

ABSTRAK

ATMITRI SISHARMINI. Introduksi gen *CP-SPFMV* ke dalam genom tanaman ubijalar melalui vektor *Agrobacterium tumefaciens*. Dibimbing oleh G.A. WATTIMENA dan M. HERMAN

Penyakit *Sweet Potato Feathery Mottle Virus* (SPFMV) merupakan penyakit virus utama yang menyerang pertanaman ubijalar. Perakitan varietas tahan melalui program pemuliaan sering menghadapi kendala dengan belum tersedianya sumber gen ketahanan dalam plasma nutfah. Rekayasa genetika melalui teknik transformasi memungkinkan untuk menyisipkan gen-gen ketahanan yang berasal dari organisme lain. Dalam penelitian ini telah dilakukan transformasi ubijalar dengan gen *CP-SPFMV* untuk ketahanan terhadap virus melalui teknik *A. tumefaciens*. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh asetosiringon (0, 100, 200 μ M) dan lama waktu inokulasi (30 dan 60 menit) terhadap ekspresi gen pelapor *gus*, mengetahui pengaruh media terhadap kemampuan regenerasi setelah transformasi dan untuk mengintroduksi gen *CP-SPFMV* ke dalam genom tanaman ubijalar. Strain bakteri yang digunakan adalah LBA4404 yang mengandung pMON10474 atau pMON10475 yang berisi gen *gus*, *nptII* dan *CP-SPFMV*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa asetosiringon 100 μ M dan waktu inokulasi 60 menit memberikan respon terbaik terhadap ekspresi gen *gus* dan kemampuan regenerasi. Media R1 yang mengandung 0,2 mg/l kinetin lebih responsif meregenerasikan kalus setelah transformasi. Dan telah diperoleh 6 tanaman ubijalar putatif transgenik varietas Jewel yang diduga mengandung gen *CP-SPFMV*. Penelitian lanjutan diperlukan untuk melihat apakah gen *CP-SPFMV* berhasil diintegrasikan dalam genom tanaman target dan dapat diekspresikan pada tingkat tanaman melalui uji molekuler dan bioasai.

ABSTRACT

ATMITRI SISHARMINI. Introduction of *CP-SPFMV* gene into sweet potato genome through *Agrobacterium tumefaciens* vector. Under the direction G.A. WATTIMENA and M. HERMAN.

Sweet potato Feathery Mottle Virus is the one of important virus disease on sweet potato. The improvement of sweet potato via conventional breeding is limited due to the lack of sources of resistant gene in the sweet potato germplasm. Genetic engineering through transformation technique offers a mean to introduce an interest gene into plant genome. Plant transformation study with *CP-SPFMV* gene for resistance to virus disease was conducted through *Agrobacterium tumefaciens*. The objectives of the study were to determine the effect of acetosyringone (0, 100, 200 μ M) and inoculation period (30 and 60 minutes) on gene *gus* expression, to determine the effect of media to regenerate transformed calli and to introduce *CP-SPFMV* gene into sweet potato genome. *Agrobacterium tumefaciens* used LBA4404 strain containing pMON10474 or pMON10475 (*gus*, *nrpIII* and *CP-SPFMV* gene). The result showed that 100 μ M of acetosyringone and 60 minutes of inoculation period gave the best response on gene *gus* expression and regeneration ability. R1 medium (MS+0,2 mg/l kinetin) was more responsive to regenerate calli after transformation than R2 (MS+0,2 mg/l 2-ip). We have obtained 6 putative transgenic plants. Further study is still needed to confirm integration of *CP-SPFMV* gene into sweet potato genome using molecular analysis and bioassay.

ABSTRACT

ATMITRI SISHARMINI. Introduction of *CP-SPFMV* gene into sweet potato genome through *Agrobacterium tumefaciens* vector. Under the direction G.A. WATTIMENA and M. HERMAN.

Sweet potato Feathery Mottle Virus is the one of important virus disease on sweet potato. The improvement of sweet potato via conventional breeding is limited due to the lack of sources of resistant gene in the sweet potato germplasm. Genetic engineering through transformation technique offers a mean to introduce an interest gene into plant genome. Plant transformation study with *CP-SPFMV* gene for resistance to virus disease was conducted through *Agrobacterium tumefaciens*. The objectives of the study were to determine the effect of acetosyringone (0, 100, 200 μ M) and inoculation period (30 and 60 minutes) on gene *gus* expression, to determine the effect of media to regenerate transformed calli and to introduce *CP-SPFMV* gene into sweet potato genome. *Agrobacterium tumefaciens* used LBA4404 strain containing pMON10474 or pMON10475 (*gus*, *nptII* and *CP-SPFMV* gene). The result showed that 100 μ M of acetosyringone and 60 minutes of inoculation period gave the best response on gene *gus* expression and regeneration ability. R1 medium (MS+0,2 mg/l kinetin) was more responsive to regenerate calli after transformation than R2 (MS+0,2 mg/l 2-ip). We have obtained 6 putative transgenic plants. Further study is still needed to confirm integration of *CP-SPFMV* gene into sweet potato genome using molecular analysis and bioassay.

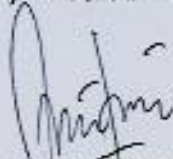
SURAT PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis yang berjudul

**INTRODUKSI GEN *CP-SPFMV* KE DALAM GENOM TANAMAN
UBIJALAR MELALUI VEKTOR *Agrobacterium tumefaciens***

Adalah benar-benar merupakan hasil karya sendiri dan belum pernah dipublikasikan.
Semua sumber data dan informasi yang digunakan telah dinyatakan secara jelas dan
dapat diperiksa kebenarannya.

Bogor, Pebruari 2003



Atmitri Sisharmini

NRP. 99633

**INTRODUKSI GEN *CP-SPFMV*
KE DALAM GENOM TANAMAN UBIJALAR
MELALUI VEKTOR *Agrobacterium tumefaciens***

ATMITRI SISHARMINI

Tesis

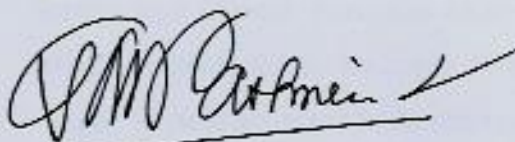
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister Sains pada
Program Studi Bioteknologi

**PROGRAM PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
2003**

Judul Tesis : **Introduksi gen CP-SPFMV ke dalam genom tanaman
ubijalar melalui vektor *Agrobacterium tumefaciens***
Nama : Atmitri Sisharmini
NRP : 99633
Program Studi : Bioteknologi

Menyetujui,

2. Komisi Pembimbing



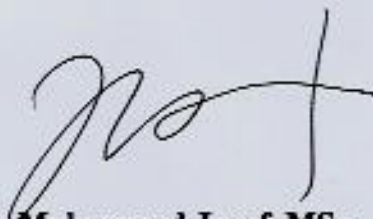
Prof. Dr. Ir. G. A. Wattimena, MSc.
Ketua



Dr. Ir. Muhammad Herman
Anggota

Mengetahui,

2. Ketua Program Studi Bioteknologi



Dr. Ir. Muhammad Jusuf, MSc.

3. Direktur Program Pascasarjana



Prof. Dr. Ir. Syafrida Manuwoto, Msc

Tanggal Lulus: 4 Pebruari 2003

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Yogyakarta pada tanggal 15 Agustus 1970 sebagai anak ketiga dari pasangan Siswojo Djojowerdojo dan Suharti. Pendidikan sarjana ditempuh di Jurusan Botani, Fakultas Biologi UGM, lulus tahun 1995. Kesempatan untuk melanjutkan studi di Program Studi Bioteknologi pada Program Pascasarjana IPB diperoleh pada tahun 1999. Beasiswa pendidikan dan dana penelitian pascasarjana diperoleh dari Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian Bogor, Departemen Pertanian Republik Indonesia.

Penulis bekerja sebagai staf peneliti di Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian sejak tahun 1996 sampai sekarang. Selama bekerja, penulis terlibat dalam berbagai program penelitian mengenai perakitan tanaman transgenik pada beberapa komoditi tanaman pangan.

Selama bekerja penulis menjadi anggota Perhimpunan Bioteknologi Pertanian Indonesia.

PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan pada Allah SWT atas segala karunia-Nya sehingga karya ilmiah ini berhasil diselesaikan. Tema yang dipilih dalam penelitian yang dilaksanakan sejak bulan Mei 2001 ini ialah transformasi tanaman, dengan judul Introduksi gen *CP-SPFMV* ke dalam genom tanaman ubijalar melalui vektor *Agrobacterium tumefaciens*.

Terima kasih penulis ucapkan kepada Bapak Prof. Dr. Ir. G.A. Wattimena dan Bapak Dr. Ir. Muhammad Herman selaku pembimbing serta Bapak Dr. Ir. Suharsono, DEA selaku dosen penguji yang telah banyak memberi saran. Di samping itu, penghargaan penulis sampaikan kepada Bapak Kepala Balai dan rekan-rekan staf peneliti serta teknisi khususnya yang tergabung dalam tim penelitian transformasi ubijalar di Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian. Ungkapan terima kasih yang sebesar-besarnya juga disampaikan kepada ayah, ibu, serta seluruh keluarga, atas segala doa dan kasih sayang. Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada Mbak Dinar, Nanas, Tri Joko, Enung, Mbak Atmi, Mbak Sri, Ika roos dan rekan-rekan lain yang tidak bisa penulis sebutkan yang telah memberi dukungan moril dan membantu dalam pelaksanaan penelitian.

Semoga karya ilmiah ini bermanfaat.

Bogor, 4 Pebruari 2003

Atmitri Sisharmini

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
PENDAHULUAN.....	1
TINJAUAN PUSTAKA	
Ubijalar dan kegunaannya	8
Penyakit virus SPFMV	9
Pengendalian penyakit virus	11
Rekayasa genetik untuk ketahanan tanaman terhadap virus	12
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	15
Gen penanda seleksi untuk transformasi	18
BAHAN DAN METODE	
Tempat dan Waktu Penelitian	21
Bahan	21
Metode Penelitian	22
Pelaksanaan Penelitian	25
HASIL DAN PEMBAHASAN	
Uji ekspresi gen pelapor <i>gus</i>	29
Seleksi dan regenerasi	33
Aklimatisasi	41
KESIMPULAN DAN SARAN	
Kesimpulan	44
Saran	44
DAFTAR PUSTAKA	45
LAMPIRAN	49

DAFTAR TABEL

	Halaman
1. Uji ekspresi gen gus dengan perlakuan konsentrasi Asetosiringon pada perbedaan hari pengamatan paska transformasi.....	29
2. Uji ekspresi gen gus dengan perlakuan lama waktu inokulasi pada perbedaan hari pengamatan paska transformasi.....	31
3. Uji ekspresi gen gus dengan perbedaan konstruksi plasmid pada perbedaan hari pengamatan paska transformasi.....	32
4. Regenerasi ubijalar yang ditransformasi dengan gen CP-SPFMV melalui vektor <i>Agrobacterium</i> dengan perbedaan konsentrasi Asetosiringon	35
5. Regenerasi ubijalar yang ditransformasi dengan gen CP-SPFMV melalui vektor <i>Agrobacterium</i> dengan perbedaan waktu inokulasi.....	36
6. Regenerasi ubijalar yang ditransformasi dengan gen CP-SPFMV melalui vektor <i>Agrobacterium</i> dengan perbedaan konstruksi plasmid...	38
7. Regenerasi ubijalar yang ditransformasi dengan gen CP-SPFMV melalui vektor <i>Agrobacterium</i> dengan perbedaan media regenerasi.....	39

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. Diagram alur percobaan	24
2. Hasil uji ekspresi gen <i>gus</i> pada petiol ubijalar	33
3. Tunas ubijalar yang tumbuh pada bagian tengah kalus	34
4. Tunas ubijalar yang tumbuh dari kalus yang lolos pada media seleksi dengan kanamisin 50 mg/l	37
5. Perkembangan tunas dan kalus 2 bulan paska transformasi	40
6. A. Tunas ubijalar transforman di media perakaran	41
B. Tanaman ubijalar transforman setelah aklimatisasi di media tanah	41
7. Kenampakan morfologi tanaman ubijalar transforman dan tanaman kontrol	42

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Peta plasmid pMON 10574	49
2. Peta plasmid pMON 10575	50
3. Komposisi media Luria Bertani (LB) cair	51
4. Komposisi media MS (Murashige & Skoog)	52

**INTRODUKSI GEN *CP-SPFMV*
KE DALAM GENOM TANAMAN UBIJALAR
MELALUI VEKTOR *Agrobacterium tumefaciens***

**OLEH
ATMITRI SISHARMINI**



**PROGRAM PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
2003**