjutnya, DR5 tampak terlihat mengikuti tulang daun tertier yang menghubungkan antar tulang sekunder dan tulang daun quartener yang menjembatani koneksi tulang tertier. Ekspresi ini semakin

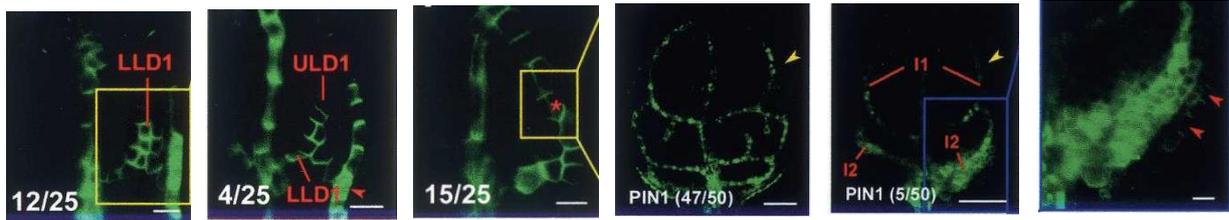
memudar pada daun dengan perkembangan jaringan pembuluh dewasa. Dengan demikian auksin yang terdeteksi melalui protein DR5 mengawali setiap pembentukan jenis tulang daun. Auksin mengarahkan pola dan posisi pembentukan venasi sampai daun telah memiliki bentuk daun yang optimum. Hal ini juga menjelaskan bahwa auksin berperan secara spesifik selama proses diferensiasi daun.



Gambar 1. Ekspresi DR5:GUS dalam perkembangan daun.

Scarpella, et al. (2006) membuktikan bahwa distribusi auksin dalam perkembangan venasi daun difasilitasi oleh protein transpor auksin PIN1. Oleh karena itu lokalisasi PIN1 menentukan arah aliran auksin. Protein PIN1 bersama dengan auksin terekspresi sejak determinasi meristem daun. Gambar 2 menunjukkan deteksi PIN1 dengan pewarnaan GFP dalam pembentukan tulang daun. Induksi lengkungan tulang daun sekunder muncul dari basal proksimal tulang daun primer membentuk *lower-loop domain* (LLD) dan sel ini membelah terus menerus membentuk *upper-loop domain* (ULD) yang memanjang

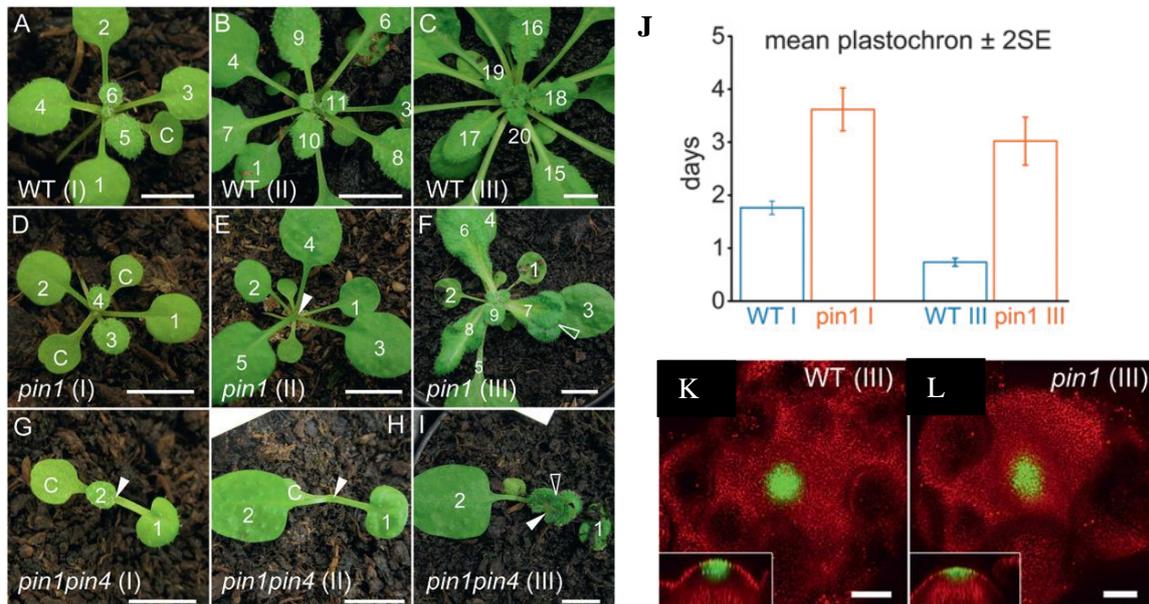
dan bersatu dengan tulang daun primer di apikal distal (Gambar 2A-C). Koneksi antar vena berasal dari polaritas PIN1 yang berbeda dan dihubungkan oleh sel bipolar sehingga menyusun tulang daun yang sempurna. Aplikasi auksin eksogen nampaknya memicu percepatan venasi. Ekspansi oleh peningkatan ekspresi PIN1 (Gambar 2D-F) merespon kehadiran auksin eksogen sehingga menyebabkan pembentukan ekstra vena. Aplikasi auksin mungkin memperlama pendewasaan daun mencapai ukuran yang optimum karena penambahan venasi.



Gambar 2. Polaritas PIN1 dalam pembentukan lengkung tulang sekunder (A-C). Respon pola venasi terhadap pemberian auksin eksogen (D-F)

Peran PIN1 tidak hanya mempengaruhi venasi daun tetapi juga berkontribusi terhadap filotaksis daun. Perbedaan pertumbuhan vegetatif dari morfologi daun pada *Arabidopsis* liar dengan mutan *pin1* dipelajari oleh Guenot, et al. (2012). Hasil penelitian membuktikan bahwa kelainan daun yang ekstrem meningkat dan linear terhadap waktu. Perbedaan morfologi daun yang signifikan diamati dari fenotipe daun yang menyatu dengan petiola yang melebar dan mengalami etiolasi ketika mulai memasuki tahap induksi

pembungaan (Gambar 3C,F). Pertumbuhan di fase II memperlihatkan pengurangan inisiasi daun pada *pin1* (Gambar 3B,E). Sedangkan fenotipe kedua tipe ini tidak terlihat pada fase I dimana bentuk dan ukuran serta venasi *pin1* dan tanaman liar tidak berbeda secara signifikan (Gambar 3A,D). Pada umumnya, perkembangan daun yang relatif lambat pada mutan dikarenakan plastokron yang lebih lama yaitu frekuensi inisiasi daun yang rendah dibandingkan tipe liar (Gambar 3J).



Gambar 3. Morfologi daun pada tipe liar dan mutan *pin1* pada fase I (3 minggu), II (3-5 minggu), III (5 minggu) setelah perkecambahan (A-I) dan perbedaan plastokron (J)

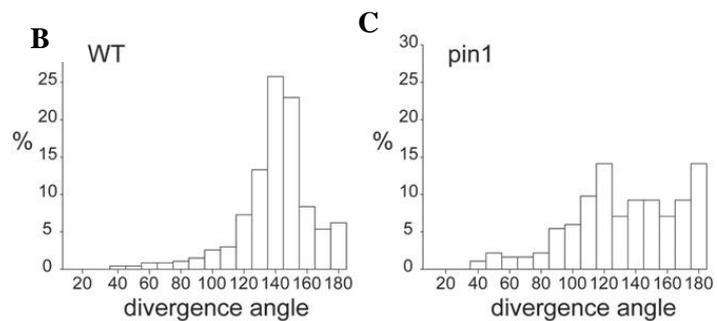
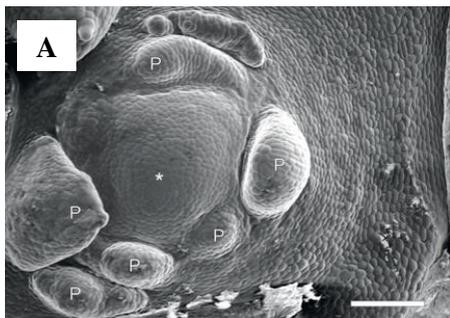
Reduksi pertumbuhan dan perkembangan vegetatif daun dibandingkan normalnya diakibatkan oleh kehilangan fungsi PIN1 sebagai saluran transpor auksin pada tipe mutan. Bahkan pada mutan ganda *pin1pin4*, reduksi inisiasi daun terjadi sangat signifikan (Gambar 3G-I). Di sisi lain, hasil ini tidak

membuktikan kemampuan protein PIN yang lain seperti PIN2, PIN3, PIN4, PIN7 dalam menggantikan fungsi PIN1 dalam proses perkembangan daun. PIN1 hanya terekspresi pada sel meristematik primordia daun yang belum terdiferensiasi sedangkan kelompok PIN lainnya tidak terdeteksi.

Walaupun kehilangan PIN1 mereduksi pembentukan organ lateral daun, aktivitas meristem pada zona sentral tetap terpelihara pada organisasi lapisan meristematik mutan yang sama pada tipe liar (Gambar 3K,L). Penjelasan ini menegaskan bahwa hambatan inisiasi daun tidak diiringi dengan penurunan meristematik lapisan zona sentral. Keadaan ini mungkin saja tetap dipertahankan karena peran sel punca yang tidak mengalami diferensiasi pada zona sentral merupakan sumber prekursor pembentukan organ baru.

Gambar 4A membuktikan bahwa posisi primordia daun terlokalisir pada salah satu kutub. Dengan kata lain, filotaksis pada mutan bervariasi (Gambar 4B,C) sehingga arsitektur tanaman tidak menyerupai bentuk filotaksis spiral Arabidopsis dengan sudut 137° . Tetapi posisi daun pada tipe mutan nyatanya tidak acak dan mengikuti hukum Hofmeister. Teori

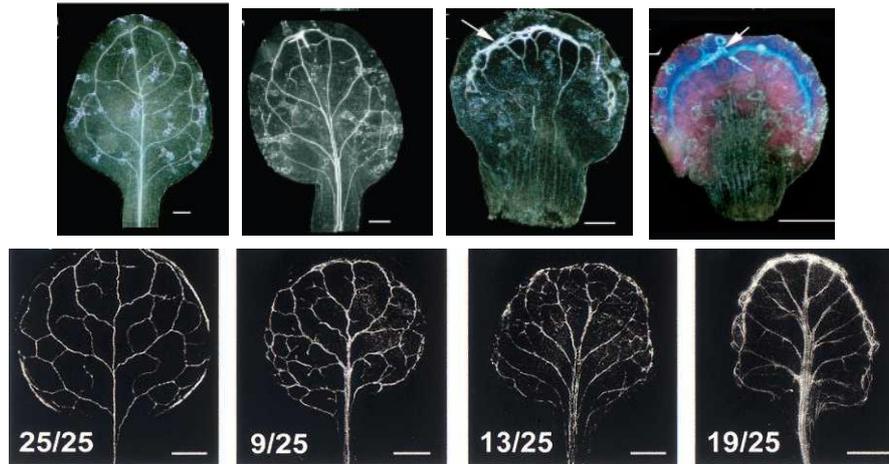
ini menggambarkan bahwa daun baru yang terbentuk berada jauh dari posisi daun yang terbentuk sebelumnya. Mekanisme melalui efek inhibitor yang diaktifkan pada daun pertama menekan pembentukan daun baru terdekat. Guenot *et al.* (2012) menjelaskan kemungkinan keterlibatan importer auksin lain seperti AUX1/LAX dan efluks auksin yaitu transporter ABC pada tipe mutan *pin1*. Jenis transporter ini bersifat apolar dan hanya terakumulasi di daerah tajuk dan bertanggung jawab terhadap pembentukan vaskular dibandingkan filotaksis daun. Kemungkinan lain yaitu inisiasi daun tanpa PIN1 didukung oleh sintesis lokal auksin di sekitar meristem apikal tetapi hal ini tidak mencukupi suplai auksin dalam menentukan filotaksis daun tanpa melibatkan protein efluks transporter PIN1.



Gambar 4 Foto *scanning electron microscope* primordia daun mutan *pin1* (A). Perbedaan sudut filotaksis daun pada tipe liar (B) dan mutan (C)

Inhibitor auksin seperti NPA (1-*N*-naphthylphalamic acid) mengacaukan vaskularisasi daun yang berujung kepada bentuk daun abnormal (Mattsson *et al.* 2003) (Gambar 5). Perlakuan dengan konsentrasi

NPA 1.0 dan 10 μ M berpengaruh nyata terhadap perkembangan daun. NPA bekerja dengan menghambat transpor polar apikal basal sehingga suplai auksin maksimum tidak sampai pada meristem di daun.



Gambar 5. Pengaruh NPA terhadap venasi daun dengan perlakuan 0 μM , 0.1 μM , 1.0 μM dan 10 μM (bagian atas: dari arah kiri ke kanan. Sumber: Mattsson *et al.* 2003). NPA dengan perlakuan 0 μM , 5 μM , 10 μM dan 50 μM (bagian bawah: dari arah kiri ke kanan (Sumber: Scarpella, et al., 2006).

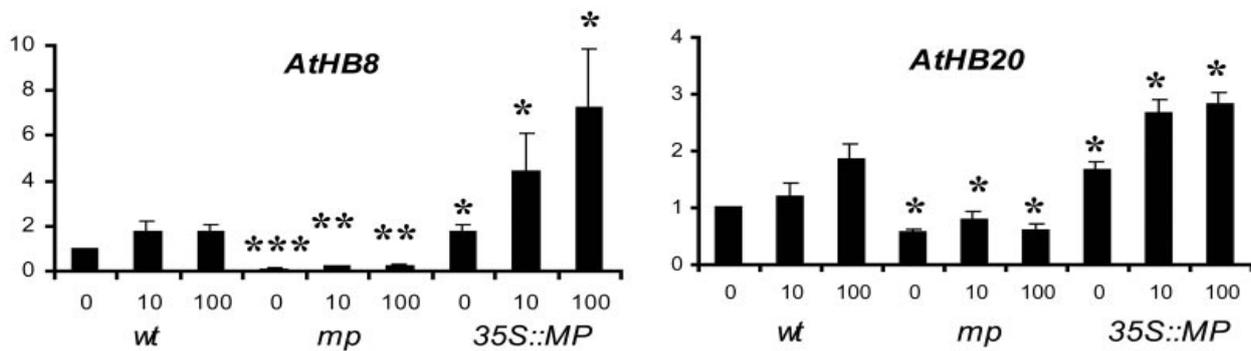
Selain pengaruh auksin, Scarpella, et al. (2006) melaporkan bahwa pemberian NPA dengan dosis yang lebih tinggi juga berpengaruh negatif terhadap penurunan distribusi PIN1 sehingga menghambat venasi daun. Pada konsentrasi tertinggi yaitu 50 μM NPA, bentuk daun Arabidopsis tampak lebih lonjong dibandingkan bentuk normalnya. Hasil kedua penelitian tersebut menunjukkan bahwa aktivitas auksin dan PIN1 hanya terlihat pada daerah marginal daun dan tidak mengalami pembentukan dan perluasan tulang daun yang baru. Kondisi ini menjelaskan bahwa dalam kasus reduksi transpor auksin secara signifikan, auksin merupakan pengatur pola jaringan pembuluh daun dan PIN1 memfasilitasi distribusi aliran auksin.

HUBUNGAN AUKSIN-EKSPRESI GEN DALAM PERKEMBANGAN VASKULAR DAUN

Hormon auksin menginduksi aktivasi beberapa gen faktor transkripsi kelompok homeodomain-leucine zipper (HD-ZIP). Gen faktor transkripsi ini akan mengaktifkan ekspresi gen MONOPTEROS (MP) yang menyandi protein dan enzim yang terlibat dalam perkembangan vaskular daun. Mattsson,

et al (2003) melaporkan beberapa ekspresi gen faktor transkripsi (gen AtH28 dan AthB20) pada tanaman Arabidopsis yang ditumbuhkan dalam medium dengan konsentrasi 10 dan 100 μM IAA.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa mutan *mp* (mengalami mutasi pada gen MP) sangat kecil mengekspresikan gen AtH28 dan AthB20 terhadap pemberian IAA dan menunjukkan perbedaan yang sangat signifikan dengan tanaman liar dan overekspresi. Ekspresi gen tersebut sangat besar pada Arabidopsis transgenik *35S::MP* dan berbeda signifikan dengan tanaman liarnya. Tanaman ini memiliki level kemampuan ekspresi gen MP yang tinggi dalam merespon IAA. Gambar 6 menunjukkan hubungan linear antara konsentrasi IAA dengan ekspresi gen AtH28 dan AthB20. Dengan demikian, aktivitas gen yang mengontrol perkembangan daun dipengaruhi oleh konsentrasi auksin. Auksin maksimum meningkatkan ekspresi gen MP melalui aktivasi gen faktor transkripsi HD-ZIP. Mutan yang defisien gen MP bersifat insensitif terhadap auksin dan sehingga mengalami hambatan vaskularisasi daun.



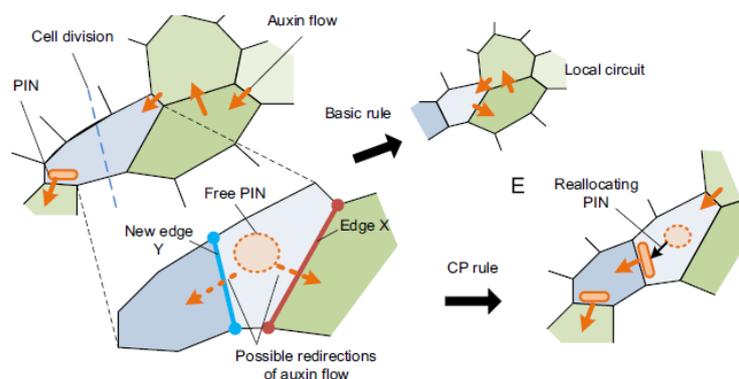
Gambar 6. Ekspresi gen HD-ZIP dalam medium IAA konsentrasi 0, 10, dan 100 μM. *wt*: tipe liar, *mp*: mutan gen MP, *35S::MP*: overekspresi gen MP

FAKTOR-FAKTOR YANG MENGONTROL KONTINUITAS VENASI DAUN

Pada umumnya auksin dan protein PIN1 berperan penting dalam orientasi pertulangan daun. Untuk melengkapi bagaimana mekanisme yang terjadi selama venasi, Sang-Woo, et al. (2014) membuat model kanalisasi aliran auksin. Pola kanalisasi terbentuk jika nilai parameter *E1* (yaitu rasio antara efisiensi pompa auksin dan kecepatan metabolisme auksin) adalah rendah dan *E2* (yaitu rasio antara fluks auksin dan alokasi PIN1) adalah tinggi ($E1:E2=10,100$). Rasio tersebut menggambarkan pompa auksin dengan jumlah yang cukup melalui lokalisasi protein PIN1. Kondisi ini meminimalkan akumulasi auksin yang memicu proses degradasi ketika nilai *E1*

lebih tinggi sehingga membelokkan aktivitas sel ke arah degradasi auksin dibandingkan transpor auksin.

Terdapat dua masalah utama dalam pola aliran auksin dalam jaringan daun yang mengalami pertumbuhan yaitu diskontinuitas dan kehilangan arah pembentukan vena yang lurus (*straightness*). Diskontinuitas nampaknya disebabkan oleh sirkulasi lokal auksin di sekitar beberapa sel, dengan kata lain, transpor auksin hanya terjadi di sekitar sel tersebut dan memblokir aliran auksin ke sel tetangga yang lain. Fenomena ini terjadi akibat perubahan pola pembelahan sel yang tidak seragam sehingga panjang tepi sel-sel yang menyusun jaringan pembuluh tidak membentuk bentuk sel yang sinergis (Gambar 7).

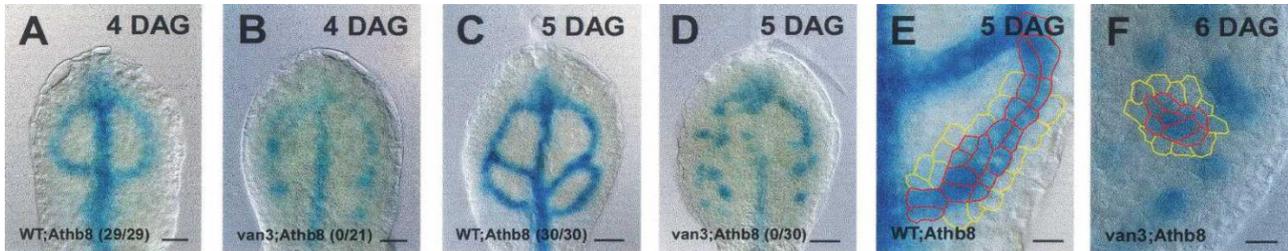


Gambar 7. Mekanisme peluang terjadinya diskontinuitas aliran auksin

Kejadian ini memungkinkan pembalikan arah aliran auksin ke sel-sel terdekat saja. Arah pembelahan sel yang tegak lurus dengan aliran auksin meningkatkan membuat venasi daun yang berliku dan bengkok dibandingkan

venasi yang lurus pada kondisi sel dengan arah pembelahan yang sama dengan aliran auksin. Sang-Woo et al. (2014) menyimpulkan bahwa peningkatan elastisitas dinding sel dengan aliran auksin yang tinggi dilengkapi dengan

siklus pembelahan sel yang normal merupakan faktor terpenting dalam mengeliminasi kejadian diskontinuitas venasi.



Gambar 8. Kontinuitas vaskular primordia daun pada tipe liar (A,C,E) dan diskontinuitas pada tipe mutan *van3* (B,D,F)

Faktor lain yang menyumbang fenomena diskontinuitas venasi adalah ketiadaan faktor transkripsi *Athb8* dalam termasuk dalam kelompok HD-ZIP (Mattsson *et al* 2003). Pada mutan *van3*, ekspresi gen *Athb8* tidak kuat seperti yang ditemukan pada spesies liarnya (Gambar 8). Diskontinuitas venasi yang akut pada mutan *van3* menyebabkan pola venasi daun yang terputus. Seperti yang dikemukakan Sang-Woo, et al. (2014), terdapat lokalisasi venasi daun yang terpisah dan tidak berhubungan satu sama lain dengan venasi yang lain. Indikasi mekanisme ini mungkin menghasilkan daun yang tidak kokoh karena pertulangan daun yang tidak sempurna dan tidak dapat mengalokasikan fotosintat dengan maksimal ke setiap organ.

KESIMPULAN

Transpor auksin maksimum melalui protein efluks PIN1 merupakan satu paket yang vital untuk menghasilkan morfologi daun dengan pertulangan dan filotaksis yang normal. Di sisi lain auksin berperan sebagai sinyal yang menginduksi ekspresi gen faktor transkripsi *AtH28* dan *AthB20* yang

mengontrol perkembangan daun dan gen *Athb8* yang mempertahankan kontinuitas antar jaringan pembuluh. Model kanalisasi venasi daun ditentukan oleh orientasi pembelahan sel yang seragam sehingga mampu meminimalkan *straightness* dan diskontinuitas pertulangan daun.

DAFTAR PUSTAKA

- Guenot B, Bayer E, Kierzkowski D, Smith RS, Mandel T, Zádňíková P, Benková E, and Kuhlemeier C. 2012. *PIN1-Independent Leaf Initiation in Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 159: 1501–1510.
- Mattsson J, Ckurshumova W, and Berleth T. 2003. *Auxin Signaling in Arabidopsis Leaf Vascular Development*. *Plant Physiol.* 131: 1327–1339.
- Sang-Woo L, Feugier FG, and Morishita Y. 2014. *Canalization-based vein formation in a growing leaf*. *Journal of Theoretical Biology.* 353:104–120.
- Scarpella E, Marcos D, Friml J, and Berleth T. 2006. *Control of leaf vascular patterning by polar auxin transport*. *Genes Dev.* 20:1015–1027.