

RESPON REGENERASI BEBERAPA GENOTIPE DAN STUDI TRANSFORMASI GENETIK TOMAT (*Lycopersicon esculentum* Mill.) MELALUI VEKTOR *Agrobacterium tumefaciens*

Response Regeneration of Some Genotypes and Genetic Transformation Study of Tomato (Lycopersicon esculentum Mill.) through Agrobacterium tumefaciens Vector.

Santoso T.J.¹, A. Sisharmini¹ dan M. Herman¹

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian
Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111
Email: bb_biogen@litbang.pertanian.go.id

ABSTRACT

The development of an effective *Agrobacterium* transformation for tomato depends on several factors including plant genotype, explant vigor, *Agrobacterium* strain, selection system and culture conditions. It has been reported that tomato genotype contributed to success of transformation and regenerability in tissue culture. The purpose of this experiment was to study of regeneration response of four tomato genotypes and genetic transformation of tomato through *Agrobacterium tumefaciens* vector. The experiment of tomato genotype regeneration study was conducted at Biotechnology Laboratory, Asian Vegetables Research and Development Center (AVRDC), Taiwan, meanwhile the experiment of tomato genetic transformation study was conducted at Molecular Biology Laboratory, Indonesian Center for Agricultural Biotechnology and Genetic Resources Research and Development (ICABIOGRAD), Bogor. Three of well-adapted genotypes in Indonesia i.e. Intan, Gondol Hijau and CLN6046 were used as regeneration response experimental materials. AVRDC's genotype, CLN1559A, was used as a control genotype in *in-vitro* culture. The result of experiment showed that there was variation response on the ability of explant to regenerate and form the shoot among the four genotypes. The control genotype, CLN1559, was the most regenerable genotype that indicated by the highest number of regenerated explants and shoots per explants (90,56% and 0,66), followed respectively by Intan (66,22% and 0,37), CLN6046 (45,94% and 0,26) and Gondol Hijau (17,08% and 0,09). Based on the results, among of the well-adapted genotypes in Indonesia, Intan was the most responsive genotype to be regenerated compared with two other genotypes. Considerably, Intan could be used as an explant for study on genetic engineering tomato through *A. tumefaciens* vector. The results of genetic transformation study have successfully obtained several explants formed the callus dan shoot on medium selection containing 50 mg/l kanamycin. Nevertheless, transformaton efficiency in the experiment still low which of 55,7 explants in average generated 1,7 shoots (about of 3%) that survive on selection medium (50 mg/l kanamycin).

Keywords: *Lycopersicon esculentum* Mill., Regeneration, Genetic Transformation, *Agrobacterium tumefaciens*

PENDAHULUAN

Tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.) adalah salah satu komoditas sayuran yang penting secara ekonomi yang dibudidayakan hampir di seluruh dunia termasuk Indonesia. Buah tomat mempunyai banyak fungsi di antaranya sebagai sayuran, buah meja, minuman, bahkan sebagai bahan kosmetik dan obat-obatan (Duriat, 1996). Di bidang kesehatan, selain kaya akan vitamin dan mineral, tomat juga mengandung senyawa antioksidan yang bermanfaat untuk pencegahan penyakit kronis seperti jantung koroner dan kanker (Weisburger, 1998). Selain itu, tomat

merupakan lima besar tanaman sayuran penting di Indonesia selain kubis, bawang putih, kacang kapri dan cabai.

Di dalam budidaya tanaman tomat banyak menghadapi kendala, baik biotik maupun abiotik. Saat ini penyakit keriting daun yang disebabkan oleh infeksi *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* (TYLCV) dari kelompok Gemini virus adalah salah satu kendala biotik yang serius pada produksi tomat dan ditemukan di banyak negara di dunia (Green & Kalloo, 1994; Moriones & Navas Castillo, 2000; Jones 2003). Penggunaan varietas tomat yang tahan merupakan cara yang terbaik untuk mengendalikan serangan penyakit tersebut.

Namun demikian, program pemuliaan konvensional untuk merakit varietas tahan masih menghadapi banyak kendala, di antaranya adalah sumber gen ketahanan yang belum ditemukan pada plasma nutfah tomat dan proses pemuliaannya banyak memakan waktu di dalam proses persilangan dan seleksi progeni. Hal ini menjadikan cara tersebut tidak cukup reaktif untuk mengimbangi patogen baru yang lebih virulen. Pemanfaatan teknologi rekayasa genetik merupakan pendekatan alternatif yang dapat dilakukan untuk memperoleh tanaman tomat tahan virus.

Teknik rekayasa genetik melalui penyisipan gen atau transformasi gen akan menghasilkan tanaman transgenik yang kemudian dapat dimanfaatkan sebagai sumber plasma nutfah atau langsung diseleksi menjadi galur harapan. Teknik transformasi genetik tanaman yang paling sering digunakan saat ini adalah transformasi tidak langsung menggunakan vektor bakteri *Agrobacterium tumefaciens*. Sementara itu, teknik transformasi secara langsung seperti penggunaan penembakan partikel sudah jarang digunakan. Keuntungan penggunaan teknik transformasi menggunakan *A. tumefaciens* adalah lebih efisien, murah dan stabil (Veluthambi *et al.*, 2003).

Di dalam aplikasi transformasi genetik tanaman, kultur sel/jaringan dan sistem regenerasinya memegang peranan yang sangat penting. Transformasi genetik secara *in vitro* akan berhasil bila sudah diperoleh sistem regenerasi tanaman yang bersifat efisien dan stabil. Oleh karena itu, kompetensi untuk beregenerasi yaitu kemampuan membentuk tanaman lengkap (mempunyai tunas dan akar) dan kompetensi untuk ditransformasi merupakan dua kunci penting penentu keberhasilan program transformasi genetik. Beberapa usaha yang dilakukan untuk mencapai sistem regenerasi yang efisien adalah dengan menentukan parameter penting yang spesifik pada tanaman (Shahriari *et al.*, 2006). Salah satu parameter untuk mendapatkan sistem regenerasi yang efisien adalah pemilihan genotipe yang akan digunakan sebagai eksplan karena pada umumnya kemampuan regenerasi atau transformasi sangat tergantung pada genotipe yang digunakan (*highly dependent on genotype*).

Tujuan penelitian untuk mempelajari respons regenerasi beberapa genotipe tomat dan melakukan studi transformasi genetik melalui vektor *Agrobacterium tumefaciens*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bioteknologi, *Asian Vegetables Research and Development Center* (AVRDC), Taiwan, sedangkan studi transformasi genetik tomat dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB BIOGEN) Bogor. Untuk studi regenerasi, tiga genotipe tomat Indonesia yaitu Intan, Gondol Hijau dan CL6046. Sebagai kontrol digunakan genotipe CLN1558A yang berasal dari AVRDC, Taiwan. Genotipe kontrol tersebut merupakan genotipe yang sangat responsif terhadap media kultur yang digunakan dalam penelitian ini.

Respons Regenerasi Beberapa Genotipe Tomat

Perkecambahan benih *in vitro*

Benih tomat dimasukkan ke dalam botol kultur dan ditambahkan ethanol 70 % serta dibiarkan selama 1 menit. Pada laminar, benih disterilisasi dengan 5,25 % NaClO dan 0,1 % Tween 20 selama 20-40 menit dengan diputar dengan magnet pengaduk. Benih dicuci sebanyak 6-7 kali dengan air steril pada gelas beaker. Setelah itu, benih-benih diletakkan pada petridish steril. Benih-benih steril ditanam ke botol kultur yang mengandung medium perkecambahan (1/2 MS + Sukrosa 20 g/L + Agar 0,7 g/L) dan kemudian botol kultur berisi benih ditempatkan pada ruang kultur dengan suhu 25 °C, fotoperiod 16 jam dan intensitas pencahayaan 3000-4000 lux.

Induksi kalus dari eksplan potongan daun

Kecambah yang berumur 14 hari diambil dari botol kultur dan diletakkan pada petridish steril yang berisi air steril. Kotiledon diambil dari kecambah dengan gunting atau pisau steril kemudian ujung dan pangkal dari daun dipotong sehingga membentuk persegi.

Dengan menggunakan ujung pinset atau pisau silet, tanam potongan kotiledon tersebut pada medium induksi kalus (MS + 2 mg/L BA + 0,5 mg/L IAA + Sukrosa 30 g/L dan pH 5,8). Petridish ditutup dengan parafilm dan potongan daun dikulturkan selama dua minggu pada suhu 25 °C di bawah pencahayaan 4000 lux sehingga membentuk kalus.

Regenerasi tunas

Setelah 2 minggu pada media induksi kalus, eksplan kotiledon yang telah berkalus dipindahkan ke medium regenerasi (MS + 0,25 mg/L BA + 0,25 mg/l GA3 + Sukrosa 30 g/L dan pH 5,8) dengan permukaan atas menghadap ke atas. Semua kultur dipindahkan ke medium regenerasi yang baru setiap dua minggu. Setelah dua minggu kultur berada pada media regenerasi, kalus dengan warna hijau, kompak dapat dipindah ke medium regenerasi yang baru. Kalus-kalus dengan primordia tunas akan mulai tumbuh setelah dua minggu dan segera dipotong menjadi potongan kecil dan dipindahkan ke media regenerasi yang baru pada botol untuk pemanjangan tunas.

Perakaran tunas

Apabila batang dari tunas berukuran 2-4 cm, tunas dipisahkan dari kalus dan dipindahkan ke media perakaran (MS + 0,15 mg/L NAA + Sukrosa 3 g/L) pada botol kultur atau kotak magenta. Potongan kalus dari dasar batang tunas sebisa mungkin tidak diikutsertakan karena akan mengganggu pembentukan akar. Tunas-tunas akan membentuk akar dan berkembang selama dua minggu setelah dipindah ke medium perakaran. Jika tidak berakar, potong kembali batang tunas dan pindahkan ke media perakaran yang baru, kemungkinan tunas tersebut akan berakar. Planlet yang berukuran sekitar 5 cm siap dipindahkan ke tanah.

Pengamatan dan Analisis Data

Pengamatan dilakukan terhadap masing-masing varietas tanaman tomat dengan beberapa parameter, yaitu jumlah eksplan yang membentuk kalus, jumlah eksplan berkalus yang membentuk tunas, jumlah tunas per eksplan dan jumlah tunas yang membentuk akar. Data-data yang telah diperoleh kemudian

dianalisis menggunakan paket program analisis statistik SAS (SAS, 1990).

Studi Transformasi Genetik Tomat

Eksplan yang digunakan untuk percobaan studi transformasi genetik tomat adalah kotiledon dari genotipe tomat yang ditanam secara *in vitro* yang menunjukkan respons regenerasi paling baik dari percobaan sebelumnya. Vektor yang digunakan dalam percobaan ini adalah bakteri *A. tumefaciens* strain LBA4404 yang membawa plasmid pBI121. Plasmid tersebut mengandung gen seleksi *nptII* untuk ketahanan terhadap antibiotik kanamisin dan gen pelapor *gus* (β -*Glucuronidase*).

Perkecambahan benih *in vitro*

Benih tomat dimasukkan ke dalam botol kultur dan ditambahkan ethanol 70 % serta dibiarkan selama 1 menit. Pada laminar, benih disterilisasi dengan 5,25 % NaClO dan 0,1 % Tween 20 selama 20-40 menit dengan diputar dengan magnet pengaduk. Benih dicuci sebanyak 6-7 kali dengan air steril pada gelas beaker. Setelah itu, benih-benih diletakkan pada petridish steril. Benih-benih steril ditanam ke botol kultur yang mengandung medium perkecambahan (1/2 MS + Sukrosa 2g/L + phytigel 3 g/L) dan kemudian botol kultur berisi benih ditempatkan pada ruang kultur dengan suhu 25 °C, fotoperiod 16 jam dan intensitas pencahayaan 3000-4000 lux. Kotiledon yang berumur 8-9 hari adalah optimal untuk ko-kultivasi dengan *Agrobacterium*.

Pre-kultur eksplan

Kecambah yang berumur 14 hari diambil dari botol kultur dan diletakkan pada petridish steril yang berisi air steril. Kotiledon diambil dari kecambah dengan gunting atau pisau steril kemudian ujung dan pangkal dari daun dipotong sehingga membentuk persegi. Dengan menggunakan ujung pinset atau pisau silet, buat luka-luka kecil pada kotiledon untuk meningkatkan peluang infeksi dari *Agrobacterium* dan mempertinggi efisiensi transformasi. Potongan kotiledon ditanam pada medium induksi kalus (MS + 2 mg/L BA + 0,5 mg/L IAA + Sukrosa 30 g/L + phytigel 3 g/L dan pH 5,8). Petridish ditutup dengan parafilm

dan diprekulturkan selama 24 jam pada suhu 25 °C di bawah pencahayaan yang rendah (1000 lux).

Preparasi *Agrobacterium*

Bakteri *Agrobacterium* yang mengandung konstruksi gen cp ditumbuhkan pada media YEP dengan antibiotik seleksi 2-3 hari sebelum digunakan. Koloni tunggal diambil dari plate dan bakteri tersebut ditumbuhkan ke tabung reaksi yang mengandung 6 ml media YEP dengan antibiotik yang sesuai. Bakteri diinkubasi pada 28 °C selama satu malam dengan penggoyangan 200 rpm. Kultur bakteri semalam diencerkan dengan MSO cair hingga konsentrasinya yang sesuai dengan OD = 0,5.

Ko-kultivasi

Kultur *Agrobacterium* yang sudah diencerkan dituangkan ke dalam kotiledon yang ditempatkan pada medium ko-kultivasi (MS 2BA 0,5IAA + 200 µM Asetosiringon + sukrosa 30 g/L + phytigel 3 g/L dan pH 5,8) selama 30 menit dengan sekali-kali diputar-putar. Suspensi *Agrobacterium* disedot dari plate dan diko-kultivasi selama 48 jam dan dibuat dua kontrol: (1) kontrol positif, eksplan kotiledon yang tidak diko-kultivasi (10-20) dengan *Agrobacterium* dan dipindahkan ke medium regenerasi (tanpa antibiotik). Kotiledon seharusnya membentuk kalus dan meregenerasikan planlet, (2) kontrol negatif, eksplan kotiledon tidak diko-kultivasi (40-50) dengan *Agrobacterium* dan dipindahkan ke media regenerasi (dengan antibiotik). Kotiledon seharusnya mati.

Regenerasi tunas

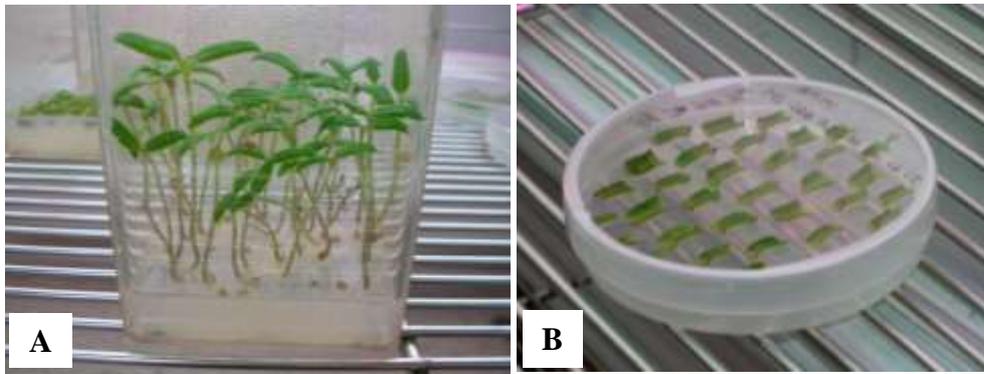
Setelah ko-kultivasi selama 48 jam, eksplan kotiledon dipindahkan ke medium regenerasi (MS 2BA 0,5IAA Km50 Cb500

Ct50 + Sukrosa 30 g/L + phytigel 3 g/L dan pH 5,8) dengan permukaan atas menghadap ke atas. Semua kultur dipindahkan ke medium regenerasi yang baru setiap dua minggu. Kalus-kalus dengan primordia tunas akan mulai tumbuh setelah dua minggu dan segera dipotong menjadi potongan kecil dan dipindahkan ke media pemanjangan tunas untuk disubkultur. Kultur ditransfer ke media yang baru setiap dua minggu atau lebih sering apabila dibutuhkan. Setelah dua atau tiga minggu kultur berada pada media seleksi dan regenerasi, kalus dengan warna hijau, kompak dapat dipindah ke medium pemanjangan tunas (MS 0,25BA 0,25GA3 Km50 Cb250 Ct50 dengan penambahan 30 g/L sukrosa, 3 g/L phytigel dan pH 5,8).

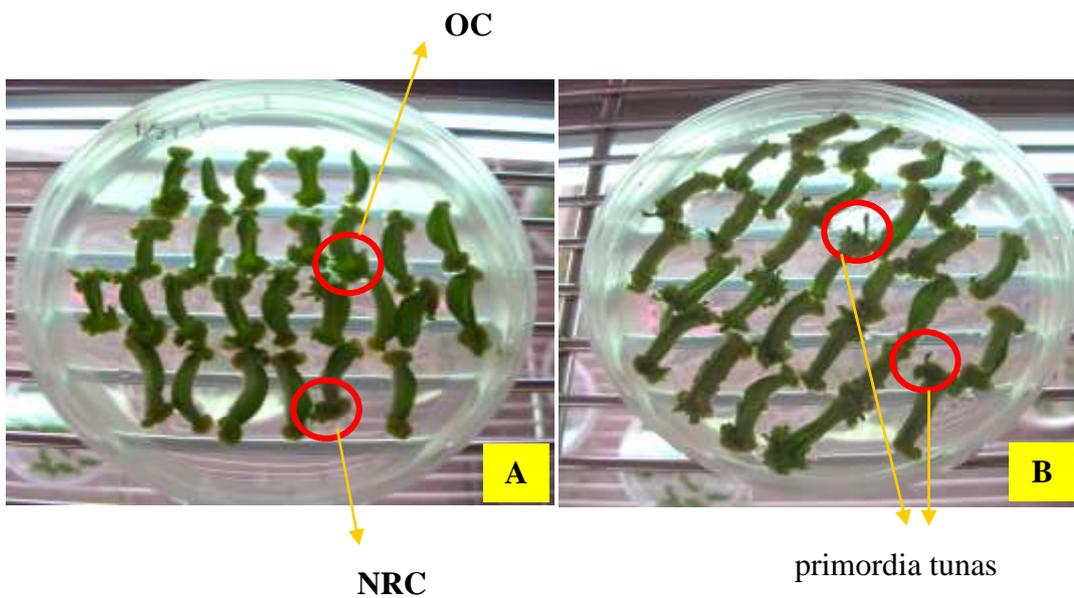
HASIL DAN PEMBAHASAN

Respons Regenerasi Beberapa Genotipe Tomat

Pada studi sebelumnya telah didemonstrasikan bahwa penggunaan kotiledon tomat yang berumur sekitar 8-14 hari merupakan jenis eksplan yang paling responsif untuk menginduksi kalus dan organogenesis tunas dibandingkan dengan jenis eksplan yang lain seperti hipokotil, batang dan daun (Hamza and Chupeau, 1993, Van Roekel *et al.*, 1993, Ling *et al.*, 1998). Mengacu pada penelitian sebelumnya tersebut, pada penelitian ini juga digunakan eksplan kotiledon yang berasal dari kecambah umur 14 hari setelah tanam (HST) yang ditumbuhkan secara *in vitro* (Gambar 1A). Dari kecambah umur 14 hari tersebut, kemudian kotiledonnya diambil dan dipotong bagian ujung dan pangkal sehingga kotiledon berbentuk persegi dan untuk selanjutnya ditanam pada media induksi kalus (Gambar 2B).



Gambar 1. A. Kecambah tomat *in vitro* yang berumur 14 hari pada media $\frac{1}{2}$ MS dan B. Potongan kotiledon ditanam pada media induksi kalus (B) (A. 14 day old *in vitro* seedlings on $\frac{1}{2}$ MS medium and B. The cotyledon pieces cultured on callus induction medium)



Gambar 2. A. Kalus-kalus awal yang terbentuk pada dua minggu setelah kultur pada media induksi kalus, NRC=Kalus yang tidak dapat diregenerasikan dan OC=Kalus organogenik, B. Tunas-tunas kecil yang terbentuk setelah eksplan yang berkalus dipindah/subkultur pada media yang baru (A. Initial calli were formed 2 weeks after culture on callus induction medium, NRC=non-regenerable callus and OC=organogenic callus, B) Shoot primordia were formed after the callused explants transferred to fresh medium)

Kalus-kalus akan terbentuk pada bagian bekas potongan pada eksplan setelah berada pada media induksi kalus selama dua minggu (Gambar 2A). Ada dua tipe kalus yang dapat diamati pada penelitian ini, kalus yang berwarna coklat yang merupakan kalus tidak dapat diregenerasikan (*non-regenerable callus*) (NRC, Gambar 2) dan kalus yang berwarna putih yang akan berubah menjadi kehijauan dalam beberapa hari dan kalus ini merupakan kalus organogenik (*organogenic callus*) (OC, Gambar 2). Kalus organogenik ini akan menghasilkan atau membentuk primordia-

primordia tunas setelah sekitar 10-14 hari (Gambar 2B). Untuk mempercepat pembentukan primordia tunas maka merupakan hal yang penting untuk melakukan subkultur kalus-kalus tersebut pada media yang baru sehingga akan tersedia nutrisi yang cukup bagi kalus-kalus untuk membentuk primordia tunas.

Eksplan yang berasal dari kotiledon dari semua genotipe yang digunakan mempunyai kemampuan untuk membentuk kalus 100 % setelah ditumbuhkan pada media induksi kalus (Tabel 1). Bahkan di antara eksplan-eksplan yang berkalus terdapat eksplan yang telah

berinisiasi membentuk primordia tunas (Gambar 2B). Primordia tunas ditandai dengan munculnya jaringan seperti daun yang berukuran kecil dan akan berkembang menjadi tunas kecil. Untuk menginduksi tumbuhnya tunas-tunas dari eksplan yang berkalus

selanjutnya kalus-kalus dengan primordia tunas ini dipindahkan ke media regenerasi sehingga kalus akan berkembang dan membentuk tunas yang lebih besar.

Tabel 1. Persentase eksplan yang membentuk kalus dan primordia tunas dari empat genotipe yang digunakan (*Percentage of explants producing callus and shoot primordia of the used four genotypes*)

Genotipe (<i>Genotype</i>)	Eksplan membentuk kalus (<i>explants producing callus</i>) (%)	Eksplan membentuk primordia tunas (<i>explants producing shoot primordia</i>) (%)
Intan	100 a	74,02 b
Gondol Hijau	100 a	24,06 c
CL6046	100 a	66,22 b
CLN1558A	100 a	97,27 a

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda dalam satu kolom menunjukkan perbedaan yang nyata pada taraf $\alpha=5\%$ (*Number with different letter at the same column was significant at the $\alpha=5\%$*)

Meskipun eksplan dari keempat genotipe menunjukkan kemampuan untuk membentuk kalus sebesar 100 %, namun kemampuannya membentuk primordia tunas bervariasi (Tabel 1). Kemampuan membentuk primordia tunas tertinggi ditunjukkan oleh genotipe CLN1558A (97,27 %) dibandingkan dengan genotipe-genotipe lain. Tomat CLN1558A merupakan genotipe yang berasal dari AVRDC sedangkan lainnya (Intan, Gondol Hijau dan CL6046) adalah genotipe-genotipe yang telah beradaptasi baik dan ditanam di Indonesia. Tingginya kemampuan eksplan dari genotipe CLN1558A diduga karena komposisi atau formula dari media-media yang digunakan dalam penelitian ini adalah media yang dikembangkan oleh AVRDC dan telah menunjukkan respons yang baik pada genotipe tersebut. Namun demikian, di antara ketiga genotipe yang ditanam di Indonesia, terlihat bahwa Intan merupakan genotipe yang paling responsif untuk membentuk primordia tunas (74,1 %), diikuti oleh CL6046 (66,7 %) dan Gondol Hijau (24,5 %).

Setelah diinkubasi pada media induksi kalus selama dua minggu dan disubkultur pada

media yang sama maka eksplan yang berkalus dan telah membentuk primordia tunas kemudian dipindahkan ke media regenerasi sehingga primordia tunas dapat berkembang menjadi tunas. Setelah beberapa hari diletakkan pada media regenerasi maka primordia tunas akan terlihat membesar dan berkembang membentuk tunas dengan bagian daun dan batang yang lengkap (Gambar 3). Seperti diketahui bahwa respons dari genotipe tomat untuk beregenerasi ditandai dengan kemampuan eksplan dari genotipe tersebut untuk membentuk tunas dengan bagian daun dan batang. Terdapat dua tipe tunas yang dapat diamati pada tahap regenerasi ini yaitu tunas yang dapat dipindahkan ke media perakaran karena mempunyai bagian daun dan batang yang normal dan tipe tunas yang abnormal dimana tunas tersebut bagian batangnya tidak berkembang dengan baik atau daun berkembang tidak normal. Tipe tunas yang pertama (normal) akan membentuk akar dengan baik ketika dipindahkan ke media perakaran sedangkan tipe tunas yang kedua (abnormal) apabila dipindahkan ke media perakaran akan sulit membentuk akar.

Tabel 2. Persentase jumlah eksplan beregenerasi dan jumlah tunas per eksplan pada empat genotipe tomat (*Percentage of number of regenerated explants and shoot per explant of four tomato genotypes*)

Genotipe (<i>Genotype</i>)	Eksplan beregenerasi (<i>regenerated explants</i>) (%)	Jumlah tunas per eksplan (<i>No. of shoot per explant</i>)
Intan	66,22 b	0,37 b
Gondol Hijau	17,08 d	0,09 c
CLN6046	45,94 c	0,26 b
CLN 1558A	90,56 a	0,66 a

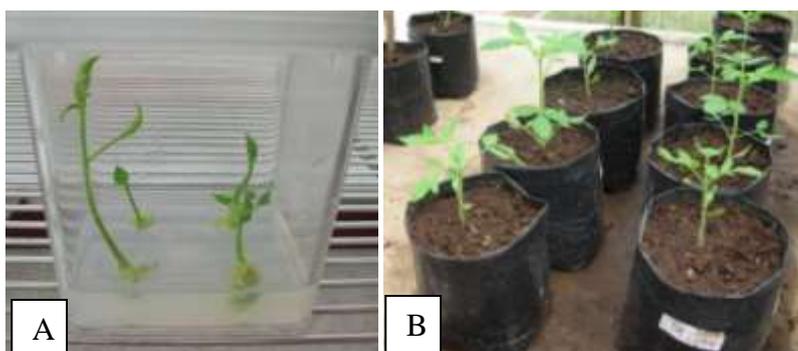
Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda dalam satu kolom menunjukkan perbedaan yang nyata pada taraf $\alpha=5\%$ (*Number with different letter at the same column was significant at the $\alpha=5\%$*)

Kemampuan eksplan yang telah membentuk kalus untuk beregenerasi dan jumlah tunas yang terbentuk per eksplan menunjukkan adanya variasi di antara keempat genotipe yang digunakan (Tabel 2). CLN1558A merupakan genotipe yang menunjukkan respon beregenerasi paling tinggi

yang diindikasikan dengan tingginya persentase eksplan yang beregenerasi dan jumlah tunas per eksplan (92,7 % dan 0,68 %). Kemampuan regenerasi untuk genotipe-genotipe lain setelah CLN1558A berturut-turut adalah Intan, CL6046 dan Gondol Hijau.



Gambar 3. Tunas-tunas yang dihasilkan (ditandai dengan anak panah) dari eksplan pada media regenerasi tunas (*Shoots produced by explants on regeneration medium*)



Gambar 4. A. Induksi akar dari tunas-tunas pada media perakaran (*Root induction of the shoots on rooting medium*) B. Aklimatisasi planlet tomat pada polibag di rumah kaca (*Acclimatization of tomato planlets on polybag in greenhouse*)

Untuk menginduksi terbentuknya akar maka tunas-tunas yang terbentuk pada media regenerasi kemudian dipisahkan dari kalus/eksplan dan kemudian dipindahkan ke media perakaran (Gambar 4A). Selanjutnya, tunas yang telah membentuk akar dipindahkan ke media tanah dalam polibag di rumah kaca (Gambar 4B).

Kultur *in vitro* pada tomat dapat digunakan untuk aplikasi bioteknologi yang berbeda seperti misalnya propagasi klonal, produksi tanaman bebas virus (Moghaieb, 1999) dan transformasi genetik tanaman (Ling *et al.*, 1998). Dalam bidang rekayasa genetik, kultur *in vitro* atau sistem regenerasi tomat yang efektif dan efisien sangat bermanfaat untuk mendapatkan transforman sebanyak mungkin, sehingga akan memberi peluang yang besar untuk merakit tanaman transgenik dengan karakter yang diinginkan.

Seperti telah dilaporkan sebelumnya, bahwa paling tidak ada tiga faktor penting yang sangat berpengaruh di dalam sistem regenerasi tanaman secara *in vitro*. Faktor-faktor tersebut adalah genotipe, tipe eksplan dan komposisi media (Moghaieb, 1999; Gubis *et al.*, 2003). Faktor komposisi media dan tipe eksplan pada penelitian ini mengadopsi teknologi yang telah dikembangkan oleh AVRDC. Pada penelitian ini, dapat diamati adanya perbedaan yang nyata di dalam kemampuan regenerasi di antara empat genotipe yang digunakan, yang ditandai dengan adanya perbedaan di dalam jumlah eksplan yang membentuk primordia tunas, eksplan yang beregenerasi membentuk tunas dan jumlah tunas per eksplan. Genotipe CLN1558A yang digunakan sebagai kontrol pada penelitian ini menunjukkan respons yang paling tinggi. Ini dapat dimengerti karena teknologi yang dikembangkan oleh AVRDC tentunya akan sangat tinggi responsnya bila digunakan untuk meregenerasikan genotipe

yang berasal dari AVRDC juga. Sedangkan dari genotipe-genotipe tomat yang beradaptasi baik dan ditanam di Indonesia, Intan merupakan genotipe yang mempunyai respons yang terbaik untuk regenerasi tanaman secara *in vitro*. Dengan demikian, untuk tujuan rekayasa genetik atau transformasi genetik tomat dimana salah satunya untuk merakit tanaman tomat transgenik tahan virus, maka Intan dapat digunakan untuk tujuan tersebut.

Studi Transformasi Genetik Tomat

Pada umumnya kemampuan regenerasi atau transformasi sangat tergantung pada genotipe yang digunakan (*highly dependent on genotype*). Beberapa usaha yang dilakukan untuk mencapai sistem regenerasi yang efisien adalah menentukan parameter penting seperti pemilihan genotipe yang akan digunakan sebagai eksplan. Berdasarkan percobaan studi regenerasi tiga genotipe tomat Indonesia (Intan, CL6046 dan Gondol Hijau), Intan merupakan genotipe yang paling respons untuk diregenerasikan. Oleh karena itu, pada percobaan studi transformasi genetik tomat ini, genotipe yang digunakan sebagai eksplan adalah Intan.

Dari sebanyak tiga kali transformasi genetik yang dilakukan pada genotipe Intan, telah diperoleh beberapa eksplan yang berhasil membentuk kalus dan tunas pada media seleksi yang mengandung 50 mg/L antibiotik kanamisin (Tabel 3 dan Gambar 5). Hal ini mengindikasikan bahwa diduga gen ketahanan terhadap antibiotik kanamisin (*nptII*) yang dibawa oleh *A. tumefaciens* telah terintegrasi ke dalam genom tanaman tomat. Berdasarkan jumlah tunas yang terbentuk, efisiensi transformasi genetik pada percobaan ini masih relatif rendah (sekitar 3 %) dimana dari rerata 55,7 eksplan hanya diperoleh 1,7 tunas yang lolos seleksi (Tabel 3).

Tabel 3. Jumlah eksplan berkalus, eksplan bertunas dan tunas pada media seleksi yang mengandung 50 mg/l kanamisin setelah transformasi genetik melalui vektor *A. tumefaciens* (*Number of callused explant, shooted explant and shoots on selection medium containing 50 mg/l kanamycin following genetic transformation mediated A. tumefaciens vector*)

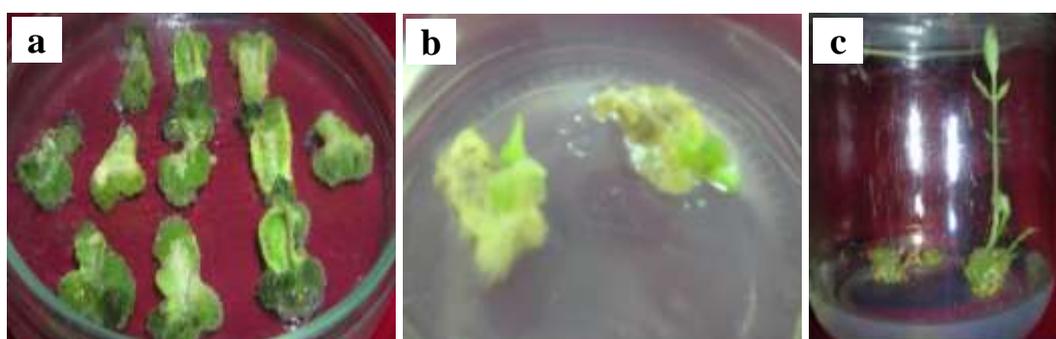
Transformasi ke- (<i>transformation</i>)	Jumlah eksplan (<i>No. of explant</i>)	Jumlah eksplan berkalus (<i>No. of callused explant</i>)	Jumlah eksplan bertunas (<i>No. of shooted explant</i>)	Jumlah tunas (<i>No. of shoot</i>)
1	60	10 (16,7)	1 (1,7)	1
2	50	27 (54,0)	4 (8,0)	3
3	57	20 (35,1)	3 (5,3)	1
Rerata	55,7	19 (34,1)	2,7 (5,0)	1,7
Kontrol positif	20	19 (95,0)	19 (95,0)	23
Kontrol negatif	25	4	0	0

Keterangan: - Angka dalam kurung menunjukkan nilai persentase (*Number with parenthesis was percentage value*)

- Kontrol positif adalah eksplan kotiledon yang tidak ditransformasi dan ditumbuhkan pada media tanpa 50 mg/L kanamisin (*Positive control was untransformed cotyledon explants and culture to medium without 50 mg/L kanamycin*).
- Kontrol negatif adalah eksplan kotiledon yang tidak ditransformasi dan ditumbuhkan pada media seleksi 50 mg/L kanamisin (*Negative control was untransformed cotyledon explants and culture to medium with 50 mg/L kanamycin*)

Teknik transformasi yang digunakan pada penelitian ini juga mengadopsi sistem transformasi yang sudah rutin digunakan di AVRDC. Oleh karena itu, studi sistem transformasi hanya pada parameter genotipe yang digunakan. Namun demikian, karena efisiensi transformasi yang dilakukan pada genotipe Intan masih sangat rendah padahal Intan merupakan genotipe yang paling responsif untuk diregenerasikan maka perlu

dilakukan optimasi parameter-parameter transformasi yang lain. Di antara parameter-parameter tersebut adalah lamanya waktu ko-kultivasi dan konsentrasi asetosiringon. Optimasi parameter transformasi genetik menggunakan vektor *A. tumefaciens* telah dilakukan oleh beberapa peneliti di antaranya pada tanaman kedelai (Paz *et al.*, 2004), ubijalar (Sisharmini *et al.*, 2005) dan tomat (Shahriari *et al.*, 2006)



Gambar 5. Eksplan berkalus (a), eksplan bertunas (b) dan tunas yang terbentuk (c) pada media seleksi yang mengandung 50 mg/L kanamisin setelah transformasi genetik melalui vektor *A. tumefaciens* (*callused explant (a), shooted explant (b) and shoots (c) on selection medium containing 50 mg/L kanamycin following genetic transformation mediated A. tumefaciens vector*)

SIMPULAN

Dari tiga genotipe tomat yang beradaptasi baik dan ditanam di Indonesia, Intan mempunyai respons terbaik di dalam regenerasi tanaman tomat secara *in vitro* bila dibandingkan dengan dua genotipe lainnya. Studi transformasi genetik tomat Intan menunjukkan bahwa telah diperoleh transforman yang lolos pada media seleksi yang mengandung antibiotik kanamisin 50 mg/L.

DAFTAR PUSTAKA

- Duriat, A.S. 1996. Management of pepper viruses in Indonesia: problem and progress. *IARD J.* 18(3): 45-50.
- Green, S.K., and G. Kalloo. 1994. Leaf curl and yellowing viruses of pepper and tomato: An overview. *Technical Bulletin Asian Vegetables Research and Development Center*. Tainan, ROC. No. 21.
- Gubis, J., Z. Laichova, J. Farago and S. Jurekova. 2003. Effect of genotype and explant type on shoot regeneration in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) *in vitro*. *Czech J. Genet Plant Breed* 39 (1) : 9-14.
- Hamza, S., and Y. Chupeau. 1993. Re-evaluation of conditions for plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation from tomato (*Lycopersicon esculentum*). *J. Exp Bot* 44: 1837-184.
- Jones, D.R. 2003. Plant viruses transmitted by whiteflies. *Eur J. Plant Pathol.* 109:195-219.
- Ling, H-Q., D. Kriseleit, and M.G.Ganal. 1998. Effect of ticarcillin/potassium clavulanate on callus growth and shoot regeneration in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Plant Cell Rep* 17: 843-847.
- Moghaieb, R.E.A., H. Saneoka, and K. Fujita. 1999. Plant regeneration from hypocotyl and cotyledon explant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *J. Soil Sci Plant Nutr* 45:639-646.
- Moriones, E., and J. Navas Catillo. 2000. Tomato yellow leaf curl virus, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus Res* 71: 123-134.
- Paz, M.M., H. Shou, Z. Guo, Z. Zhang, A.K. Banerjee, and K. Wang. 2004. Assesment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant. *Euphytica* 136: 167-179.
- SAS Institute Inc., 1990. SAS/STAT User's Guide Version 6. SAS Institute Inc.
- Shahriari, F., H. Hashemi, and B. Hosseini. 2006. Factors influencing regeneration and genetic transformation of three elite cultivars of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Pakistan J. Biol Sci* 9(15):2729-2733.
- Sisharmeni, A., A.D. Ambarwati, T.J. Santoso, M. Herman, dan G.A. Wattimena. 2005. Optimasi transformasi genetik Ubijalar melalui vektor *Agrobacterium tumefaciens*. *Penelitian Pertanian* 24(2):104-109.
- Van Roekel, J.S.C., B. Damm, L.S. Melchers, and A. Hoekema. 1993. Factors influencing transformation frequency of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Cell Rep* 12: 644-647.
- Veluthambi, K., A.K. Gupta, A. Sharma. 2003. The current status of plant transformation technologies. *Cuurent Science* 84(3): 368-380.
- Weisburger, J.H. 1998. International symposium on lycopene and tomato products in disease prevention. *Proc Soc Exp Biol Med* 218: 93-143.