

Transformasi Genetik *Nicotiana benthamiana* dengan Gen CP untuk Mendapatkan Ketahanan Tanaman terhadap *Peanut Stripe Virus*

(Genetic Transformation of *Nicotiana benthamiana* With CP Gen to Obtain Plant Resistance Against Peanut Stripe Virus)

Nur YASIN ¹⁾

¹⁾Jurusan Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung, Jl. Prof. Dr. Sumantri Brojonegoro 1, Bandar Lampung 35145

ABSTRACT. This research seeks to obtain transgenic crops resistant to *Peanut Stripe Virus* (PStV) using *Agrobacterium tumefaciens* harboring CP (*coat protein*) gene. The research aim to evaluate (1) regeneration process of transgenic crops in tissue culture and (2) transgenic model crop resistance of *Nicotiana benthamiana* of T₀ generation carrying CP gene and GUS/NPTII against PStV infection. The results point out that critical stage to regenerate transgenic crops in tissue culture is during acclimatization period. Transgenic crops of *N. benthamiana* that perform robust stem growth, have many roots and leaves in tissue culture *in vitro* usually indicate better growth in the acclimatization period. Transgenic *N. benthamiana* containing the various types of CP-1 gene, CP-2, CP-3, CP-4, and NPTII/GUS were successfully produced. Moreover, transgenic crop resistance against PStV occurs due to integration of CP gene, but not because of integration of marker gene or other processes passed during the activities of *Agrobacterium*-mediated crop transformation.

Key words: Tissue culture, transgenic, transformation, resistance, T₀, PStV

ABSTRAK. Transformasi genetik tanaman menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* yang membawa gen CP (*coat protein*) telah dilakukan untuk memperoleh tanaman transgenik tahan *Peanut Stripe Virus* (PStV). Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi (1) transformasi genetik (proses rekayasa genetika) tanaman dan (2) ketahanan tanaman transgenik model (*Nicotiana benthamiana*) generasi T₀ yang membawa gen CP dan gen GUS/NPTII terhadap infeksi PStV. Hasil penelitian menunjukkan bahwa masa kritis untuk regenerasi tanaman transgenik hasil kultur jaringan adalah tahapan aklimatisasi. Tanaman transgenik *N. benthamiana* yang pertumbuhannya baik dengan batang lebih besar, akar dan daun yang banyak dalam kultur *in vitro*, biasanya akan lebih berhasil diaklimatisasi. *N. benthamiana* transgenik yang membawa berbagai tipe gen CP-1, CP-2, CP-3, CP-4, dan gen NPTII/GUS telah dapat dihasilkan. Sedangkan ketahanan tanaman transgenik terhadap PStV terjadi akibat integrasi gen CP dan bukan karena integrasi gen marker atau karena proses-proses lain yang dilalui dalam kegiatan transformasi tanaman dengan bantuan *Agrobacterium*.

Kata kunci: Regenerasi, transgenik, ketahanan, T₀, PStV.

PENDAHULUAN

Di Indonesia, PStV (*Peanut Stripe Virus*) menjadi masalah dalam usaha budidaya kacang tanah. PStV paling dominan menyerang kacang tanah dibandingkan dengan virus-virus yang lain dan merupakan salah satu penyebab rendahnya daya hasil kacang tanah (Saleh *et al.*, 1989). Berbagai cara telah ditempuh untuk mengatasi serangan virus, misalnya dengan menghilangkan sumber infeksi virus, menggunakan benih bebas virus, menggunakan bahan vegetatif bebas virus, memperbanyak dan memelihara bahan bebas

virus, mengatur cara penanaman, mencegah penyebaran virus jarak jauh, mengendalikan vektor, dan menggunakan tanaman tahan virus, dan penggunaan tanaman transgenik untuk melindungi tanaman terhadap virus (Hull, 2004). Menurut Saleh dan Baliadi (1990) pengujian yang dilakukan oleh Balai Penelitian Kacang-kacangan di Malang, Indonesia, menunjukkan tidak ada galur kacang tanah yang tahan terhadap infeksi isolat PStV dari Indonesia.

Untuk mendapatkan tanaman tahan virus pada mulanya digunakan strategi proteksi silang. Strategi ini berdasarkan penemuan bahwa infeksi

tanaman oleh strain virus yang lemah dapat menekan dan menunda gejala yang disebabkan oleh infeksi virus kedua yang lebih ganas (virulen). Strategi ini telah digunakan dalam praktek untuk mengurangi kerusakan oleh virus, misalnya *tomato mosaic virus* pada tanaman tomat, *citrus tristeza virus* pada tanaman jeruk, *spindle tuber viroid* pada tanaman kentang, dan *papaya ringspot virus* pada tanaman pepaya. Tetapi, aplikasi dalam skala besar telah mengalami rintangan karena virus yang digunakan untuk proteksi silang ini masih menyebabkan gejala ringan. Di samping itu, virus yang menunjukkan gejala ringan pada satu tanaman dapat menimbulkan penyakit yang lebih parah pada spesies lainnya, virus dapat mengalami mutasi sehingga menjadi lebih ganas, atau virus bekerja secara sinergistik dengan virus yang bukan kerabat sehingga menimbulkan pengaruh yang lebih merusak. Beberapa kelemahan ini dapat diatasi bila digunakan gen virus tunggal yang ditransfer ke tanaman, bukan virus utuh, misalnya gen protein selubung (Stiekema dan Visser, 1991). Dengan cara ini dapat dibuat varietas tanaman yang tahan terhadap virus.

Penggunaan varietas tahan mempunyai beberapa keuntungan yaitu biaya penanaman menjadi lebih ekonomis bagi petani, mengurangi masalah lingkungan yang disebabkan oleh pestisida, dan dianggap sebagai cara pengendalian yang paling efektif dalam jangka panjang (Hull, 1990). Varietas yang tahan terhadap virus dewasa ini bisa diusahakan dengan memanfaatkan kemajuan ilmu pengetahuan di bidang biologi molekuler tanaman dan rekayasa genetika.

Perkembangan teknologi DNA rekombinan telah memberikan harapan dan ca-krawala baru dalam mengatasi penyakit yang disebabkan oleh virus tanaman. Transfer gen pada tanaman telah dapat menghasilkan tanaman transgenik yang mengandung gen asing yang berfungsi dan terintegrasi ke dalam genom tanaman tersebut. Dalam hal ini contohnya adalah dihasilkannya tanaman transgenik dengan kualitas dan kuantitas produksi yang lebih baik atau yang lebih tahan penyakit (Uchimiya, Handa, dan Brar, 1989).

Beberapa metode telah dikembangkan untuk membuat tanaman transgenik. Salah satu metodenya adalah penggunaan *Agrobacterium tumefaciens*. Bakteri ini sesungguhnya merupakan patogen bagi tumbuhan, yang dapat mentransformasi sel-sel tanaman secara genetik

yang mengakibatkan terbentuknya puru pada tanaman sehingga mengganggu pertumbuhan normal pada tanaman yang terinfeksi. Karena kemampuannya untuk melakukan rekayasa sel tanaman secara genetik melalui T-DNA maka setiap strain *A. tumefaciens* secara alami mampu melakukan rekayasa genetika tanaman. Patogenisitas bakteri ini setelah direkayasa dapat dihilangkan bahkan dapat diganti gen lain yang bermanfaat bagi tanaman, termasuk gen-gen yang berfungsi bagi ketahanan terhadap infeksi virus (Glick dan Pasternak, 2003).

Virus utuh (virion) terdiri atas asam nukleat dan *coat protein* (protein selubung). Gen *coat protein* (CP) kini telah dapat dimanfaatkan dalam rekayasa genetika tanaman. Bila tanaman transgenik mengekspresikan *coat protein* kemampuan virus untuk menginfeksi tanaman tersebut dan untuk menyebar secara sistemik sangat berkurang, meskipun mekanisme penghambatan gen CP terhadap replikasi virus secara tepat belum diketahui (Glick dan Pasternak, 2003). Gen CP telah digunakan dalam penelitian untuk mendapatkan tanaman kedelai transgenik yang tahan terhadap *Soybean dwarf virus* (Tougou *et al.*, 2007). Penelitian yang menggunakan gen CP dari PAMV (*potato aucuba mosaic vi-rus*) yang telah mengalami delesi (dihilangkannya sebagian nukleotida dari gen CP) telah dilakukan oleh Leclerc dan AbouHaidar (1995).

Dalam penelitian ini digunakan 4 tipe konstruksi gen CP yang ditransformasi ke tanaman model *Nicotiana benthamiana* dengan bantuan *A. tumefaciens* AGL0. Inokulasi virus untuk pengujian ketahanan tanaman transgenik model terhadap PStV (*Peanut Stripe Virus*) menggunakan cara mekanik.

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi (1) transformasi genetik (proses rekayasa genetika) tanaman dan (2) ketahanan tanaman transgenik model (*Nicotiana benthamiana*) generasi T₀ yang membawa beberapa tipe gen CP (Tabel 1) dan gen GUS terhadap infeksi PStV. Beberapa tanaman yang diuji adalah (a) tanaman transgenik yang membawa tipe gen CP PStV sebagaimana yang dipunyai oleh cistron CP dari genom PStV (gen CP-1), (b) tanaman transgenik dengan gen CP PStV yang telah mengalami mutasi titik alias kehilangan *DAG-box motif*-nya (gen CP-2), (c) tanaman transgenik dengan gen CP PStV yang mengekspresikan mRNA dan mRNA-nya yang tidak dapat ditranslasi menjadi protein (gen CP-3), dan (d) tanaman transgenik dengan gen CP PStV yang mengekspresikan

bagian tengah CP (gen CP-4).

BAHAN DAN METODE

Pada dasarnya transformasi tanaman dilakukan melalui tiga tahapan penting yaitu inokulasi eksplan dengan kultur *Agrobacterium*, kokultivasi dalam periode pendek, dan eliminasi bakteri

dengan antibiotik (Draper, Scott, dan Hamil, 1988). Transformasi dalam penelitian ini selain menggunakan konstruksi 4 tipe gen CP PSTV (Tabel 1) juga menggunakan gen marker (GUS) yang ditransfer ke tanaman tembakau *Nicotiana benthamiana* dengan bantuan *Agrobacterium tumefaciens*.

Tabel 1. Karakteristik gen CP PSTV

Tipe gen CP PSTV	Ekspresi		Keterangan
	mRNA	Coat Protein	
Gen CP-1	+	+	Mengakumulasi CP seperti yang dihasilkan secara alami oleh PSTV
Gen CP-2	+	+	Mengakumulasi CP, tetapi CP-nya kehilangan DAG <i>box motif</i> akibat mutasi titik
Gen CP-3	+	-	Tidak mengakumulasi CP, hanya mengakumulasi mRNA, akibat adanya kodon stop di awal <i>open reading frame</i> gen CP
Gen CP-4	+	+ ¹⁾	Mengakumulasi CP seperti yang dihasilkan secara alami oleh PSTV

¹⁾ Ukuran lebih kecil daripada CP yang normal

Penyediaan Kultur *Agrobacterium*

Untuk menyegarkan stok *Agrobacterium*, bakteri, yang masing-masing membawa gen marker atau salah satu dari tipe gen CP PSTV, dari stok penyimpanan

dibiakkan di cawan petri yang mengandung media YEP, antibiotik rifampisin (20 mg/l), dan kanamisin (50 mg/l). Biakan ini diinkubasi selama dua hari pada ruang inkubasi dengan temperatur 28°C. Tiga sampai lima koloni bakteri yang tumbuh pada cawan petri diambil dengan jarum ose dan diinokulasikan ke dalam 50 ml YEP cair yang mengandung kedua antibiotik tersebut. Biakan dikocok dengan kecepatan 100 rpm, selama satu malam menggunakan pengocok (*shaker*) yang diinkubasikan dalam ruang bersuhu 28°C. Kultur bakteri yang telah disegarkan diambil 100 µl dan dibiakkan kembali di cawan petri yang mengandung media YEP dengan kedua antibiotik di atas. Biakan diinkubasikan pada suhu 28°C selama 2 hari. Setelah pembiakan dalam YEP padat yang kedua, tiga sampai lima koloni bakteri yang didapat dipindahkan ke media YEP cair (50 ml) dengan kedua antibiotik tersebut, dikocok dengan kecepatan 100 rpm pada *shaker* dan diinkubasikan dalam ruang kultur bersuhu 28°C selama semalam. Biakan yang didapat siap digunakan untuk transformasi tanaman.

Kultur bakteri yang telah disiapkan

disentrifugasi (5000 rpm, selama 10 menit) pada suhu 4°C dan endapan bakteri yang didapat dicuci tiga kali dengan media regenerasi tunas cair tanpa antibiotik. Pencucian dilakukan dengan meresuspensikan endapan dalam media regenerasi tanaman (MS₀ + Vitamin B1 1 mg/l + BAP 0,5 mg/l) dan mengendapkan bakteri kembali dengan sentrifugasi. Setelah pencucian, endapan bakteri diresuspensikan ke dalam 10 ml media regenerasi dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 600 nm (λ₆₀₀) dengan blanko media regenerasi. Suspensi bakteri diencerkan dengan media regenerasi sampai mencapai nilai OD (*optic density*) sebesar 0,2—0,5. Suspensi bakteri diletakkan dalam remahan es dan siap digunakan untuk transformasi tanaman.

Transformasi dan Regenerasi *N. benthamiana* Transgenik

Inokulasi *Agrobacterium*. Transformasi gen dilakukan dengan metode kokultivasi daun *N. benthamiana* dengan *Agrobacterium*. Daun tembakau dipotong-potong selebar 3—5 mm dengan gunting steril dan ditampung dalam botol steril yang berisi sedikit cairan media regenerasi. Untuk menginokulasi potongan daun dengan *Agrobacterium* suspensi bakteri sebanyak 50 ml yang telah disesuaikan OD-nya dituangkan ke botol steril yang telah berisi potongan daun tersebut. Botol steril ditutup dan disegel dengan

parafilm kemudian dikocok pelan-pelan pada shaker selama 5—10 menit. Selanjutnya, potongan daun yang telah diinokulasi dipindahkan ke kertas tisu steril pada cawan petri untuk menyerap kelebihan cairan dan suspensi bakteri.

Kokultivasi. Kokultivasi potongan daun dengan *Agrobacterium* dilakukan dengan menanam potongan daun tersebut dalam botol yang berisi media regenerasi (media agar) tanpa antibiotik. Pada tahap ini daun-daun ditata/disusun agak padat dalam media regenerasi. Botol disegel dan diinkubasi dalam almari es pada suhu 15°C selama satu hari. Setelah melewati masa kokultivasi, eksplan dicuci dengan aquades steril beberapa kali sampai aquades tampak bening dan akhirnya dicuci dengan 50 ml media regenerasi cair yang mengandung cefotaksim (300 mg/l).

Regenerasi tanaman transgenik.

Eksplan yang telah dibersihkan dipindahkan ke media regenerasi padat yang mengandung antibiotik cefotaksim 300 mg/l selama 3—5 hari. Setelah itu, eksplan dicuci kembali sebagaimana sebelumnya dan ditanam pada media regenerasi yang mengandung cefotaksim (300 mg/l) dan kanamisin (100 mg/l) hingga membentuk tunas (1—2 bulan). Setelah tunas yang terbentuk memanjang, tunas dipotong menjadi 3 bagian untuk memperbanyak dan ditanam bersama dalam botol media yang mengandung cefotaksim dan kanamisin. Jika 3 eksplan ini telah tumbuh dengan baik maka 1 eksplan disubkultur di media regenerasi yang mengandung cefotaksim dan kanamisin untuk konservasi (disimpan) dalam bentuk kultur. Dua eksplan lainnya ditanam di media perakaran (MS₀). Jika plantlet dari 2 eksplan ini telah berakar dengan baik maka 1 plantlet dibersihkan dari agar kemudian dipindahkan ke media tanah untuk aklimatisasi dan 1 plantlet lagi untuk disubkultur lagi ke media perakaran untuk cadangan jika plantlet yang diaklimatisasi mati.

Aklimatisasi dan Produksi Benih T_{0:1}

Untuk memindahkan plantlet dari media invitro (media steril) ke media *ex vitro* (media tanah) memerlukan tahapan aklimatisasi. Plantlet yang telah berakar dengan baik dibersihkan agarnya dari perakaran kemudian dicelupkan ke dalam larutan fungisida Dithane (1g/l) dan dipindahkan ke pot plastik yang berisi media tanah steril yang telah disiram pupuk N-P-K cair (0,5 gr/l) dan disungkup dengan botol untuk mengurangi penguapan. Pada minggu pertama plantlet

tersebut diinkubasikan pada suhu 25—28°C dan dijaga dalam kondisi kelembaban tinggi dan secara bertahap dikurangi sampai kondisi kelembaban normal. Pada minggu kedua plantlet dipindahkan ke rumah plastik yang dinaungi dan pada minggu ketiga sungkup dibuka. Pada minggu keempat plantlet dipindahkan ke polibag yang berisi media tanam campuran kompos:pasir = 1:1 (v/v) dan tanaman transgenik T₀ yang didapat dipelihara dalam rumah plastik kedap serangga sampai berbuah. Tanaman tembakau yang telah berbuah dijaga agar buahnya tidak sampai pecah sehingga biji-biji tembakau tidak sampai jatuh berguguran. Buah tembakau yang kulitnya telah berwarna hijau tua diamati biji-biji yang ada di dalamnya. Jika biji-biji di dalam buah tersebut telah berwarna hitam semua maka buah segera dipetik dan diberi label untuk dijemur atau dikering-anginkan. Bila buah tembakau telah kering kulit buah dibuang dan bijinya disimpan. Biji yang pertama dihasilkan ini merupakan biji atau benih T_{0:1}. Biji-biji T_{0:1} dari tanaman transgenik CP-1, CP-2, CP-3, dan transgenik CP-4 setelah ditanam kemudian diuji dengan PStV.

Uji Ketahanan *N. benthamiana* Transgenik terhadap PStV

Untuk menentukan keefektifan gen CP PStV yang diuji, populasi tanaman transgenik yang masing-masing membawa satu tipe gen CP diinokulasi dengan PStV dan respon tanaman terhadap inokulasi virusnya ditentukan berdasarkan ada tidaknya replikasi dan penyebaran PStV di dalam tanaman transgenik. Sebagai pembandingan, tanaman transgenik yang membawa gen marker NPTII/GUS dan tanaman normal yang tidak membawa gen marker atau gen CP PStV juga diinokulasikan virus yang sama.

Sumber inokulum. Perbanyak sumber inokulum dilakukan pada tanaman kacang tanah cv kelinci yang diinokulasi secara mekanik dengan PStV isolat Bogor yang tergolong sebagai isolat "*severe blotch-stripe*" (Akin, 1998). Inang kacang tanah umur 10 hari sesudah tanam yang ditumbuhkan dalam kantong plastik (20—25 tanaman tiap kantong) diinokulasi dengan cara mengoleskan cairan inokulum yang mengandung isolat PStV tersebut pada dua daunnya. Ketika gejala infeksi PStV telah muncul (kurang lebih 10 hari), daun kacang tanah yang menunjukkan gejala siap digunakan sebagai sumber inokulum untuk pengujian tanaman transgenik. Setelah inang kacang tanah berumur 35 hari, penyegaran kembali sumber inokulum PStV dilakukan

dengan cara yang sama dengan di atas.

Inokulasi tanaman transgenik dengan PStV.

Tanaman transgenik T₀ yang tumbuh kemudian dipangkas daunnya dan ditinggalkan dua daun teratas yang telah membuka sempurna sebelum diuji responnya dengan PStV. Selanjutnya kedua daun yang tersisa tersebut ditaburi Carborundum (600 mesh). Inokulasi PStV dilakukan dengan cara mengoleskan cairan perasan daun kacang tanah terinfeksi PStV yang telah disiapkan ke *N. benthamiana* yang telah ditaburi Carborundum tersebut dengan menggunakan *cotton buds*. Untuk memastikan agar tidak terjadi kesalahan dalam inokulasi, masing-masing tanaman yang diuji diinokulasi PStV sebanyak dua kali pada daun yang berbeda dengan selang waktu inokulasi dari yang pertama dengan inokulasi yang kedua selama satu minggu. Tanaman transgenik yang membawa gen marker NPTII/GUS dan tanaman normal pada generasi yang setara juga diinokulasi dengan PStV menggunakan cara yang sama dan digunakan sebagai pembanding percobaan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Regenerasi Tanaman Transgenik

Dalam produksi tanaman transgenik, didapatkannya tanaman transgenik yang fertil menjadi prasyarat agar gen yang diintroduksi dan terintegrasi dalam genom dapat diturunkan ke generasi berikutnya (Potter dan Jones, 1997). Transformasi 4 macam gen CP PStV (CP-1, CP-2, CP-3, dan CP-4) dan gen marker NPTII/GUS pada tanaman model *N. benthamiana* menggunakan *Agrobacterium* telah dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor. Beberapa tunas yang diduga tunas transgenik hasil transformasi dipelihara sampai menjadi plantlet (tanaman kecil). Plantlet yang didapat selanjutnya diaklimatisasi dan ditanam di rumah plastik sehingga diperoleh tanaman transgenik yang menghasilkan biji T_{0:1} (biji yang dihasilkan dari tanaman transgenik T₀).

Tabel 2. Perkembangan jumlah individu dari transforman sampai diperoleh biji *N. benthamiana* hasil introduksi gen

Gen yang diintroduksi	Σ transforman	Σ tunas yang didapatkan	Σ plantlet	Σ tanaman yang hidup di rumah kaca	Σ tanaman berbiji ^{*)}
CP-1	26	18	16	9	2
CP-2	17	25	24	14	6
CP-3	10	54	50	24	17
CP-4	18	43	38	17	6
GUS	21	40	37	24	12
	92	180	165	88	43
Persentase	100%	100%	92%	49%	24%

^{*)} Sebagian tunas/tanaman merupakan hasil perbanyakan vegetatif dari transforman yang sama

Jumlah tunas yang dihasilkan dari proses transformasi dan perkembangannya dapat dilihat pada Tabel 2. Dari data tersebut dapat dilihat bahwa masa kritis untuk regenerasi tanaman transgenik hasil kultur jaringan adalah tahapan aklimatisasi. Tanaman transgenik *N. benthamiana* yang pertumbuhannya baik dengan batang lebih besar, akar dan daun yang banyak dalam kultur *in vitro*, biasanya akan lebih berhasil diaklimatisasi sehingga menjadi tanaman yang tumbuh di rumah plastik, karena pada tahapan ini plantlet yang diregenerasikan dipindahkan dari kondisi *in vitro* ke kondisi *ex vitro* yang

menyebabkan terjadinya perubahan suhu, kelembaban, dan faktor lingkungan lainnya. Dari 180 pucuk calon tanaman transgenik yang didapat dari proses transformasi yang berhasil menjadi tanaman di rumah kaca setelah diaklimatisasi hanya 88 tanaman (49%). Selanjutnya, dari 88 tanaman yang didapat tersebut hanya 43 tanaman transgenik generasi T₀ (24%) yang dapat menghasilkan biji T_{0:1}. Untuk gen CP PStV tipe CP-1 didapatkan dua genotip tanaman transgenik yang menghasilkan biji, sedangkan untuk tipe CP-2 — 5 genotipe, tipe CP-3 — 6 genotipe, CP-4 — 6 genotipe.

Untuk gen marker NPTII/GUS didapat 7 genotipe tanaman transgenik yang menghasilkan biji $T_{0:1}$. Tidak semua tanaman transgenik dapat tumbuh dan berkembang sampai menghasilkan biji. Beberapa tanaman telah mati ketika masih dalam bentuk plantlet, dan beberapa lagi mengalami kematian ketika tanaman berada di rumah kaca. Kebanyakan tanaman yang mati ini belum berbunga, hanya beberapa tanaman saja yang sudah berbunga kemudian mati sebelum menghasilkan biji. Ada juga tanaman yang sudah menghasilkan biji yang masih muda (biji belum masak) kemudian mati.

Ketahanan Tanaman Transgenik terhadap PStV

Respon tanaman T_0 terhadap PStV telah diuji. Beberapa tanaman transgenik menunjukkan respon tahan terhadap PStV, ada juga tanaman yang rentan terhadap PStV. Tanaman kontrol yang terdiri dari tanaman transgenik NPTII/GUS dan tanaman non transgenik semuanya rentan terhadap PStV. Dengan demikian ketahanan tanaman transgenik terhadap PStV terjadi akibat integrasi gen CP dan bukan karena integrasi gen marker atau karena proses-proses lain yang dilalui dalam kegiatan transformasi tanaman dengan bantuan *Agrobacterium*. Gen CP juga telah berhasil digunakan dalam penelitian lain, pada tanaman kedelai yang menggunakan gen CP SbDV (*Soybean Dwarf Virus*). Dalam penelitian yang telah dilakukan oleh Tougou *et al.*, (2007) diperoleh 10 tanaman kedelai hasil transformasi

genetik. Sepuluh tanaman ini kemudian ditransfer ke rumah kaca, empat tanaman mati tetapi enam tanaman ternyata fertil dan menghasilkan biji T_1 .

Respon tanaman tahan atau rentan terhadap PStV ditunjukkan oleh daun tanaman indikator *Chenopodium amaranticolor* yang telah diolesi cairan perasan daun tanaman transgenik. Tanaman transgenik yang tahan PStV tidak dapat menularkan inokulum PStV pada daun tanaman indikator. Sedangkan tanaman transgenik yang rentan dapat terinfeksi PStV dan dapat menularkan inokulum PStV pada daun tanaman indikator sehingga timbul gejala lesio lokal pada daun tanaman indikator tersebut. Gejala lesio lokal ini mulai muncul 3 hari setelah inokulasi berupa bintik kecil, tetapi untuk memastikan bahwa bintik adalah gejala lesio lokal maka pengamatan dan pendataan gejala dilakukan 10 hari setelah inokulasi. Bintik yang benar-benar berupa lesio lokal menjadi lebih besar atau luas sedangkan bintik yang bukan lesio lokal tetap kecil.

Respon tanaman T_0 terhadap PStV dapat dilihat pada Tabel 3. Sebagian tanaman hasil transformasi masing-masing tipe gen CP tersebut tahan terhadap PStV dan sebagian lainnya rentan terhadap PStV. Hull (2003) menyatakan bahwa gejala ketahanan tanaman akibat transformasi genetik gen CP dikenal dengan ketahanan yang dimediasi *coat protein* (CPMR = *Coat Protein Mediated Resistance*).

Tabel 3. Respon tanaman transgenik generasi T_0 terhadap PStV

No	Kode genotipe T_0	Fenotipe T_0	No	Kode genotipe T_0	Fenotipe T_0
1	1A(1)CP1	Tidak Diuji	16	5(5)CP3	Tahan PStV
2	3A(1)CP1	Tahan PStV	17	7(1)CP3	Tahan PStV
3	1A(1)CP2	Tidak Diuji	18	7(2)CP3	Tahan PStV
4	1A(2)CP2	Tidak Diuji	19	8(1)CP3	Tahan PStV
5	2A(1)CP2	Tahan PStV	20	8(2)CP3	Tahan PStV
6	8A1()CP2	Tahan PStV	21	8(3)CP3	Tahan PStV
7	9A(1)CP2	Rentan PStV	22	10(1)CP3	Tahan PStV
8	1(1)CP3	Rentan PStV	23	10(2)CP3	Tidak Diuji
9	1(2)CP3	Rentan PStV	24	2B(1)CP4	Tahan PStV
10	4(1)CP3	Rentan PStV	25	3A4()CP4	Tidak Diuji
11	4(2)CP3	Tahan PStV	26	5A(1)CP4	Tidak Diuji
12	5(1)CP3	Tahan PStV	27	9B1()CP4	Tahan PStV
13	5(2)CP3	Rentan PStV	28	26A(1)CP4	Tidak Diuji
14	5(3)CP3	Rentan PStV	29	10(1)pK	Rentan PStV
15	5(4)CP3	Rentan PStV	30	Kontrol	Rentan PStV

KESIMPULAN

Masa kritis untuk regenerasi tanaman transgenik hasil kultur jaringan adalah tahapan aklimatisasi. Tanaman transgenik *N. benthamiana* yang pertumbuhannya baik dengan batang lebih besar, akar dan daun yang banyak dalam kultur *in vitro*, biasanya akan lebih berhasil diaklimatisasi. Telah dapat dihasilkan *N. benthamiana* transgenik yang membawa berbagai tipe gen CP-1, CP-2, CP-3, CP-4, dan gen NPTII/GUS.

3. Ketahanan tanaman transgenik terhadap PStV terjadi akibat integrasi gen CP dan bukan karena integrasi gen marker atau karena proses-proses lain yang dilalui dalam kegiatan transformasi tanaman dengan bantuan *Agrobacterium*.

DAFTAR PUSTAKA

- Akin, H. M.** 1998. *Peanut stripe virus* strain Indonesia: variasi biologi, deteksi molekuler, pengklonan, dan determinasi urutan nukleotida 3'genom RNA PStV, serta analisis keragaman dan filogenetika berdasarkan gen CP dan 3'UTR. Disertasi S3—Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Draper, J., R. Scott, dan J. Hamil.** 1988. Transformations of dicotyledonous plant cells using the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* and the Ri plasmid of *A. rhizogenes*. Dalam Draper, J., R. Scott, P. Armitage, dan R. Walden (eds): *Plant genetic transformation and gene expression—A laboratory manual*, p 71—132. Blackwell Scientific Pubs, Oxford.
- Glick, B. R. dan J. J. Pasternak.** 2003. *Molecular biotechnology: Principles and applications of recombinant DNA*. ASM Press, Washington, D.C.
- Hull, R.** 1990. Non-conventional resistance to viruses in plant concepts and risks. Dalam J. P. Gustafson (ed.): *Gene manipulation in plant improvement II*. p 289—303. Plenum Press, New York.
- Hull, R.** 2004. *Matthews' Plant Virology*. Elsevier Academic Press, Amsterdam.
- Leclerc, D. dan M. G. AbouHaidar.** 1995. Transgenic tobacco expressing a truncated form of the PAMP capsid protein (CP) gene show CP-mediated resistance to *Potato Aucuba Mosaic Virus*. *MPMI*. 8(1): 58—65.
- Potter, R. H. dan M. G. K. Jones.** 1997. Plant gene transfer. Dalam M. S. Clark (ed.): *Plant molecular biology—A laboratory manual*, p:399-442. Springer, Berlin.
- Powell-Abel, P., R. R. Nelson, B. De, N. Hooffmann, S. G. Rogers, R. T. Fraley, dan R. R. Beachy.** 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science*. 232:738—743.
- Saleh, N., K. J. Middleton, Y. Baliadi, N. Horn, dan D. V. R. Reddy.** 1989. Research on peanut stripe virus in Indonesia. Dalam ICRISAT, p: 9—10. Summary: proceeding of the *second coordinators meeting on peanut stripe virus*, 1—4 August 1989, India.
- Saleh, N. dan Y. Baliadi.** 1990. Transmission of peanut stripe virus in groundnut seed in Indonesia. Dalam MAAPS, p: 333—335. Proceeding third *international conference on plant protection in the tropics*. Gentling Highlands, Pahang, Malaysia.
- Stiekema, W. J. dan L. Visser.** 1991. Gene transfer and genes to be transferred. Dalam *Biotechnological innovations in crop improvement*. Butterworth—Heinemann Ltd., Oxford. p 183—220.
- Tougou, M., N. Yamagishi, N. Furutani, Y. Shizukawa, Y. Takahata, dan S. Hidaka.** 2007. Soybean dwarf virus-resistant transgenic soybeans with the sense coat protein gene. *Plant Cell Rep.* 26:1967—1975.
- Uchimiya, H. T. Handa, dan D. S. Brar.** 1989. Transgenic plant. *J. Biotech.* 12:1—20.