

Efikasi Gen *RB* pada Tanaman Kentang Transgenik Katahdin SP904 dan SP951 terhadap Empat Isolat *Phytophthora infestans* dari Jawa Barat

A. Dinar Ambarwati^{1*}, S.M. Sumaraw², Agus Purwito³, M. Herman¹, E. Suryaningsih⁴, dan Hajrial Aswidinnoor³

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111
Telp. (0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820; *E-mail: dinarambarwati@yahoo.com

²Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor 16680
Telp. (0251) 8629364; Faks. (0251) 8629362

³Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor 16680
Telp. (0251) 8629352; Faks. (0251) 8629353

⁴Balai Penelitian Tanaman Sayuran, Jl. Tangkuban Perahu 517, Kotak Pos 8413, Lembang 40391
Telp. (022) 2786245; Faks. (022) 2786416, 2786025

Diajukan: 2 September 2010; Diterima: 10 Januari 2011

ABSTRACT

Efficacy of *RB* gene in transgenic potato Katahdin SP904 and SP951 to West Java isolates of *Phytophthora infestans*. A. Dinar Ambarwati, S.M. Sumaraw, Agus Purwito, M. Herman, E. Suryaningsih, and Hajrial Aswidinnoor. Potato late blight, caused by *Phytophthora infestans* is one of the most devastating plant disease. Potato yield losses due to this disease ranged from 47-100%. A major late blight resistance gene, called *RB*, previously was identified in the wild potato species *Solanum bulbocastanum*. *RB* gene has been integrated into cultivated potato Katahdin using *Agrobacterium*-mediated transformation, and showed durable and broad spectrum resistance either in laboratory assay or in confined field trial. Evaluation of transgenic Katahdin SP904 and SP951 was conducted to verify whether the *RB* gene with broad spectrum to all known races of *P. infestans* in the United States and in Toluca, Mexico was also effective against *P. infestans* isolates in Indonesia. Efficacy of *RB* gene was evaluated for foliar and tuber resistance to West Java isolates. Transgenic Katahdin were more resistant in foliar than non transgenic plants, at 14 days after inoculation. Diseases intensity of transgenic Katahdin SP904 and SP951 were 19.8-43.8%, whereas non transgenic Katahdin, Granola, and Atlantic were 46.9-100%. In contrast to the foliar resistance phenotype, *RB*-containing tubers in transgenic Katahdin did not exhibit increased resistance to Lembang, Pangalengan and Galunggung isolates. Tubers of transgenic Katahdin SP904, SP951, and non transgenic Katahdin showed lesion volume of 0.93, 0.91, and 0.91 cm³, respectively. *RB* gene in transgenic Katahdin showed efficacy against late blight *P. infestans* in foliar, but did not showed efficacy in tuber. Transgenic Katahdin *RB* thus providing a potential source of resistance for breeding programs.

Keywords: *RB* gene, transgenic potato, *Phytophthora infestans*, West Java.

ABSTRAK

Efikasi Gen *RB* pada Tanaman Kentang Transgenik Katahdin SP904 dan SP951 terhadap Empat Isolat *Phytophthora infestans* dari Jawa Barat. A. Dinar Ambarwati, S.M. Sumaraw, Agus Purwito, M. Herman, E. Suryaningsih, dan Hajrial Aswidinnoor. Hawar daun yang disebabkan oleh cendawan *Phytophthora infestans* merupakan salah satu penyakit penting pada tanaman kentang. Kehilangan hasil yang diakibatkan oleh penyakit ini berkisar dari 47-100%. Gen mayor untuk ketahanan terhadap penyakit hawar daun, yang disebut sebagai gen *RB*, diidentifikasi ada pada spesies kentang liar diploid *Solanum bulbocastanum*. Gene *RB* sudah diintegrasikan ke dalam varietas kentang Katahdin melalui transformasi *Agrobacterium tumefaciens*, dan menunjukkan ketahanan *durable* dengan spektrum luas terhadap *P. infestans*, baik dalam pengujian rumah kaca maupun lapangan uji terbatas. Evaluasi tanaman transgenik Katahdin SP904 dan SP951 dilakukan untuk mengetahui apakah gen *RB* yang berspektrum luas terhadap semua ras *P. infestans* yang dikenal di Amerika Serikat dan di Toluca, Meksiko, juga efektif terhadap isolat *P. infestans* di Indonesia. Efikasi gen *RB* dievaluasi untuk ketahanan daun dan umbi terhadap isolat *P. infestans*, khususnya isolat dari Jawa Barat. Tanaman transgenik Katahdin mempunyai ketahanan pada daun, yang berbeda dibandingkan dengan tanaman non transgenik, pada 14 hari setelah inokulasi. Intensitas penyakit tanaman transgenik Katahdin SP904 dan SP951 adalah 19,8-43,8%, sedangkan Katahdin non transgenik, Granola, dan Atlantik adalah 46,9-100%. Kontras dengan fenotipe ketahanan daun, umbi tanaman transgenik Katahdin tidak menunjukkan peningkatan ketahanan terhadap isolat Lembang, Pangalengan, dan Galunggung. Umbi tanaman transgenik Katahdin SP904, SP951, dan Katahdin non transgenik menunjukkan volume terinfeksi, masing-masing sebesar 0,93; 0,91; dan 0,91 cm³. Gen *RB* pada tanaman transgenik menunjukkan efikasinya pada daun, tetapi tidak menunjukkan efikasinya pada umbi. Tanaman transgenik Katahdin *RB* merupakan sumber yang potensial untuk ketahanan dalam pemuliaan tanaman.

Kata kunci: Gen *RB*, kentang transgenik, *Phytophthora infestans*, Jawa Barat.

PENDAHULUAN

Penyakit hawar atau busuk daun (*late blight*) yang disebabkan oleh cendawan *Phytophthora infestans* masih menjadi problem yang paling serius dalam budi daya kentang. Di Indonesia, kerugian yang ditimbulkan akibat penyakit ini dapat mencapai 47-100% gagal panen pada tanaman kentang, terutama pada musim penghujan dengan kelembaban yang tinggi (Hariyadi dan Koentjoro, 1996; Kusmana, 2003).

Cendawan *P. infestans* dapat menyerang tanaman kentang, baik pada daun, batang, maupun umbi. Tanaman kentang yang terserang *P. infestans* pada umumnya menunjukkan gejala yang ditandai dengan munculnya bercak kecil basah berwarna hijau pucat sampai hijau tua, yang dimulai pada tepi daun. Pada suhu yang rendah (18-20°C) dan kelembaban tinggi (>80%), bercak dapat melebar dan membentuk daerah nekrosis berwarna coklat atau hitam. Pada daun bagian bawah tampak masa sporangia berwarna putih dan segera seluruh daun yang terinfeksi akan layu dan mati. Serangan pada umbi dimulai dari bagian umbi yang luka (lentisel) yang kemudian menyebabkan warna umbi menjadi kemerahan sampai ungu, kering, dan keras (Alexopoulos *et al.*, 1996; Agrios, 1997).

Kehilangan hasil di lapang, selain diakibatkan oleh serangan penyakit hawar pada daun, juga disebabkan adanya serangan pada umbi. Ketahanan yang tinggi pada daun akan mengurangi tingkat inokulum yang menyerang umbi, sehingga meminimalkan risiko serangan penyakit hawar pada umbi (Flier *et al.*, 2001). Sejumlah penelitian menunjukkan adanya korelasi antara ketahanan umbi dan daun (Platt dan Tai, 1998; Stewart *et al.*, 1994), namun demikian Kirk *et al.* (2001), Halterman *et al.* (2008) serta Liu dan Halterman (2009) tidak menemukan adanya korelasi tersebut.

Pemuliaan dan seleksi yang ekstensif lebih diarahkan untuk memperoleh ketahanan yang bersifat horisontal terhadap hawar daun, dibandingkan ketahanan yang bersifat vertikal (Wastie, 1991). Gen *RB* (GenBank asesi AAP45164) yang diisolasi dari spesies kentang liar diploid yang berasal dari Meksiko, yaitu *Solanum bulbocastanum*, dipertimbangkan menjadi sumber ketahanan yang menjanjikan (Hermesen dan de Boer, 1971; Song *et al.*, 2003), karena menunjukkan ketahanan *durable* dan berspektrum luas terhadap ras-ras *P. infestans* yang dikenal (Naess *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2003). Perakitan tanaman kentang transgenik dengan gen *RB* telah dilakukan melalui teknik *Agrobacterium* ke dalam varietas Katahdin, dan menghasilkan beberapa *event*, seperti Katahdin SP904,

SP905, SP918, SP925, SP926, dan SP951 (Song *et al.*, 2003). Tanaman transgenik ini menunjukkan skor ketahanan berkisar dari 6,0-7,7 dan berspektrum luas terhadap ras-ras *P. infestans*, yaitu US1, US8, US10, US11, dan US14, baik dalam pengujian di rumah kaca maupun di lapangan uji terbatas, di PICTIPAPA (Mexico), Washington, Wisconsin, dan Minnesota (Song *et al.*, 2003; Kuhl *et al.*, 2007; Bradeen *et al.*, 2009). Sebelum digunakan untuk penelitian selanjutnya, misalnya sebagai donor ketahanan dalam pemuliaan kentang, perlu dilakukan pengkajian apakah gen *RB* tersebut juga efektif terhadap isolat *P. infestans* di Indonesia.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efikasi gen *RB* pada daun dan umbi tanaman kentang transgenik varietas Katahdin yang berasal dari dua *event*, yaitu SP904 dan SP951 terhadap isolat *P. infestans*, khususnya isolat dari Jawa Barat.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di rumah kaca fasilitas uji terbatas (FUT) Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor dan di *mist chamber* Balai Penelitian Tanaman Sayuran (Balitsa), Lembang, pada tahun 2007. Evaluasi efikasi gen *RB* dilakukan pada tanaman kentang transgenik Katahdin SP904 dan SP951. Sebagai pembandingan disertakan Katahdin non transgenik, varietas budi daya Granola dan Atlantic. Spesies kentang liar *S. bulbocastanum* klon PT29 (PI # 243510) digunakan sebagai kontrol tahan. Tanaman transgenik Katahdin SP904, SP951, dan Katahdin non transgenik diperoleh dari Universitas Wisconsin, Amerika Serikat melalui kerja sama USAID-ABSP (*Agricultural Biotechnology Support Project*) II.

Penyiapan Inokulum

Isolat *P. infestans* yang digunakan merupakan koleksi dari Laboratorium Penyakit, Balitsa, Lembang, yang dikumpulkan dari lapang pada tahun 2006-2007. Isolat Lembang dikoleksi dari Desa Cikole, Kecamatan Lembang, Kabupaten Bandung dengan ketinggian ± 1.300 m di atas permukaan laut (dpl). Isolat Pangalengan, dikoleksi dari Desa Kertasari, Pangalengan dengan ketinggian ± 1.400 m dpl; isolat Galunggung, dikoleksi dari Desa Sukapura, Kecamatan Singaparna, Tasikmalaya di kaki gunung Galunggung dengan ketinggian $\pm 700-900$ m dpl. Isolat Pasir Sarongge dikoleksi dari Kebun Percobaan Institut Pertanian Bogor di Pasir Sarongge, Cianjur, dengan ketinggian ± 1.120 m dpl.

Isolat tersebut dimurnikan dan diperbanyak pada media Agar V8. Untuk membuat 1 liter media diperlu-

kan 100 ml V8 juice, 1 g CaCO_3 , 0,05 g β -sitosterol, 15 g agar dan ditambah air steril sampai volume 1 liter (Miller, 1955). Kultur diinkubasikan selama 10-14 hari pada temperatur 15°C dalam gelap. Persiapan inokulum dilakukan dengan memanen sporangium dan disuspensikan dengan air steril di dalam cawan petri. Untuk memacu terbentuknya zoospora, suspensi sporangium diinkubasi pada suhu 4°C selama 60 menit, diikuti 30 menit pada suhu kamar. Sebelum digunakan sebagai inokulum, konsentrasi zoospora dihitung dengan haemasitometer, yaitu $7,5 \times 10^4$ per ml untuk evaluasi ketahanan daun dan 3×10^4 per ml untuk evaluasi ketahanan umbi (Halterman *et al.*, 2008). Isolat Pasir Sarongge, Pangalengan, dan Galunggung digunakan untuk menginokulasi daun tanaman, sedangkan isolat Lembang, Pangalengan, dan Galunggung untuk menginokulasi umbi. Isolat Lembang tidak digunakan untuk inokulasi daun, karena sudah digunakan pada penelitian pendahuluan (ABSP II, 2006).

Efikasi Gen *RB* pada Daun Tanaman Transgenik

Tanaman kentang transgenik Katahdin SP904 dan SP951, Katahdin non transgenik, Granola, Atlantic, dan *S. bulbocastanum* klon PT29 (PI # 243510) di tanam di rumah kaca FUT. Umbi ditanam dalam pot plastik berdiameter 30 cm yang berisi media campuran arang sekam : tanah : pupuk kandang dalam perbandingan 2 : 1 : 1. Penyiraman dilakukan setiap dua hari dan pemeliharaan dilakukan tanpa penyemprotan fungisida. Tanaman berumur 30 hari dengan pertumbuhan yang sehat siap diinokulasi. Evaluasi efikasi terhadap tiga isolat *P. infestans* dilakukan dengan rancangan acak lengkap, tiga ulangan, setiap ulangan terdiri dari lima tanaman. Satu sampai tiga jam sebelum inokulasi, tanaman diletakkan di dalam *mist chamber* dengan kelembaban $>90\%$, dan suhu $15-18^\circ\text{C}$. Setiap tanaman, diinokulasi secara terpisah, masing-masing dengan isolat Pasir Sarongge, Pangalengan, dan Galunggung, dengan cara disemprot 3 ml suspensi zoospora pada konsentrasi $7,5 \times 10^4$ per ml, di bagian permukaan atas dan bawah daun (Halterman *et al.*, 2008). Selama percobaan kelembaban udara (90-100%) diatur dengan bantuan *sprinkler*.

Peubah yang diamati adalah periode inkubasi, skor ketahanan tanaman, tingkat ketahanan tanaman, intensitas penyakit, dan kumulatif serangan. Periode inkubasi diamati dengan menghitung jumlah hari sejak inokulasi sampai munculnya gejala awal penyakit. Skor ketahanan tanaman diamati menurut kriteria Henfling (1979) dan Halterman *et al.* (2008), berdasarkan persentase daun terserang, yaitu 0 (100%), 1 ($>90\%$), 2 (81-90%), 3 (71-80%), 4 (61-70%), 5 (41-60%), 6 (26-40%), 7 (11-25%), 8 ($<10\%$), 9 (0%).

Pengamatan dilakukan pada 7, 10, 12, dan 14 hari setelah inokulasi (hsi). Tingkat ketahanan ditentukan berdasarkan nilai skoring, di mana skor ≥ 7 ($\leq 25\%$ infeksi) termasuk dalam kategori tahan (Song *et al.*, 2003; Colton *et al.*, 2006; Halterman *et al.*, 2008) dan skor $\leq 6,9$ ($>25\%$ infeksi) termasuk kategori peka (Song *et al.*, 2003). Intensitas penyakit (%) dihitung dengan menggunakan rumus:

$$P = \frac{n \times v}{N \times Z} \times 100\%$$

Di mana P = intensitas penyakit, n = jumlah tanaman dari tiap kategori serangan, v = nilai skala dari tiap kategori serangan, N = jumlah tanaman contoh, Z = skor dari kategori serangan tertinggi. Kumulatif serangan dihitung dengan metode AUDPC (*area under diseases progress curve*), menurut Landeo (1999), yaitu:

$$\text{AUDPC} = \sum_{i=1}^n (X_{t+1} + X_t) (D_{t+1} - D_t)$$

Di mana X_t = persentase serangan hawar daun pengamatan pada waktu ke-t, X_{t+1} = persentase serangan hawar daun pada pengamatan t+1 pengamatan berikutnya, $(D_{t+1} - D_t)$ = interval pengamatan dari pengamatan pertama ke pengamatan kedua. Data yang terkumpul dianalisis dengan Analisis Ragam (ANOVA) pada program SAS versi 9.0 dan uji lanjutan menggunakan LSD (uji beda nyata terkecil) taraf 5%. Hubungan keeratan antar peubah dideterminasi dengan analisis korelasi Pearson.

Efikasi Gen *RB* pada Umbi Tanaman Transgenik

Umbi kentang transgenik Katahdin SP904 dan SP951, Katahdin non transgenik, Granola, Atlantic, dan *S. bulbocastanum* PT29, dengan ukuran yang seragam (140-190 g) disterilisasi dengan alkohol 70% dan dibilas dengan air steril, kemudian dikeringanginkan selama satu malam. Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap dengan tiga ulangan, tiga umbi setiap ulangan.

Evaluasi efikasi pada umbi menggunakan metode Halterman *et al.* (2008). Sebelum diinokulasi, setiap umbi dilubangi menggunakan ujung pipet, hingga berdiameter 2 mm dan kedalaman 6 mm. Pada satu sisi (setengah bagian) umbi, terdapat 2-3 lubang dengan jarak antar lubang 2 cm, tergantung dari ukuran umbi. Setiap umbi diinokulasi secara terpisah, masing-masing dengan isolat Lembang, Pangalengan, dan Galunggung, dengan cara meneteskan $20 \mu\text{l}$ suspensi zoospora pada konsentrasi $3 \times 10^4/\text{ml}$ pada setiap lubang umbi. Umbi yang sudah diinokulasi dimasukkan ke dalam wadah tertutup yang dialasi kertas tisu basah untuk menjaga kelembaban, dan diinkubasi dalam ge-

lap, pada suhu 18°C dengan kelembaban >90%. Setelah 10 hari diinkubasi, periderm umbi dibuang dengan hati-hati menggunakan pisau, kemudian area berwarna kecoklatan di sekitar lubang tusukan diukur diameternya. Setelah itu umbi dibelah membujur, memotong titik inokulasi, dan diukur kedalaman daerah yang mengalami nekrosis. Pengukuran diameter (d) dan kedalaman (h) digunakan untuk menghitung perkiraan volume jaringan umbi yang terinfeksi menggunakan rumus Halterman *et al.* (2008), yaitu $(4/3 \times \pi \times [(d/2)^2] \times [h/2])/2$. Data dianalisis dengan Analisis Sidik Ragam (ANOVA) pada program SAS versi 9.0 dan uji lanjutan menggunakan LSD (uji beda nyata terkecil), pada taraf 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Evaluasi Efikasi Gen *RB* pada Daun Tanaman Transgenik

Pada pengamatan 7 hsi, tanaman transgenik Katahdin SP904 maupun SP951 yang diinokulasi dengan isolat Pasir Sarongge menunjukkan skor ketahanan 9, dengan periode inkubasi 9 hari. Skor ketahanan ini tidak berbeda nyata dibandingkan dengan tanaman Katahdin non transgenik. Skor ketahanan transgenik Katahdin SP904 dan SP951 terhadap isolat Pangalengan dan Galunggung juga tidak berbeda nyata dengan skor ketahanan tanaman non transgenik. Semua tanaman uji masih dalam kategori tahan dengan skor ketahanan antara 7,3 sampai 9, kecuali untuk varietas Granola yang diinokulasi dengan isolat Pasir Sarongge menunjukkan skor 6,5 dan termasuk kategori peka. Hal ini didukung oleh data periode inkubasi, di mana Granola mempunyai periode inkubasi lebih singkat, yaitu 5,3 hari. Menurut Song *et al.* (2003) pada pengamatan 7 hsi sudah terdapat perbedaan ketahanan antara tanaman transgenik dengan non transgenik. Dari 14 tanaman transgenik Katahdin *RB* yang diinokulasi dengan isolat US930287, 9 tanaman mempunyai skor ketahanan 7 dan 5 tanaman dengan skor ketahanan 8, sedangkan dari 8 tanaman Katahdin non transgenik yang diuji tidak ada yang tahan. Penggunaan isolat yang berbeda dapat menyebabkan perbedaan dalam respon ketahanan tanaman.

Pada pengamatan 10 hsi, skor ketahanan tanaman transgenik masih tinggi, dengan skor berkisar antara 8,2-8,9, yang berarti tanaman masih dalam kategori tahan. Tanaman Katahdin non transgenik menunjukkan skor ketahanan 6-7,4. Hasil ini sesuai dengan yang diperoleh Colton *et al.* (2006) bahwa pada pengamatan 10 hsi, galur-galur transgenik yang mengandung gen *RB* menunjukkan ketahanan yang kuat dengan rata-rata skor 7,7, atau dengan intensitas penyakit hawar daun

14%. Galur non transgenik sudah terserang dengan intensitas 65% dengan rata-rata skor 4,4. Halterman *et al.* (2008) menganalisis ketahanan daun pada tanaman transgenik yang mengandung gen *RB*. Pada pengamatan 10 hsi, galur-galur yang diuji, yaitu SP951, SP2423, SP2105, SP2564 mempunyai rata-rata skor ketahanan 6,6-7,6 dengan persentase serangan 11-25%, sedangkan intensitas pada tanaman non transgenik yang diuji, yaitu Katahdin, Superior, Russet Burbank, dan Dark Red Norland mencapai 90%. Sebaliknya, Kramer *et al.* (2009) mendapatkan bahwa pada 10 hsi, tanaman transgenik Katahdin SP904 sudah peka, dengan skor 2,3-4,5, sedangkan tanaman transgenik Katahdin SP951 menunjukkan skor 4,3-6. Hal ini terjadi karena konsentrasi inokulum yang digunakan sangat tinggi, yaitu 86.100-130.555 sporangia/ml. Pengamatan ketahanan tanaman transgenik kentang yang mengandung gen *RB* di *mist chamber* maupun di rumah kaca, yang dilakukan oleh peneliti lain hanya sampai pada pengamatan 7 hsi atau 10 hsi (Song *et al.*, 2003; Colton *et al.*, 2006; Halterman *et al.*, 2008; Kramer *et al.*, 2009). Menurut Kramer *et al.* (2009) tanaman dengan skor ≥ 7 pada 10 hsi, dinyatakan sebagai tahan.

Skor ketahanan masing-masing tanaman semakin kecil dengan bertambahnya waktu atau periode pengamatan. Pada 14 hsi atau pada akhir pengamatan, terdapat perbedaan pada skor ketahanan antara tanaman transgenik Katahdin SP904 dan SP951, dibandingkan Katahdin non transgenik, Granola, dan Atlantic, baik pada isolat Pasir Sarongge, Pangalengan maupun Galunggung (Gambar 1). Transgenik Katahdin SP951 yang diinokulasi dengan isolat Pasir Sarongge menunjukkan skor 7,2, sedangkan Katahdin non transgenik, Granola, dan Atlantic mempunyai skor ketahanan dari 0-4,8. Tanaman kentang liar *S. bulbocastanum* sebagai sumber gen ketahanan ternyata dapat mengekspresikan sifat ketahanannya terhadap isolat Jawa Barat dengan menunjukkan skor 9, tidak terserang hawar daun sampai akhir pengamatan.

Secara umum dapat dikatakan bahwa tanaman transgenik Katahdin SP904 dan SP951 lebih tahan terhadap serangan *P. infestans* dibandingkan dengan tanaman Katahdin non transgenik, Granola, dan Atlantic, sehingga dapat dikatakan bahwa gen *RB* efektif terhadap tiga isolat *P. infestans* yang digunakan. Hasil ini didukung oleh hasil percobaan pada uji lapang terbatas di Balitsa, Lembang. Tanaman transgenik Katahdin SP904 dan SP951 tahan terhadap *P. infestans* (Herman, 2008).

Intensitas penyakit menggambarkan keadaan masing-masing tanaman uji yang terserang *P. infestans*, berdasarkan persentase daun terserang sampai dengan kematian tanaman. Intensitas penyakit

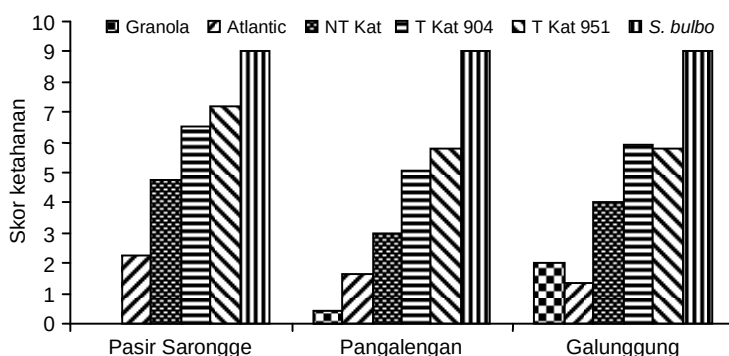
tanaman transgenik pada 14 hari setelah diinokulasi dengan ketiga isolat *P. infestans* yang digunakan, lebih kecil dibandingkan dengan tanaman non transgenik. Transgenik Katahdin SP904 dan SP951 menunjukkan intensitas penyakit 19,8-43,8%, sedangkan Katahdin non transgenik, Granola, dan Atlantic menunjukkan intensitas penyakit 46,9-100% (Gambar 2). Demikian juga dengan kumulatif serangan hawar daun atau total nilai AUDPC, di mana tanaman transgenik menunjukkan AUDPC yang lebih kecil, dibandingkan tanaman non transgenik. Total AUDPC tanaman transgenik sebesar 63,1-121,9 dan tanaman non transgenik sebesar 176-450 (Gambar 3). Hal ini didukung pula oleh adanya perbedaan nyata pada rata-rata skor ketahanan antara tanaman transgenik Katahdin SP904 dan SP951 dengan Katahdin non transgenik (Gambar 1).

Semakin lama periode inkubasi, yang berarti semakin lambat timbulnya gejala, maka tanaman akan semakin tahan, dengan skor ketahanan yang semakin tinggi. Hasil ini didukung oleh analisis korelasi (Tabel 1), di mana terdapat korelasi positif (0,925) antara periode inkubasi dengan skor ketahanan. Apabila dikaitkan dengan intensitas penyakit, maka semakin lama

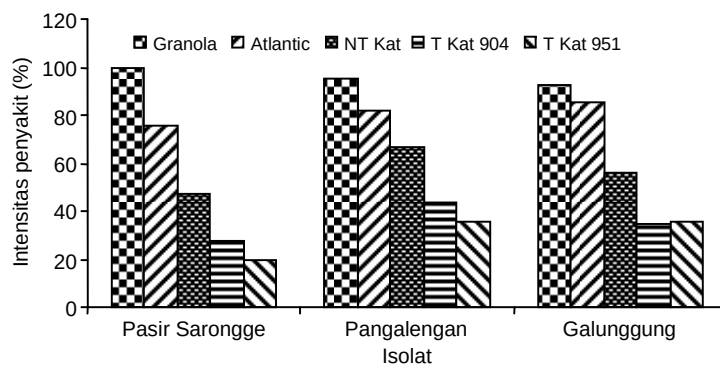
periode inkubasi, skor ketahanan semakin tinggi, yang berarti intensitas (kerusakan) penyakit akan semakin kecil, sehingga terdapat korelasi negatif (-0,927) antara periode inkubasi dengan intensitas penyakit.

Hubungan antara periode pengamatan (hsi) dengan skor ketahanan, menunjukkan korelasi negatif dengan koefisien korelasi -0,715, yang berarti bahwa semakin panjang periode pengamatan, skor ketahanan menjadi semakin kecil. Hal ini terjadi karena skor ketahanan ditentukan berdasarkan skala 0-9, di mana skala 0 menunjukkan tanaman sudah terserang 100% (peka), sedangkan skala 9 menunjukkan tidak ada serangan (0%) pada tanaman. Demikian juga halnya dengan hubungan antara skor ketahanan dengan intensitas penyakit dan AUDPC, yang menunjukkan korelasi negatif yang sangat erat, yaitu masing-masing sebesar -0,999 dan -0,952 ($P < 0,01$).

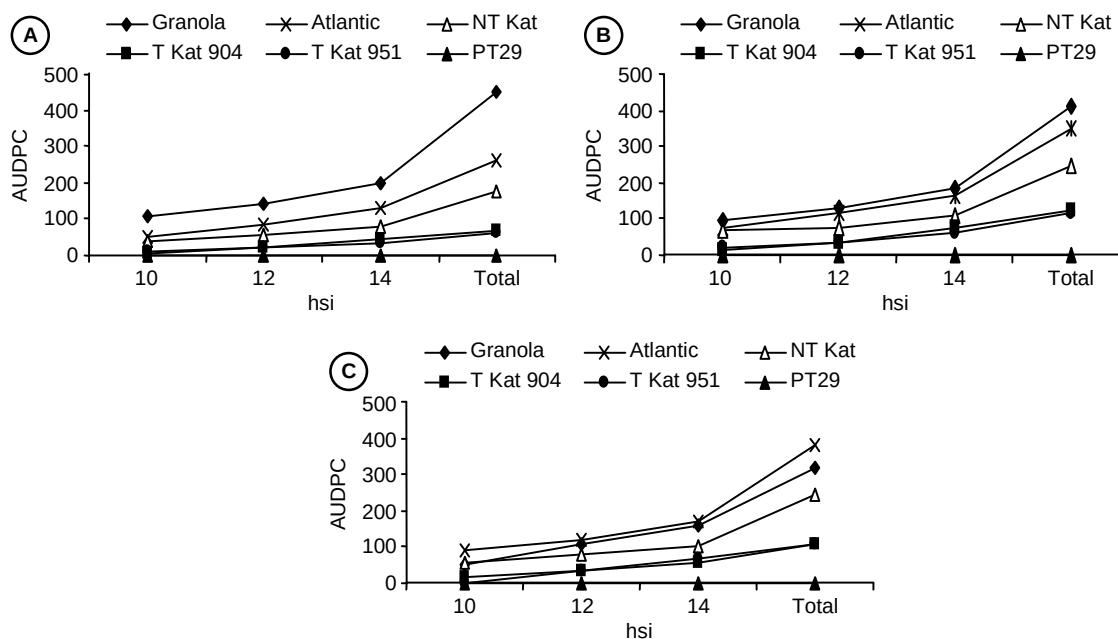
Gejala serangan *P. infestans* ditampilkan pada Gambar 4. Pada permukaan bawah daun tanaman Katahdin non transgenik, Granola, dan Atlantic tampak masa sporangia berwarna putih, sedangkan pada tanaman transgenik Katahdin SP904, SP951, dan *S. bulbocastanum* masih menunjukkan kategori tahan.



Gambar 1. Respon tanaman kentang pada 14 hari setelah inokulasi, berdasarkan skor ketahanan untuk masing-masing isolat *P. infestans*, di *mist chamber*. T = tanaman transgenik; NT = tanaman non transgenik. Huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata pada taraf 5% pada uji LSD.



Gambar 2. Respon tanaman kentang pada 14 hari setelah inokulasi, berdasarkan intensitas penyakit masing-masing isolat *P. infestans*, di *mist chamber*. T = tanaman transgenik; NT = tanaman non transgenik.



Gambar 3. Kumulatif serangan hawar daun pada tanaman kentang yang diinokulasi dengan A = isolat Pasir Sarongge, B = isolat Pangalengan, dan C = isolat Galunggung. T = tanaman transgenik; NT = tanaman non transgenik.

Tabel 1. Analisis korelasi antar peubah yang diamati, untuk efikasi gen *RB* pada tanaman kentang dengan tiga isolat *P. infestans*, di *mist chamber*.

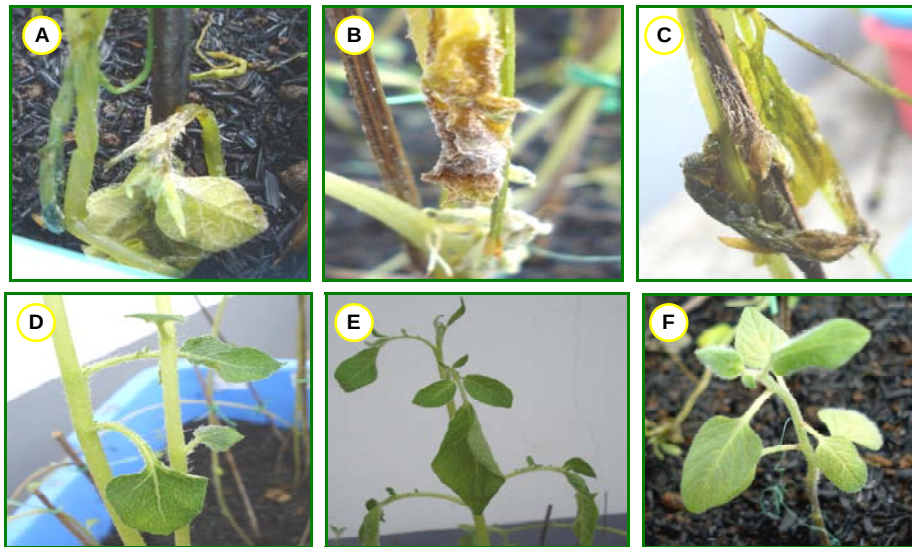
	Skor ketahanan	Intensitas penyakit	AUDPC
Periode inkubasi (hari)	0,925*	-0,927*	-
Periode pengamatan (hsi)	-0,715**	0,713**	0,745**
Skor ketahanan	-	-0,999**	-0,952**
Intensitas penyakit		-	0,955**
AUDPC			-

hsi = hari setelah inokulasi, *terdapat korelasi nyata ($P < 0,05$), **terdapat korelasi yang sangat nyata ($P < 0,01$) menurut Korelasi Pearson.

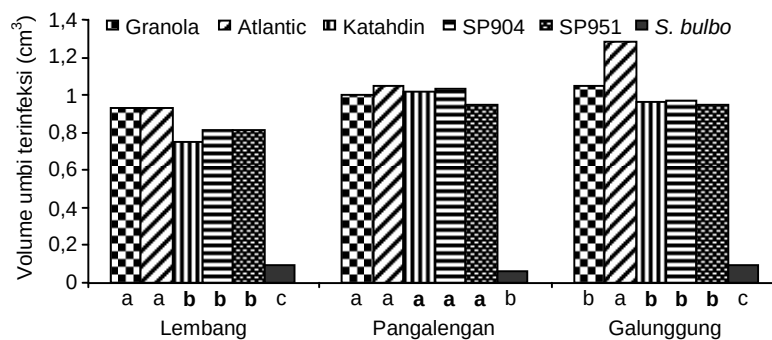
Evaluasi Efikasi Gen *RB* pada Umbi Tanaman Transgenik

Volume umbi terinfeksi yang dihitung menggunakan rumus Halterman *et al.* (2008), diasumsikan sebagai penyebaran patogen yang sama atau merata untuk semua arah pada permukaan umbi. Pengamatan 10 hsi menunjukkan bahwa volume umbi yang terinfeksi *P. infestans* pada transgenik Katahdin SP904 dan SP951 tidak berbeda nyata dibandingkan dengan Katahdin non transgenik (Gambar 5). Inokulasi dengan isolat Lembang mengakibatkan volume serangan pada umbi sebesar 0,75; 0,81; dan 0,81 cm^3 , masing-masing untuk Katahdin non transgenik, transgenik Katahdin SP904 dan SP951. Demikian pula ketika diinokulasi dengan isolat Pangalengan dan Galunggung, tidak terdapat perbedaan nyata antara tanaman non transgenik dengan transgenik. Inokulasi dengan isolat Pangalengan menyebabkan volume serangan pada umbi sebesar 1,02; 1,03; dan 0,95 cm^3 , masing-masing untuk Katahdin non transgenik, transgenik Katahdin SP904

dan SP951. Umbi tanaman transgenik Katahdin SP904 dan SP951 yang diinokulasi dengan isolat Galunggung menunjukkan volume serangan 0,97 dan 0,95 cm^3 , sedangkan Katahdin non transgenik menunjukkan volume serangan 0,96 cm^3 . Hal ini mengindikasikan bahwa tanaman transgenik Katahdin yang mengandung gen *RB*, tidak mempunyai ketahanan pada umbi yang melebihi tanaman non transgeniknya. Respon ketahanan umbi tanaman transgenik bahkan tidak berbeda nyata bila dibandingkan dengan umbi Granola dan Atlantic, yang diinokulasi dengan isolat Pangalengan, dan umbi Granola yang diinokulasi dengan isolat Galunggung. Hal ini menunjukkan bahwa gen *RB* pada umbi tidak menunjukkan efikasinya terhadap ketiga isolat uji. Namun demikian, respon ketahanan umbi dari semua tanaman uji termasuk tanaman transgenik, berbeda nyata bila dibandingkan *S. bulbocastanum* yang mempunyai rata-rata volume umbi terinfeksi sebesar 0,06-0,09 cm^3 . *S. bulbocastanum* adalah spesies kentang liar diploid dari Meksiko, yang mengandung gen ketahan-



Gambar 4. Gejala serangan hawar daun pada daun tanaman kentang setelah 12 hari diinokulasi dengan isolat *P. infestans*, pada A = Granola, B = Atlantic, C = Katahdin non transgenik, D = transgenik Katahdin SP904, E = transgenik Katahdin SP951, dan F = *S. bulbocastanum* PT29.



Gambar 5. Respon umbi kentang berdasarkan volume umbi terinfeksi, terhadap masing-masing isolat *P. infestans* pada 10 hari setelah inokulasi di *mist chamber*. Huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata pada taraf 5%.

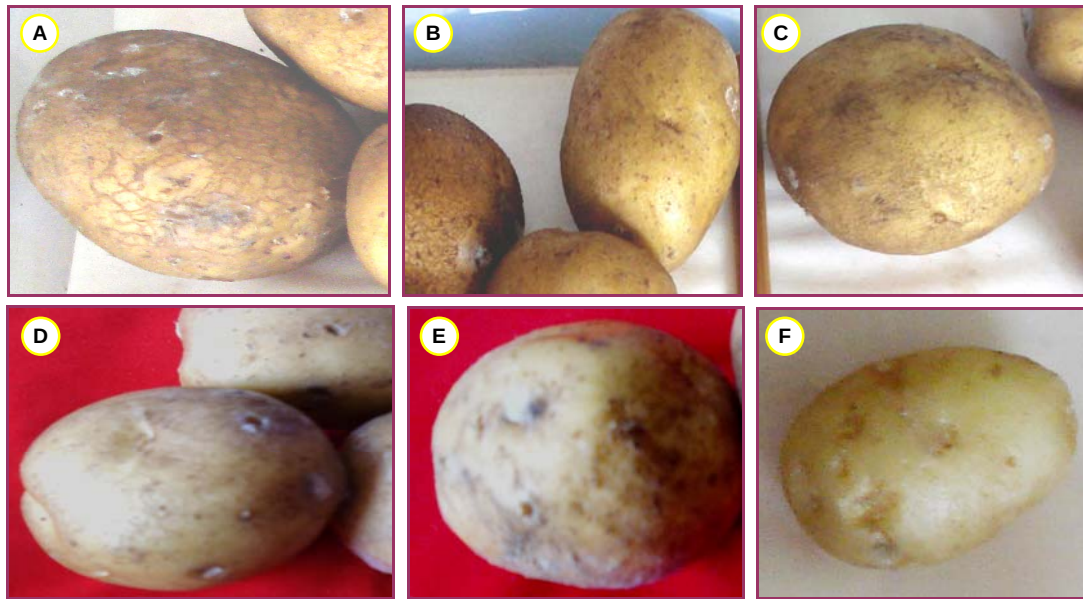
an terhadap *P. infestans*. Gen *RB* yang diisolasi dari *S. bulbocastanum* bersifat *broad-spectrum* terhadap berbagai ras *P. infestans* di Amerika Serikat (Song *et al.*, 2003).

Gejala serangan *P. infestans* pada umbi tanaman kentang ditampilkan pada Gambar 6. Umbi tanaman transgenik maupun non transgenik menunjukkan adanya masa sporangia berwarna putih di sekitar lubang tusukan yang diinokulasi dengan *P. infestans*.

Hilangnya fenotipe ketahanan pada umbi bukan disebabkan oleh transkripsi spesifik jaringan dari gen *RB*, tetapi kemungkinan disebabkan rendahnya level transkripsi di umbi (Halterman *et al.*, 2008). Gen *RB* ditranskripsi secara konstitutif (Bradeen *et al.*, 2009; Kramer *et al.*, 2009) seperti halnya dengan gen-gen *R* yang termasuk dalam kelas NBS-LRR, di mana transkripsi terjadi sepanjang perkembangan tanaman. Ketahanan tanaman semakin menurun dengan bertam-

bahnya umur fisiologis tanaman, sehingga pada saat pembentukan umbi level ketahanan tanaman mulai berkurang (Millett dan Bradeen, 2007; Millett *et al.*, 2009).

Hasil yang diperoleh dari penelitian ini sesuai dengan yang dilaporkan Halterman *et al.* (2008). Tanaman transgenik Katahdin dengan gen *RB* menunjukkan ketahanan terhadap *P. infestans* pada daun, tidak menunjukkan peningkatan ketahanan pada umbi bila dibandingkan dengan tanaman non transgeniknya. Simko *et al.* (2006) dalam penelitiannya mendapatkan gen yang berbeda untuk mengendalikan ketahanan pada daun dan umbi tanaman kentang. Empat lokus ketahanan umbi yang ada pada kromosom 10, 8, 6, dan 2 tidak ada yang berkaitan dengan lokus ketahanan pada daun pada kromosom 3, 4, 5 (Brouwer *et al.*, 2004; Costanzo *et al.*, 2005), serta kromosom 7 dan 11 (Costanzo *et al.*, 2005). Liu dan Halterman (2009)



Gambar 6. Gejala serangan hawar daun pada umbi kentang setelah 10 hari diinokulasi dengan isolat *P. infestans*, pada A = Granola, B = Atlantic, C = Katahdin non transgenik, D = transgenik Katahdin SP904, E = transgenik Katahdin SP951, dan F = *S. bulbocastanum* PT29.

mengevaluasi beberapa aksesori kentang liar *Solanum verrucosum* dan menyatakan bahwa ketahanan pada daun dan umbi dikendalikan oleh mekanisme genetik yang berbeda. Sebaliknya, Stewart *et al.* (1994) mendapatkan adanya korelasi antara ketahanan daun dan umbi. Klon-klon yang mempunyai ketahanan pada daun juga menunjukkan ketahanan pada umbi.

Dalam pemuliaan kentang, kombinasi ketahanan yang tinggi dan stabil pada daun dengan ketahanan pada umbi, dapat mengurangi risiko infeksi umbi. Seleksi ketahanan yang paling efektif adalah menyeleksi klon untuk ketahanan daun, kemudian menguji klon-klon tahan ini untuk ketahanan umbi di rumah kaca. Gen *RB* pada tanaman transgenik Katahdin SP904 dan SP951 menunjukkan efikasinya terhadap ketiga isolat yaitu Pasir Sarongge, Pangalengan, dan Galunggung. Tanaman transgenik ini lebih tahan terhadap serangan *P. infestans* dibandingkan dengan tanaman Katahdin non transgenik, Granola, dan Atlantic. Efikasi gen *RB* juga didukung oleh penelitian di LUT pada tahun 2008, di mana galur-galur persilangan tanaman transgenik Katahdin SP904 dan SP951 dengan non transgenik Granola maupun Atlantic, yang telah positif mengandung gen *RB*, mempunyai ketahanan yang lebih tinggi dibandingkan dengan tanaman transgeniknya (Ambarwati, 2010). Usaha lain untuk memanfaatkan gen *RB* dari *S. bulbocastanum* dapat dilakukan melalui hibridisasi somatik, tetapi masih memerlukan beberapa kali silang balik. *S. bulbocastanum* bersifat diploid, sehingga secara seksual tidak kompatibel disilangkan dengan varietas kentang komersial tetraploid.

KESIMPULAN

Efikasi gen *RB* pada daun tanaman transgenik, setelah 14 hari diinokulasi dengan isolat Pasir Sarongge, Pangalengan, dan Galunggung, menunjukkan bahwa gen *RB* mampu mengurangi intensitas penyakit hawar daun. Transgenik Katahdin SP904 dan SP951 menunjukkan intensitas penyakit 19,8-43,8%, sedangkan Katahdin non transgenik, Granola, dan Atlantic menunjukkan intensitas penyakit 46,9-100%.

Efikasi gen *RB* pada umbi tanaman transgenik, setelah 10 hari diinokulasi dengan isolat Lembang, Pangalengan, dan Galunggung, menunjukkan bahwa gen *RB* tidak mampu mengurangi intensitas penyakit hawar daun. Volume umbi terinfeksi pada transgenik Katahdin SP904, transgenik Katahdin SP951 tidak berbeda nyata dengan Katahdin non transgenik, yaitu masing-masing sebesar 0,93; 0,91; dan 0,91 cm³.

Pada tanaman transgenik Katahdin SP904 dan SP951, gen *RB* menunjukkan efikasinya pada daun, tetapi tidak menunjukkan efikasinya pada umbi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada ibu Deden Suarsih, yang telah banyak membantu dalam pelaksanaan penelitian Laboratorium dan di *mist chamber*, Balitsa, Lembang.

DAFTAR PUSTAKA

- ABSP II. 2006. Quarterly Report. The Development of Late Blight Resistant Potato. ICABIOGRAD-IVEGRI-ABSP II.
- Agrios, G.N. 1997. Plant Pathology. Fourth Edition. Academic Press. p. 248-278.
- Alexopoulos, C.J., C.W. Mims, and M. Blackwell. 1996. Introductory Mycology. John Wiley and Sons, New York. p. 687, 717-720.
- Ambarwati, A.D. 2010. Pemanfaatan gen *RB* dalam pengembangan tanaman kentang tahan penyakit hawar daun (*Phytophthora infestans*). Disertasi S3. Program Studi Agronomi. Institut Pertanian Bogor. 131 hlm.
- Bradeen, J.M., M. Iorizzo, D.S. Molloy, J. Raasch, L.C. Kramer, B.P. Millet, S. Austin-Phillips, J. Jiang, and D. Carpato. 2009. Higher copy numbers of the potato *RB* transgene correspond to enhanced transcript and late blight resistance levels. J. Molecular Plant Microbe Interactions 22(4):437-446.
- Brouwer, D.J., E.S. Jones, and D.A. St. Clair. 2004. QTL analysis of quantitative resistance to *Phytophthora infestans* (late blight) in tomato and comparison with potato. Genome 47:475-492.
- Colton, L.M., H.I. Groza, S.M. Wielgus, and J. Jiang. 2006. Marker-assisted selection for the broad-spectrum potato late blight resistance conferred by gene *RB* derived from a wild potato species. Crop Sci. 46:589-594.
- Costanzo, S., I. Simko, B.J. Christ, and K.G. Haynes. 2005. QTL analysis of late blight resistance in a diploid potato family of *Solanum phureja* x *S. stenotomum*. Theor. Appl. Genet. 111:609-617.
- Flier, W.G., L.J. Turkensteen, G.B.M. van den Bosch, P.F.G. Vereijken, and A. Mulder. 2001. Differential interaction of *Phytophthora infestans* on tubers of potato cultivars with different levels of blight resistance. Plant Pathol. 50(3):292-301.
- Halterman, D.A., L.C. Kramer, S. Wielgus, and J. Jiang. 2008. Performance of transgenic potato containing the late blight resistance gene *RB*. Plant Disease 92:339-343.
- Hariyadi, Y. dan Koentjoro. 1996. Penampakan galur-galur kentang (*Solanum tuberosum* L.) resisten terhadap penyakit hawar daun (*Phytophthora infestans* Mont.d.By). Prosiding Simposium Pemuliaan Tanaman IV; UPN Jatim, 24-25 Mei 1996. hlm. 241-248.
- Henfling, J.W. 1979. Late blight of potato: *Phytophthora infestans*. Technical Information Bulletin. International Potato Center, Lima, Peru. p. 13.
- Herman, M. 2008. Status penelitian tanaman PRG di Indonesia. Dalam B. Purwantara dan M. Thohari (eds.) Tanaman Produk Rekayasa Genetik dan Kebijakan Pengembangannya. 1:85-106.
- Hermesen, J.G.T. and A.J.E. de Boer. 1971. The effect of colchicine treatment on *Solanum acaule* and *S. bulbocastanum*: A complete analysis of ploidy chimerasin *S. bulbocastanum*. Euphytica 20:171-180.
- Kirk, W.W., K.J. Felcher, D.S. Douches, B.A. Niemira, and R. Hammerschmidt. 2001. Susceptibility of potato (*Solanum tuberosum* L.) foliage and tubers to the US8 genotype of *Phytophthora infestans*. Amer. J. Potato Res. 78:319-322.
- Kuhl, J.C., K. Zarka, J. Coombs, W.W. Kirk, and D.S. Douches. 2007. Late blight resistance of *RB* transgenic potato lines. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 132(6):783-789.
- Kusmana. 2003. Evaluasi beberapa klon kentang asal stek batang untuk uji ketahanan terhadap *Phytophthora infestans*. J. Hort. 13(4):220-228.
- Kramer, L.C., M.J. Choudoir, S.M. Wielgus, P.B. Bhaskar, and J. Jiang. 2009. Correlation between transcript abundance of the *RB* gene and the level of the *RB*-mediated late blight resistance in potato. MPMI 22(4):447-455.
- Landeo, J.A. 1999. Data processing and interpretation of resistance parameters. CIP (unpublished).
- Liu, Z. and D. Halterman. 2009. Different genetic mechanisms control foliar and tuber resistance to *Phytophthora infestans* in wild potato *Solanum verrucosum*. Am. J. Pot. Res. 86:476-480.
- Miller, P.M. 1955. V-8 juice agar as a general purpose medium for fungi and bacteria. Phytopathology 45:461-462.
- Millett, B.P. and J.M. Bradeen. 2007. Development of allele-specific PCR and RT-PCR assays for clustered resistance genes using a potato late blight resistance as a model. Theor. Appl. Genet. 114:501-513.
- Millett, B.P., D.S. Molloy, M. Iorizzo, D. Carpato, and J.M. Bradeen. 2009. Changes in disease resistance phenotypes associated with plant physiological age are not caused by variation in R gene transcript abundance. MPMI 22(3):362-368.
- Naess, S.K., J.M. Bradeen, S.M. Wielgus, G.T. Haberlach, J.M. Mc Grath, and J.P. Helgeson. 2000. Resistance to late blight in *Solanum bulbocastanum* is mapped to chromosome 8. Theor. Appl. Genet. 101:697-704.
- Platt, H.W. and G. Tai. 1998. Relationship between resistance to late blight in potato foliage and tubers of cultivars and breeding selections with different resistance levels. Amer. J. Potato Res. 75:173-178.
- Simko, I., S. Costanzo, V. Ramanjulu, B.J. Christ, and K.G. Haynes. 2006. Mapping polygenes for tuber resistance to late blight in a diploid *Solanum phureja* x *S. stenotomum* hybrid population. Plant Breeding 125:385-389.
- Song, J., J.M. Bradeen, S.K. Naess, J.A. Raasch, S.W. Wielgus, G.T. Haberlach, J. Liu, H. Kuang, S. Austin-Phillips, C.R. Buell, J.P. Helgeson, and J. Jiang. 2003. Gene *RB* cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight. Proc. Natl. Acad. Sci. 100:9128-9133.
- Stewart, H.E., J.E. Bradshaw, and R.L. Wastie. 1994. Correlation between resistance to late blight in foliage and tubers in potato clones from parents of contrasting resistance. Potato Res. 37:429-434.
- Wastie, R.L. 1991. Breeding for resistance. In D.S. Ingram and P.H. Williams (eds.) Advances in Plant Pathology. *Phytophthora infestans* the Cause of Late Blight in Potato 7:193-224.