

**EFEKTIVITAS GEN CP PSTV DALAM MEMPROTEKSI
NICOTIANA BENTHAMIANA TRANSGENIK T₀
TERHADAP SERANGAN PEANUT STRIPE VIRUS**

**EFFECTIVENESS OF VARIOUS CP PSTV GENES TO PROTECT TRANSGENIC
NICOTIANA BENTHAMIANA T₀ TOWARD PEANUT STRIPE VIRUS INFECTION**

Sholeh Avivi

Staf Fakultas Pertanian Universitas Jember

E-mai: avi_vi@yahoo.com

Sudarsono, Satriyas Ilyas, dan Hajrial Aswidinnoor

Staf Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor

ABSTRACT

The aims of this research were: (1) to obtain the transgenic Nicotiana benthamiana T₀ which have various cp Peanut stripe virus (PStV) genes construct (pBINRCP1, pBINRCP2, pBINRCP3, dan pBINRCP4); (2) to investigate the resistance of transgenic N. benthamiana T₀ toward PStV infection; (3) to investigate the effectiveness of those construct to protect N. benthamiana T₀ toward PStV infection. T₀ achieve those objectives N. benthamiana T₀ (70 plants) were regenerated, PCR tested and infected with PStV using biological analysis methods. The result showed that all of PStV construct gave the resistancy toward PStV infection. The phenotypic respon of those plants were the PBINRCP1 plants 35.7% resistance, 0% recovery, and 64.3% susceptible, the PBINRCP2 plants 41.7%, resistance, 0% recovery, and 58.3% susceptible, the PBINRCP3 plants 71.4% resistance, 0% recovery, and 28.6% susceptible, and the PBINRCP4 plants 25.0% resistance, 25.0% recovery, and 50.0% susceptible.

Key words: N. benthamiana, cp-PStV, Resistance

INTISARI

Tujuan penelitian ini adalah untuk: (1) memperoleh tanaman transgenik *Nicotiana benthamiana* T₀ (generasi tanaman transgenik ke-0 / planlet generasi pertama hasil kultur jaringan) yang mengandung empat tipe gen cp-Peanut stripe virus (PStV) yaitu: pBINRCP1, pBINRCP2, pBINRCP3, dan pBINRCP4; (2) menguji resistensi tanaman *N. benthamiana* transgenik generasi T₀ terhadap PStV; (3) mempelajari efektivitas ke-empat tipe konstruksi gen cp-PStV dalam menimbulkan reaksi ketahanan tanaman transgenik T₀ terhadap inokulasi PStV. Tanaman transgenik T₀ tersebut setelah diuji keberadaan gen terinsersinya dengan teknik PCR kemudian dievaluasi ketahanannya terhadap PStV. Hasil pengujian menunjukkan bahwa semua tipe konstruksi gen cp-PStV dapat menghasilkan tanaman transgenik yang tahan terhadap PStV. Respons fenotipe dari tanaman *N. benthamiana* transgenik generasi T₀ yang mengandung pBINRCP1, 35,7% tahan PStV, 0% mengalami penyembuhan, dan rentan terhadap PStV sebanyak 64,3%. Tanaman transgenik yang mengandung pBINRCP2, 41,7% tahan PStV, 0% mengalami penyembuhan,

dan rentan terhadap PStV sebanyak 58,3%. Tanaman transgenik yang mengandung pBINRCP3, 71,4% tahan PStV, 0% mengalami penyembuhan, dan rentan terhadap PStV sebanyak 28,6%. Tanaman transgenik yang mengandung pBINRCP4, 25,0% tahan PStV, 25,0% mengalami penyembuhan, dan rentan terhadap PStV sebanyak 50,0%.

Kata Kunci: *N. benthamiana*, *cp*-PStV, Resistensi

PENGANTAR

Virus bilur kacang tanah yang disebabkan *Peanut stripe virus* (PStV) merupakan virus yang paling dominan, tersebar di pusat-pusat produksi kacang tanah di Indonesia serta menimbulkan kerugian yang sangat besar. Virus ini juga dilaporkan menimbulkan kerugian paling besar di pusat-pusat produksi kacang tanah di seluruh dunia (Dietzgen *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 1995). Diperkirakan PStV sudah menyebar di seluruh pertanaman kacang tanah di Indonesia (Middleton & Saleh, 1988) dan serangannya sering mencapai 100% dengan daerah sebaran yang sangat luas (Saleh & Baliadi, 1992). Berdasarkan hasil-hasil penelitian yang telah dilakukan, PStV dapat menurunkan produksi hingga 30-60% (Indonesia), 23% (RRC), dan 67% (Filipina) (Natural *et al.*, 1989; Xu *et al.*, 1990; Saleh & Baliadi, 1992; Sudarsono *et al.*, 1997).

Dengan adanya permasalahan di atas perlu dilakukan pencegahan kehilangan hasil akibat serangan PStV tersebut, misalnya dengan menanam tanaman yang tahan virus. Secara umum terdapat dua cara untuk memperoleh tanaman yang tahan terhadap virus, pertama yaitu dengan teknik pemuliaan konvensional dengan cara menyilangkan dua galur tetua yang dipilih lainnya. Cara kedua adalah dengan teknik rekayasa genetika (Grumet, 1990; Sudarsono, 1993).

Walaupun gen ketahanan terhadap PStV dapat ditemukan pada spesies liar, pemuliaan konvensional sangat sulit dilakukan disebabkan adanya halangan inkompatibilitas seksual terhadap varietas komersial. Salah satu

alternatif yang cukup menjanjikan untuk memperoleh tanaman yang tahan terhadap PStV adalah dengan cara yang kedua yaitu dengan memanfaatkan teknik-teknik rekayasa genetika. Rekayasa genetika telah terbukti dapat menjadi alternatif untuk memperoleh tanaman yang tahan terhadap serangan virus (Hull, 1990; Gonsalves & Slightom, 1993).

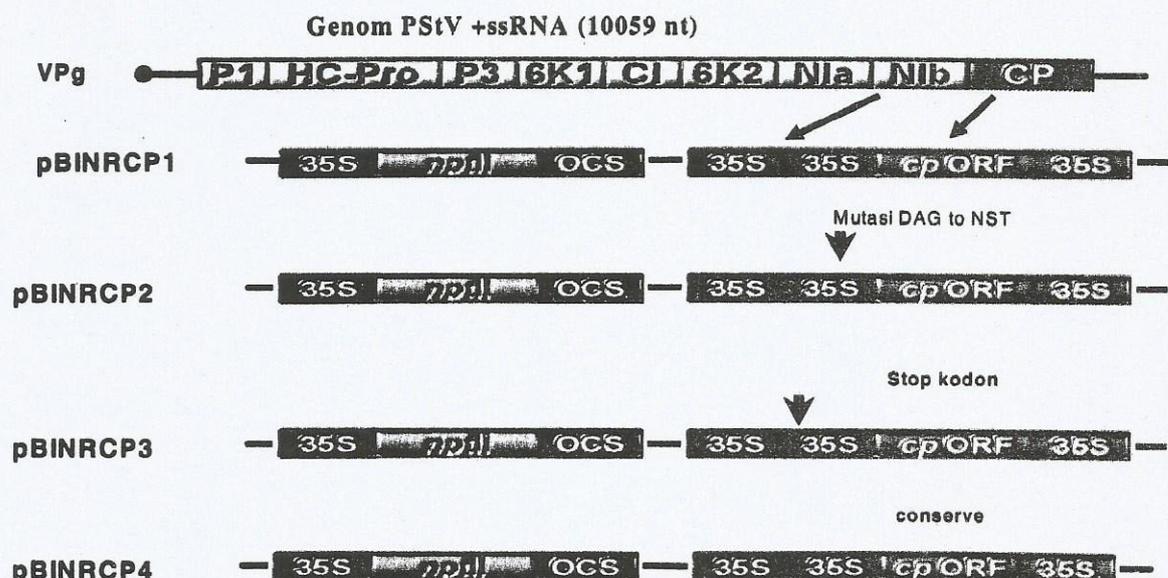
Salah satu alternatif untuk memperoleh tanaman tahan virus dengan teknik rekayasa genetika adalah menggunakan gen *coat protein* (*cp*) dari virus itu sendiri. Hasil penelitian para ahli menunjukkan bahwa ketahanan tanaman transgenik *cp* mempunyai spektrum yang luas, dalam arti dapat memberikan sifat ketahanan terhadap virus itu sendiri juga pada beberapa virus yang masih tergolong dalam satu kelompok/genus dibandingkan dengan sekuen satelit atau antisens RNA (Gonsalves & Slightom, 1993; Kaniewski & Lawson, 1998; Hammond, 1998; Frank *et al.*, 1999). Luasnya spektrum ketahanan tanaman transgenik tersebut berkorelasi dengan tingkat kesamaan antara sekuen asam amino yang diekspresikan dengan sekuen asam amino *coat protein* virus yang menginfeksi (Beachy, 1990). Sampai saat ini gen *cp* lebih dipilih dibandingkan gen-gen lain.

Permasalahannya adalah untuk mempelajari rekayasa genetika pada kacang tanah diperlukan tiga persyaratan penting. Pertama, harus telah ditemukan teknik kultur jaringan yang efisien dan efektif. Kedua, harus ditemukan gen ketahanan yang efektif melindungi tanaman transgenik dari infeksi PStV. Ketiga, gen yang telah terintroduksi harus dapat diekspresikan.

Untuk menguji keefektifan gen dalam menimbulkan reaksi ketahanan tanaman terhadap virus pada umumnya para ahli menggunakan tanaman model. Tanaman model diperlukan karena biasanya regenerasinya jauh lebih cepat dan lebih mudah dimodifikasi genomnya. Dalam penelitian ini digunakan *N. benthamiana* sebagai tanaman model. Gen *cp* yang akan diuji efektifitasnya dalam memproteksi tanaman terhadap serangan PStV dikonstruksi dalam empat tipe. Gen tersebut diperoleh dari *Queensland Agricultural Biotechnology Center (QABC), The University of Queensland, QLD, Australia*. Keempat tipe gen tersebut adalah sebagai berikut (Gambar 1): (i) konstruksi pBINRCP1, dapat mengakumulasi *coat protein* seperti yang dihasilkan secara alami oleh PStV; (ii) konstruksi pBINRCP2, seperti pBINRCP1 tetapi telah dimodifikasi sekuen asam amino DAG-nya menjadi sekuen asam amino NST. Dalam *coat protein* alami sekuen asam amino DAG ini (sering disebut dengan DAG Box) berperan dalam perpindahan penyebaran PStV oleh kutu daun; (iii) konstruksi pBINRCP3,

dapat mengekspresikan mRNA dari gen *cp* tetapi tidak dapat ditranslasikan menjadi *coat protein* akibat adanya beberapa *stop codon* internal yang ditambahkan pada awal *open reading frame (ORF)* dari gen *cp*-nya; dan (iv) konstruksi pBINRCP4, mengekspresikan *coat protein* dengan ukuran yang lebih kecil dari *coat protein* alami akibat sebagian dari nukleotida pada ORF-nya telah dibuang. Pada bagian ORF ini telah dibuang sebanyak 156 nukleotida yang mengakibatkan terdesainya 56 asam amino dari *coat protein* normal. *Open reading frame* yang terbentuk diharapkan hanya akan mengekspresikan bagian gen *cp* yang terkonservasi diantara gen *cp* dari berbagai virus yang termasuk anggota genus *potyvirus*.

Keempat konstruksi tersebut di atas diintroduksi ke dalam genom tanaman model *N. benthamiana* dengan bantuan *Agrobacterium* untuk diuji efektifitasnya dalam melindungi tanaman transgenik dari infeksi PStV.



Gambar 1. Representasi skematik dari genom +ssRNA PStV dan empat tipe konstruksi gen *cp*-PStV yang digunakan dalam percobaan.

BAHAN DAN METODE

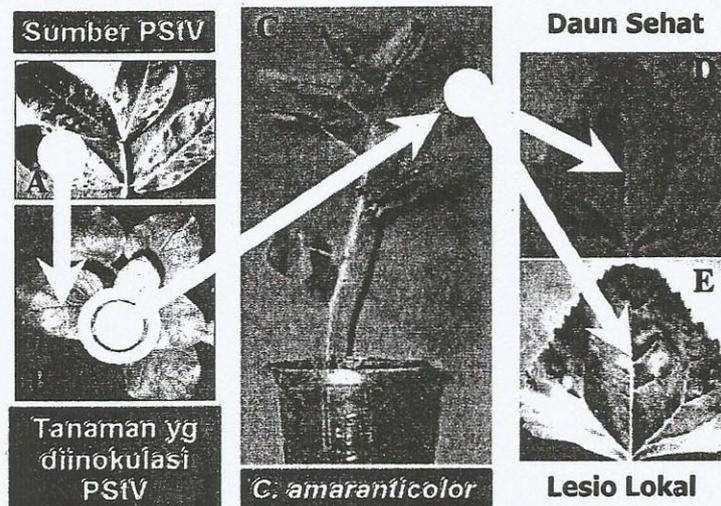
Transformasi, Regenerasi Tanaman Transgenik Model *N. benthamiana*. Metode regenerasi tanaman transgenik model dilakukan dengan cara standar seperti yang telah dilakukan oleh Newton (1997) sebagai berikut: eksplan potongan daun (0.5x0.5 cm²) diinfeksi *Agrobacterium* dengan cara merendam dalam suspensi bakteri dan dikocok pada kecepatan 100 rpm selama 10 menit pada suhu ruang. Setelah diinfeksi selanjutnya dikultivasi dengan cara menanam dalam media regenerasi (media MR), yang tidak mengandung antibiotik. Media MR yang digunakan tersusun dari media MS, gula (30 g/l), BAP (0.5 mg/l). Kokultivasi eksplan-bakteri dilakukan selama satu hari. Eksplan ditanam dalam media MR, dengan penambahan antibiotik cefotaxim (300 mg/l) selama 5 hari, selanjutnya dipindah ke media MR yang mengandung cefotaxim (300 mg/l) dan kanamycin (100 mg/l). Subkultur dilakukan setiap dua minggu. Tunas transgenik yang didapat selanjutnya ditanam dalam media pengakaran (media MP) dengan kanamycin (50 mg/l), sehingga terbentuk tanaman lengkap. Media MP tersusun dari media MS, gula (30 mg/l), dan agar (6 mg/l). Setelah berakar 3-5 helai tanaman siap dipindahkan ke media *greenleaf*. Dalam kondisi tersebut tanaman diletakkan di ruang kultur selama 2-3 minggu. Setelah tunas baru kelihatan tumbuh tanaman kemudian dipindahkan ke ruang kedap serangga di bawah naungan selama 2-3 minggu, kemudian tanaman dipindahkan ke rumah kaca.

Uji Integrasi Gen *cp* dengan PCR. Deteksi gen *cp* dalam genom tanaman dilakukan dengan PCR seperti yang dilakukan oleh Thomson & Dietzgen (1995), tetapi menggunakan primer dengan sekuen sebagai berikut: PST1: 5'-GCATGCC CTCGCCATTGCAA-3' dan PST2: 5'-GCACACACTTCTTGGCATGG-3'. Produk yang dihasilkan oleh primer PST1 dan PST2 berukuran 234 bp. Kondisi amplifikasi

yang digunakan adalah 94 °C selama 3 menit, 35 siklus dari 94 °C selama 45 detik, 55 °C selama 45 detik, dan 72 °C selama 90 detik. Kemudian dilanjutkan pada 72 °C satu kali selama 10 menit. Kondisi terakhir reaksi berada pada suhu 4°C sampai di-*running* pada gel *electrophoresis* (0.8% gel agarose/1 x TAE).

Asal Isolat PStV. Isolat PStV yang digunakan diisolasi dari kacang tanah kultivar Kelinci yang terserang PStV di kebun percobaan Sawah Baru, Dramaga, IPB. Isolat ini dipelihara dengan cara menginokulasikan ke tanaman kacang tanah kultivar kelinci yang berumur 7-10 hari setelah tanam. Isolat tersebut kemudian dimurnikan dari PeMoV, CMMV, dan TSWV (Mat Akin, 1998). Isolat murni tersebut diinokulasikan pada tanaman kacang tanah kultivar Kelinci. Tanaman yang menunjukkan gejala serangan selanjutnya dipakai sebagai sumber inokulum untuk menginokulasi tanaman transgenik. Isolat ini menunjukkan gejala stripes pada daun kacang tanah muda dan belang-belang pada daun yang telah dewasa.

Pengujian Ketahanan Tanaman Transgenik T_0 Terhadap PStV. Tanaman transgenik T_0 dipangkas hingga tumbuh tunas baru. Kemudian tunas tersebut diinokulasi secara mekanik dengan PStV dua kali yaitu pada 4 dan 5 minggu setelah tanam (MST). Pengamatan dilakukan pada 7-14 hari setelah inokulasi. Tanaman dikelompokkan ke dalam tanaman bergejala dan tidak bergejala. Seluruh tanaman kemudian diuji secara biologis menggunakan tanaman indikator *Chenopodium amaranticolor*. Uji biologis dilakukan pada 6 dan 8 MST. Hasil uji biologis pada 8 MST disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Uji biologis *N. benthamiana* transgenik pada *Ch. amaranticolor*. A. Sumber inokulum PSTV; B. *N. benthamiana* transgenik yang diinokulasi PSTV dari lapangan; C. Inokulasi pada *Ch. amaranticolor* dengan sumber inokulum pucuk daun *N. benthamiana* sakit; D. *N. benthamiana* transgenik tahan PSTV (daun *C. amaranticolor* tidak bergejala); E. *N. benthamiana* transgenik rentan PSTV (daun *Ch. amaranticolor* bergejala lesiolokal).

Jika inokulum tanaman transgenik dapat menimbulkan gejala lesio lokal pada *Ch. amaranticolor* baik pada inokulasi pertama dan kedua, maka tanaman transgenik tersebut dikelompokkan kedalam tanaman yang rentan. Jika inokulasi tanaman transgenik menunjukkan gejala lesio lokal pada *Ch. amaranticolor* hanya pada inokulasi pertama dan tidak bergejala pada inokulasi kedua, maka tanaman transgeniknya dikelompokkan kedalam tanaman yang mengalami penyembuhan. Sedangkan jika inokulasi tanaman tidak menimbulkan gejala baik pada inokulasi pertama maupun kedua, maka tanaman transgeniknya dikelompokkan sebagai tanaman yang tahan terhadap infeksi PSTV.

Inokulasi balik tanaman uji yang telah diinokulasi PSTV ke tanaman indikator *Ch. amaranticolor* sangat penting dilakukan untuk memastikan apakah tanaman transgenik yang diuji benar-benar tahan terhadap infeksi PSTV. Hal ini perlu dilakukan oleh karena gejala *mild mosaic*

sering ditemui pada tanaman transgenik dan non transgenik yang tidak diinokulasi (penyebabnya belum diketahui dengan pasti). Fenomena yang sama, terjadi juga pada penelitian tanaman transgenik *cp PMTV N. benthamiana* yang diinokulasi dengan PMTV (Barker *et al.*, 1998).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Transformasi, Regenerasi, dan Aklimatisasi Tanaman Transgenik. Sistem transformasi dan regenerasi dalam percobaan ini diperoleh tanaman transgenik yang tumbuh dan berkembang hingga menghasilkan biji di rumah kaca dengan tingkat keberhasilan 52% (Tabel 1).

Tabel 1 Jumlah eksplan yang hidup pada setiap tahapan aklimatisasi

| Seri Percobaan | Eksplan awal | Eksplan berakar sempurna | Eksplan hidup di media greenleaf | Eksplan hidup di ruang kedap serangga | Eksplan hidup di rumah kaca |
|----------------|--------------|--------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|
| 1 | 15 | 12 | 8 | 7 | 4 |
| 2 | 23 | 19 | 18 | 18 | 9 |
| 3 | 20 | 18 | 17 | 17 | 11 |
| 4 | 25 | 20 | 16 | 14 | 9 |
| 5 | 37 | 35 | 31 | 30 | 25 |
| 6 | 30 | 27 | 25 | 21 | 20 |
| Jumlah | 150 | 131 | 115 | 107 | 78 |
| Persentase | 100 | 87,33 | 76,67 | 71,33 | 52,00 |

Tahapan aklimatisasi dan waktu yang diperlukan adalah sebagai berikut: A. tunas tanaman dipilih yang sehat dengan diameter batang > 1mm dan minimal mempunyai 3 ruas. Tunas terpilih ditanam di media MP. Akar akan muncul sekitar 2-4 minggu setelah tanam (MST); B. setelah tanaman memiliki minimal 5 helai akar sempurna, tanaman dipindahkan ke media *greenleaf* dengan diberi tudung gelas. Pada tahapan ini tanaman beserta medianya diletakkan di ruang kutur selama 2-4 MST atau sampai muncul tunas baru; C. Tanaman diletakkan di ruang kedap serangga di bawah naungan (tidak terkena cahaya matahari langsung). Tudung gelas dibuka setelah 2 minggu. Dua sampai tiga minggu setelah itu yaitu pada saat telah muncul tunas baru dan pertumbuhan ujung akar telah tampak menyebar di sekitar gelas media, tanaman siap dipindah ke media tanah dalam polibeg ukuran 20 x 25 cm; D. Tanaman diinkubasikan di rumah kaca. Jika tanaman tumbuh baik tanaman akan berbunga 3-4 minggu kemudian. Waktu yang diperlukan mulai dari eksplan dalam media perakaran sampai dihasilkan biji sekitar 9-14 minggu.

Pada tahapan aklimatisasi tanaman transgenik (saat pemindahan dari ruang kultur ke ruang kedap serangga), berdasarkan hasil pengamatan, semakin besar diameter batang tanaman yang akan diaklimatisasi semakin

besar pula kemungkinan tanaman dapat tumbuh sehat di rumah kaca. Tahapan tersebut merupakan tahapan paling kritis. Kematian eksplan dapat mencapai hingga 50%, terutama jika eksplan tidak benar-benar dalam kondisi sehat. Data-data persentase jumlah eksplan yang mampu hidup dalam setiap tahapan aklimatisasi disajikan pada Tabel 1.

Uji Integrasi Gen cp. Hasil PCR terhadap sampel daun tanaman transgenik dari sebagian populasi T₀ menggunakan primer PST1 dan PST2 disajikan pada Tabel 2. Untuk lebih jelasnya hasil pengujian dengan teknik PCR dapat dilihat pada Gambar 3.

Dari hasil PCR dan Tabel 2 tersebut diperoleh klon tanaman yang positif mengandung gen *cp* tetapi tidak memiliki sifat ketahanan terhadap PStV seperti klon 1-CP3-2, 3-CP3-2, 8-CP2-A1 dan 9-CP3-2. Fenomena demikian menarik untuk didiskusikan. Terdapat beberapa kemungkinan yang dapat menjelaskan hal tersebut misalnya (1) terjadi mutasi pada satu basa pada titik awal transkripsi, sehingga enzim polimerase tak dapat mengawali proses transkripsi, akibatnya mRNA tidak dapat terbentuk, (2) terjadi mutasi pada faktor sigma sehingga faktor sigma ini tidak mampu membawa enzim polimerase mengenali promotor, akibatnya mRNA juga tidak dapat terbentuk, (3) mRNA transgen mengalami

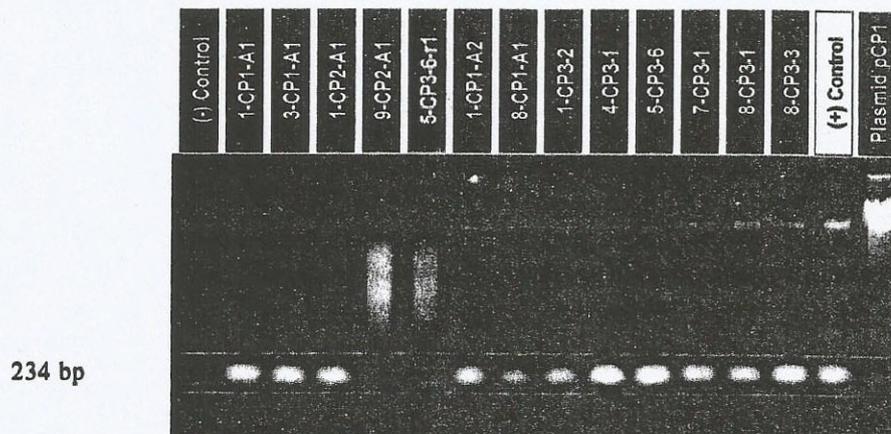
proses *silencing* (Al-Kaff *et al.*, 1998; Anandalakshmi *et al.*, 1998; Ange & Baulcombe, 1997; Atkinson *et al.*, 1998;

Brigneti *et al.*, 1998) dan masih banyak lagi kemungkinan yang lain.

Tabel 2. Hasil uji PCR pada generasi T₀ dan Fenotipe T₀

| Galur T ₀ | Fenotipe T ₀ | PCR T ₀ |
|----------------------|-------------------------|--------------------|
| 1-CP1-A1 | T | + |
| 1-CP1-A2 | T | + |
| 3-CP1-A1 | T | + |
| 8-CP1-A1 | T | + |
| 1-CP2-A1 | T | + |
| 1-CP2-A2 | T | +* |
| 8-CP2-A1 | R | +* |
| 9-CP2-A1 | T | - |
| 1-CP3-2 | R | + |
| 3-CP3-2 | R | +* |
| 4-CP3-1 | T | + |
| 5-CP3-6 | T | + |
| 5-CP3-6-r1 | R | - |
| 7-CP3-1 | T | + |
| 8-CP3-1 | T | + |
| 8-CP3-3 | T | + |
| 9-CP3-2 | R | +* |
| Kontrol (+) | R | + |
| Kontrol (-) | tidak diuji | - |

Keterangan: T = Tahan, R = Rentan; T₀=tanaman transgenik generasi T₀ yang diuji; + = ada *band*, mengindikasikan gen *cp*-PStV terintegrasi pada genom tanaman yang diuji; - = tidak ada *band*, mengindikasikan gen *cp*-PStV tidak terintegrasi pada genom tanaman yang diuji; * = gambar tidak disajikan pada naskah.



Gambar 3. Hasil PCR dari sampel daun *N. benthamiana* transgenik; lajur 1: kontrol negatif (*N. benthamiana* non transforman); Lajur 2 sd 14 galur tanaman T₀; Lajur 15: kontrol positif (*Agrobacterium*::pBINRCP1); Lajur 16: DNA murni plasmid pBINRCP1.

Tabel 3. Respon tanaman *N. benthamiana* transgenik T_0 setelah diinokulasi PStV

| Tipe gen | Jumlah Tanaman | Respons fenotipe terhadap PStV | | | | | |
|----------|----------------|--------------------------------|------|-------------|------|--------|------|
| | | Tahan | % | Penyembuhan | % | Rentan | % |
| pBINRCP1 | 14 | 5 | 35.7 | 0 | 0 | 9 | 64.3 |
| pBINRCP2 | 12 | 5 | 41.7 | 0 | 0 | 7 | 58.3 |
| pBINRCP3 | 28 | 20 | 71.4 | 0 | 0 | 8 | 28.6 |
| pBINRCP4 | 16 | 4 | 25.0 | 4 | 25.0 | 8 | 50.0 |
| Kontrol | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 100 |

Pengujian Ketahanan Tanaman Transgenik T_0 Terhadap PStV. Rincian ketahanan masing-masing klon T_0 yang diperoleh setelah diinokulasi dengan PStV dan setelah diuji kembali ke *Ch. amaranticolor* untuk setiap konstruksi gen *cp* disajikan pada Tabel 3.

Tanaman transgenik T_0 yang diuji dikelompokkan menjadi tanaman yang tahan, mengalami penyembuhan (*recovery*) dan rentan PStV. Dari 70 tanaman yang diuji masing-masing sebagai berikut: 34 tanaman transgenik tahan, 4 tanaman transgenik mengalami penyembuhan dan 32 rentan PStV (Tabel 3).

Semua konstruksi gen dapat memberikan ketahanan terhadap PStV secara efektif, karena dari keempat konstruksi tersebut dapat diperoleh tanaman yang tahan terhadap PStV (Tabel 3). Dari keempat tipe tersebut yang mana paling efektif cukup menarik untuk didiskusikan. Jika tanaman yang tahan dan mengalami penyembuhan dijumlahkan, persentase tertinggi diperoleh dari tanaman yang mengandung konstruksi pBINRCP3 dengan nilai 71.4%, diikuti oleh pBINRCP4 50%, pBINRCP2 41.7% dan pBINRCP1 35.7%. Jadi dapat disimpulkan pada generasi T_0 tipe gen pBINRCP3 adalah tipe gen yang paling efektif. Pemilihan konstruksi pBINRCP3 ini menjadi tipe yang paling efektif perlu dipertimbangan lagi apakah pada turunan berikutnya juga menunjukkan respons yang sama.

Hal yang cukup menarik untuk didiskusikan adalah bahwa semua konstruksi

gen dapat memberikan ketahanan terhadap PStV. Oleh karena konstruksi pBINRCP3 diduga kuat hanya dapat menghasilkan mRNA saja, tidak menghasilkan coat protein, maka dapat diduga bahwa mRNA saja sudah cukup dapat memberikan ketahanan terhadap PStV.

Perlu diingat bahwa konstruksi pBINRCP3 dibuat dengan cara menambahkan beberapa stop kodon internal pada awal *open reading frame* (ORF) dari gen *cp*-nya dengan harapan *coat protein* tidak terbentuk.

Namun demikian hal ini masih perlu data-data hasil uji ELISA untuk memastikan diproduksi atau tidaknya *coat protein* pada tanaman transgenik pBINRCP3 dan juga diperlukan data hasil uji *oligo dt coloum* atau *run on RNA transcription assay* untuk memastikan bahwa mRNA/hnRNA transgen diproduksi atau tidak.

Hal lain yang menarik adalah persentase ketahanan tanaman transgenik pBINRCP3 mencapai nilai tertinggi dibandingkan dengan konstruksi lain (pBINRCP1, pBINRCP2, dan pBINRCP4). Hal ini mengindikasikan mRNA bebas (mRNA yang tidak ditranslasikan menjadi coat protein) dapat memberikan ketahanan yang lebih efektif dibandingkan mRNA yang mengalami translasi.

Apabila fakta di atas dihubungkan dengan mekanisme ketahanan terhadap virus terlihat ada kaitan yang cukup erat. Mekanisme ketahanan terhadap virus menurut beberapa peneliti (Beachy, 1990; Al-Kaff *et al.*, 1998; Anandalakshmi *et al.*, 1998)

diakibatkan oleh aktifnya proses degradasi mRNA pada sel tanaman transgenik. Dengan aktifnya proses degradasi ini, mRNA virus yang menyerang sel tanaman juga ikut terdegradasi sehingga virus tidak dapat menggandakan dirinya dan tanaman transgeniknya menjadi tahan virus.

Hasil penelitian lain menunjukkan bahwa mRNA yang mengalami proses translasi akan lebih stabil terhadap proses degradasi dibandingkan mRNA yang tidak mengalami proses translasi menjadi protein

(Ange & Baulcombe, 1997; Atkinson *et al.*, 1998; Brigneti *et al.*, 1998). Oleh sebab itu ada kemungkinan bahwa tanaman pBINRCP yang mRNA CP3-nya tidak ditranslasikan akan mengalami proses degradasi mRNA lebih tinggi dibanding konstruksi lain sehingga menghasilkan lebih banyak tanaman-tanaman transgenik yang tahan PStV. Tetapi untuk verifikasi lebih lanjut diperlukan uji molekuler.

Untuk mengetahui mekanisme ketahanan tanaman transgenik yang timbul disebabkan karena terjadinya degradasi mRNA

Tabel 4. Teknik pengujian degradasi mRNA-transportasi PStV

| No. uji | Sumber inokulum <i>N. benthamiana</i> transgenik | Inokulasi pada <i>Ch. amaranti color</i> | Hasil pengamatan pada <i>Ch. amaranti color</i> | Simpulan uji pertama | Simpulan uji kedua |
|---------|---|--|---|--|---|
| 1 | Daun dewasa T ₀ yang sudah diinokulasi PStV dua kali | ya | + | Tidak terjadi degradasi mRNA transgen pada daun T ₀ | Lanjutkan ke uji no. 2 |
| | | ya | - | Terjadi degradasi mRNA transgen pada daun T ₀ | Tanaman tahan PStV, ketahanan karena mekanisme degradasi mRNA transgen pada daun T ₀ yang diinokulasi PStV |
| 2 | Pucuk daun muda T ₀ yang muncul sesudah inokulasi PStV dua kali pada daun dewasa | ya | + | Terjadi transportasi PStV hingga pucuk daun T ₀ | Tanaman rentan PStV |
| | | ya | - | Tidak terjadi transportasi mRNA hingga pucuk daun T ₀ | Tanaman tahan PStV, ketahanan karena mekanisme virus tidak ditransport hingga ke pucuk daun |

Keterangan: ya = dilakukan inokulasi; + = ada gejala lesio lokal; - = tidak ada gejala lesio lokal

dalam sel atau disebabkan karena virus tidak dapat ditransportasikan ke seluruh jaringan tanaman diperlukan pengujian biologis menggunakan *Ch. amaranticolor* (tidak dilakukan pada penelitian ini).

Percobaan dapat dilakukan sebagai berikut: (1) ambil dua daun dari tanaman transgenik sebagai sumber inokulum untuk diinokulasikan pada *Ch. amaranticolor*. Pertama, sumber inokulum A diambil dari sebagian daun yang telah diinokulasi PStV dan sumber inokulum B diambil dari pucuk daun yang baru bersemi setelah proses inokulasi; (2) kedua sumber inokulum tersebut diinokulasikan pada *Ch. amaranticolor*; (3) pengamatan gejala pada *Ch. amaranticolor* dilakukan beberapa hari sesudah inokulasi; (4) untuk sumber inokulum A, jika gejala pada daun *Ch. amaranticolor* menunjukkan hasil negatif (menunjukkan tidak terdapat penyebaran virus pada daun A) berarti ketahanan kemungkinan besar disebabkan oleh mekanisme degradasi mRNA sejak pada daun A. Tetapi jika hasil uji pada daun A positif, sedangkan hasil uji pada daun B negatif berarti ketahanan kemungkinan besar disebabkan oleh tidak terjadinya transportasi virus ke pucuk daun tanaman. Agar lebih runut dan jelas, teknik pengujian ini disajikan pada Tabel 4.

KESIMPULAN

1. Penelitian ini dapat menghasilkan tanaman transgenik T₀ yang mengandung ke-empat tipe konstruksi gen cp-PStV yang seluruhnya efektif dapat menimbulkan reaksi ketahanan terhadap inokulasi PStV.
2. Respon ketahanan tanaman *N. benthamiana* transgenik generasi T₀ tersebut dapat dikelompokkan sebagai berikut. Tanaman transgenik yang mengandung pBINRCP1 yang tahan terhadap inokulasi PStV sebanyak 35.7%, mengalami penyembuhan sebanyak 0%, dan rentan terhadap PStV sebanyak

64.3%. Tanaman transgenik yang mengandung pBINRCP2 yang tahan terhadap inokulasi PStV sebanyak 41.7%, mengalami penyembuhan sebanyak 0%, dan rentan terhadap PStV sebanyak 58.3%. Tanaman transgenik yang mengandung pBINRCP3 yang tahan terhadap inokulasi PStV sebanyak 71.4%, mengalami penyembuhan sebanyak 0%, dan rentan terhadap PStV sebanyak 28.6%. Tanaman transgenik yang mengandung pBINRCP4 yang tahan terhadap inokulasi PStV sebanyak 25.0%, mengalami penyembuhan sebanyak 25.0%, dan rentan terhadap PStV sebanyak 50.0%.

UNGKAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih diucapkan kepada pembimbing: Prof Dr Surkati Abidin, Prof Dr Rusmilah Suseno, Dr. Sudarsono, Dr. Hajrial Aswidinnoor, dan Dr. Satriyas Ilyas. Terimakasih diucapkan kepada lembaga pemberi dana untuk penelitian ini: Merit scholarship program batch IV, URGE Project, MOEC, Indonesia (cq. Sholeh Avivi); RUT VII, Ministry of research and technology, Indonesia (cq. Dr. Sudarsono).

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Kaff, N.S., S.N. Covey, M.M. Kreike, A.M. Page, R. Pinder, & P.J. Dale. 1998. Transcriptional and Post-Transcriptional Plant Gene Silencing in Response to a Pathogen. *Science*, 279:2113-2115.
- Anandalakshmi, R., G.J. Pruss, X. Ge, R. Marathe, T.H. Smith, & V.B. Vance. 1998. A Viral Suppressor of Gene Silencing in Plant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95:13079-13084.
- Ange, S.M. & D.C. Baulcombe. 1997. Consistent Gene Silencing in Transgenic Plants Expressing a Replicating Potato Virus X RNA. *EMBO J*. 16:3675-3684.

- Atkinson, R.G., L.R.F. Bielecki, A.P. Gleave, B.J. Janssen, & B.A.M. Morris. 1998. Post-Transcriptional Silencing of Chalcone Synthase in *Petunia* Using a Geminivirus-Based Episoma Vector. *Plant J.* 15:593-604.
- Barker, H., B. Reavy, D. Kara, McGeachy, & S. Dawson. 1998. Transformation of *Nicotiana bethamiana* With the Potato Mop-Top Virus Coat Protein. *MPMI.* 11(7):626-633.
- Beachy, R.N. 1990. Coat Protein Mediated Resistance in Transgenic Plants. p 13-22, In T.P. Pirone & J.G. shaw (eds). *Viral Genes and Plant Pathogenesis.* Springer-Verlag. New York. 215p.
- Brigneti, G., O. Voinnet, L. Wan-Xiang, J. Liang-Hui, S.W. Ding, & D.C. Baulcombe. 1998. Viral Pathogenicity Determinant are Suppressors of Transgene Silencing in *Nicotiana bethamiana*. *EMBO J.* 17:6739-6746.
- Dietzgen, R.G., Z. Xu, & P.Y. Teycheney. 1994. Digoxigenin-Labeled c-RNA Probes for the Detection of Two Potyviruses Infecting Peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Disease* 78(7):708-711.
- Frank G.F., A. Stuart, MacFarlane, & D.C. Baulcombe. 1999. Gene Silencing Without DNA: RNA-Mediated Cross-Protection between Viruses. *The Plant Cell.* 11:1207-1215.
- Gonsalves, D. & J.L. Slightom. 1993. Coat Protein-Mediated Protection: Analyses of Transgenic Plants for Resistance in a Variety of Crops. *Sem. Virology.* 4:397-406.
- Grumet, R. 1990. Genetically Engineered Plant Virus Resistance. *Hort. Science.* 25(5):508-513.
- Hammond, J. 1998. Resistance to Plant Viruses—an Overview. p163-171. In A. Hadidi, R.K. Khetarpal, & H. Koganezawa (eds.) *Plant Virus Disease Control.* APS Press. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota.
- Hull, R. 1990. Non-Conventional Resistance to Viruses in Plants Concepts and Risk. P289-303. In J.P. Gustafson (ed.). *Gene Manipulation in Plant Improvement II.* Penum Press, New York.
- Kaniewski, W. & C. Lawson. 1998. Coat Protein and Replicase-Mediated Resistance to Plant Viruses. In A. Hadidi, R.K. Khetarpal, & H. Koganezawa (eds.) *Plant Virus Disease Control.* APS Press. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota.
- Mat Akin, H. 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. Program Pascasarjana.* IPB. Bogor.
- Middleton, K.J. & N. Saleh. 1988. Peanut Stripe Disease in Indonesia and the Aciar Project. Summary Proceedings of the First Coordinators' Meeting on Peanut Stripe Virus. *ICRISAT, India:*4-6.
- Natural, M.P., F.L. Mangaban, & L.D. Valencia. 1989. Groundnut Research in the Philippines. Second Coordinators Meeting on Peanut Stripe Virus (PStV). *Agrikam.* 5(2):71-83.
- Newton, T.R. 1997. Agrobacterium Mediated Transformation of Peanut. *Honours Thesis.* The University of Queensland.

Saleh, N. & Y. Baliadi. 1992. *Penyakit Virus Bilur Kacang Tanah (Peanut stripe virus) dan Usaha Pengendaliannya*. Balai Penelitian Tanaman Pangan. Malang. 22p.

Sudarsono, 1993. *Transgenic Burley and Flue-Cured Tobacco with Resistance to Various Isolates of Potato Virus Y (PVY)*. NC State University, Raleigh, NC, USA.

Sudarsono, S. Tumbelaka, & S. Ilyas. 1997. Penurunan Hasil Akibat *Peanut stripe virus* dan Penularan Virus Lewat Benih pada Kacang Tanah. *Hayati*: 55-58.

Thomson, D. & R.G. Dietzgen. 1995. Detection of DNA and RNA Plant Viruses by PCR and RT-PCR Using a Rapid Virus Release Protocol without Tissue Homogenization. *J. Virological Methods* 54:85-95.

Xu, Z., C. Kunrong, Z. Zongyi, C. Jinxiang, & K.J. Middleton. 1990. Research on Peanut Stripe Virus in China. 6p. (Unpublished).

Xu, Z., Z. Zhang, K. Chen, J. Chen, & D.V.R. Reddy. 1995. Current Research on Groundnut Virus Diseases in China. *In the Proceedings of the Groundnut Virus Diseases in Asia-Pacific Region working Group Meeting in Thailand in March*. Thailand.