

ISOLASI DAN REGENERASI PROTOPLAS DARI MESOFIL DAUN KENTANG (*Solanum tuberosum* L) DIHAPLOID¹⁾

(*Isolation and Regeneration of Dihaploid Potato (Solanum tuberosum L.)
Mesophyl Protoplast*)

Agus Purwito, G.A. Wattimena, Antonius Suwanto,
Inez H.S. Loeddin Suharsono, Hajrial Aswidinnoor

ABSTRACT

The isolation and regeneratin of potato (Solanum tuberosum L) protoplasts have been carried out. Mesophyl cell protoplast were isolated from two dihaploid cultivars of potato BF 15 and SVP 10 leaves used four different enzymes solution. Protoplast were cultured onto four different cultures media to increase plating efficiency. Calli were then transferred to ten different regeneration media. Using cellulase RS 0.5 % and pectolyase Y-23 0.05 % protoplast yield of both cultivars were improved. Medium VKM supplemented with 0.2 mg/l 2, 4-D, 1.0 mg/l NAA and 0.5 mg/l zeatin or 2iP were increase recovery of colonies from protoplast up to 5.9 %. Regeneration medium containing zeatin did always produce more shoots than those of 2iP. Genotype-dependant regeneration frequencies have also been showed in this experiments.

RINGKASAN

Percobaan dilaksanakan untuk mengisolasi dan meregenerasikan protoplas tanaman kentang (*Solanum tuberosum* L.). Protoplas yang berasal dari sel mesofil daun tanaman kentang kultivar BF 15 dan SVP10 diisolasi dengan menggunakan empat larutan enzim yang berbeda. Protoplas kemudian dikulturkan kedalam empat jenis media untuk meningkatkan efisiensi penaburan. Kultur yang terbentuk kemudian ditransfer dalam 10 jenis media regenerasi. Penggunaan enzim cellulase RS 0.5 % dan pectolyase Y-23 0.05 % dapat meningkatkan produksi protoplas pada kedua kultivar. Medium VKM yang ditambah dengan 0.2 mg/l 2,4-D, 1.0 mg/l NAA dan 0.5 mg/l zeatin atau 0.5 mg/l 2ip dapat meningkatkan existensi penaburan sampai 5.9 %. Medium regenerasi yang mengandung zeatin selalu menghasilkan tunas yang lebih banyak dibandingkan 2ip. Pada percobaan ini terlihat bahwa kultivar sangat berpengaruh dalam keberhasilan regenerasi.

PENDAHULUAN

Kentang (*Solanum tuberosum* L) selain sebagai sayuran juga merupakan tanaman pangan penting di dunia yang menghasilkan berat kering tertinggi per hektar. Tanaman kentang juga dikenal sebagai tanaman yang mudah terserang hama, penyakit dan cekaman lingkungan (Bajaj dan Sapory, 1986). Tanaman kentang tercatat

mempunyai 266 jenis hama dan penyakit yang terdiri dari 23 jenis virus, 38 cendawan, 6 bakteri, 2 mikoplasma, 68 nematoda dan 128 insekta (Mandoza, 1987). Hal ini menjadikan tanaman kentang sering menjadi tanaman model dalam manipulasi genetik secara *in vitro*.

Penggunaan protoplas sebagai wahana dalam manipulasi genetik mensyaratkan efisiensi dalam isolasi protoplas dan regenerasinya menjadi tanaman (Bajaj, 1977; Thomas, 1981; Takabe *et al.*, 1971), apalagi keberhasilan isolasi dan

¹⁾ Bagian dari Disertasi S3 dari penulis pertama

regenerasinya sangat tergantung kultivarnya (Thomas, 1988; Tan, 1987; Shepard, 1982; Sihachakr *et al.*, 1988; Serraf *et al.*, 1991; Mollers *et al.*, 1992; Bokelman dan Roest, 1983). Protoplas yang dapat diregenerasikan dapat merupakan sumber variasi somaklonal yang tinggi (Bajaj, 1977; Carlberg *et al.*, 1987; Cocking, 1960), sebagai bahan transformasi genetik (Nishiguchi *et al.*, 1986; Wei *et al.*, 1986) dan sebagai tetua fusi (Sihachakr *et al.*, 1988; Hunt dan Hegelson, 1987; Austin *et al.*, 1985; Hunt dan Hegelson, 1989).

Kultivar dihaploid sangat penting artinya sebagai tetua dalam fusi protoplas agar supaya menghasilkan produk fusi tetraploid yang mempunyai heterosigositas yang tinggi (Mollers *et al.*, 1992; Bajaj, 1977; Serraf *et al.*, 1988; Nelson, 1983). Salah satu masalah dalam fusi protoplas adalah ketidak mampuan produk fusi dapat diregenerasikan (Binding *et al.*, 1982; Kao, 1981; Austin *et al.*, 1985). Protoplas dari beberapa kultivar yang dapat diregenerasikan menjadi tanaman menjadi sangat memungkinkan produk fusinya pun dapat diregenerasikan pula (Serraf *et al.*, 1988; Sihachakr *et al.*, 1987; Tan, 1987; Upadya, 1975).

Dari beberapa kultivar kentang dihaploid, kultivar SVP 10 (Mattheij dan Puite, 1992), BF15 (HI) (Chaput *et al.*, 1990) adalah kultivar dihaploid yang telah diseleksi mempunyai nilai agronomis yang tinggi. Fusi protoplas antar kedua kultivar tersebut kemungkinan besar akan didapatkan kultivar hibrid baru yang unggul.

Disini dilaporkan tentang teknik isolasi mesofil daun kentang (*Solanum tuberosum*) yang

efisien dan regenerasinya menjadi tanaman.

BAHAN DAN METODE

Sumber protoplas

Dua klon kultivar kentang dihaploid SVP10 (SH83-81-47) berasal dari Dr. G.J.H. Grubben (CPRL-DLO, Belanda) dan BF15 (HI) berasal dari Prof. Dr. G. Duereux (Laboratoire Morphogenese Vegetale Experimentale, Univ. Paris Sud XI, Perancis) diperbanyak secara *in vitro* melalui penanaman tunas samping dalam medium dasar MS (Murashige dan Skoog, 1962) yang ditambah vitamin (Morel dan Wetmore, 1951), 2% (w/v) sukrosa dan dipadatkan dengan 0.7% agar.

Isolasi Protoplas

Protoplas diisolasi menurut metode yang dipergunakan oleh Sihachakr *et al.* (1988). Singkatnya daun diambil dari tanaman *in vitro* yang berumur 4-5 minggu digores permukaan abaxialnya setiap satu milimeter kemudian direndam dalam larutan enzim yang terdiri dari garam CPW (Cell Protoplast Washing) (Fearson *et al.*, 1973), 9.1% (w/v) mannitol, 0.05 (w/v) buffer 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES) dan 4 jenis larutan enzim (E1, E2, E3 dan E4) seperti terlihat pada tabel 1. Inkubasi dilakukan dalam gelap pada suhu 27°C selama 16 jam. Pelepasan protoplas dilakukan melalui penyaringan pada kain nilon (100 µm mesh) yang diteruskan dengan sentrifugasi 55 x g selama 5 menit. Supernatan dibuang, pelet diencerkan dengan

Tabel 1. Larutan enzim yang digunakan untuk isolasi protoplas

No.	Larutan enzim	Komposisi
1.	E1	Cellulase R-10 0.8 %, macerozyme 0.2 %
2.	E2	Cellulase RS 1.5 %, pectolyase Y-23 0.05 %, hemicellulase 0.2 %
3.	E3	Cellulase RS 0.5 %, pectolyase Y-23 0.05 %
4.	E4	Cellulase R-10 1.5 %, macerozyme 0.5 %

Ket : Cellulase R-10, cellulase RS, macerozyme diproduksi oleh Yakult Honsha Co, Jepang, Pectolyase Y-23 diproduksi oleh Seishin Pharmaceutical Co, Jepang, Hemicellulase diproduksi oleh Sigma Chemical Co, Amerika Serikat.

Tabel 2. Medium regenerasi yang dipergunakan

Bahan	A ¹⁾ (mg/l)	B ²⁾ (mg/l)	C ³⁾ (mg/l)	D ⁴⁾ (mg/l)	E ⁵⁾ (mg/l)
Media Dasar	MS + 1 g/l NH ₄ NO ₃	MS	MS	MS	SKM+1.6 g/l NH ₄ NO ₃ 0.5xFeSO ₄ 0.5xKH ₂ PO ₄ 0.5xKCl
Sukrosa (g/l)	20 g	20 g	20 g	20 g	20 g
Inositol	100	100	100	100	100
Asam folat	-	-	0.5	0.5	0.2
Glisin	0.5	-	2.0	2.0	-
Biotin	0.05	-	0.05	0.05	0.005
Asam Nicotinat	5	-	5.0	5.0	5.0
Thiamin-HCl	0.5	-	0.5	0.5	2.0
NH ₄ Cl	-	-	267.5	-	-
Pyridoxine-HCl	0.5	-	0.5	0.5	0.5
Mannitol (g/l)	15	-	36.4	36.4	25
C.H (mg/l)	-	-	100	1000	100
ADS (mg/l)	-	-	80	40	30
NAA (mg/l)	-	-	-	-	0.02
GA ₃ (mg/l)	0.2	-	-	-	0.1
Zeatin (mg/l)	1	2	2.5	0.5	2
BA (mg/l)	0.5	-	-	-	0.25
IAA (mg/l)	0.5	0.1	0.1	0.1	-
MES	-	-	-	5mM	-
Agar (%)	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
pH	5.7-5.8	5.7-5.8	5.7-5.8	5.7-5.8	5.7-5.8

CH : casein hydrolisate; ADS: adenine sulphate, Media F=medium A, medium G=medium B, medium H=medium C, medium I=medium D, medium J=medium E, akan tetapi zeatin diganti dengan 2iP (2-isopentenil) dengan konsentrasi yang sama.

Keterangan : 1) modifikasi medium Mollers *et al.*, (1992), 2) medium Sihachakr *et al.*, (1988), 3) modifikasi medium Haberlach *et al.*, (1985), 4) medium Serraf *et al.*, (1991) dan 5) modifikasi medium Hunt dan Hegelson (1989).

larutan CPW ditambah 21 % (w/v) sukrosa kemudian disentrifugasi pada 120 x g selama 10 menit. Protoplas yang mengapung diambil dan dicuci dua kali dengan larutan CPW ditambah 0.5 M mannitol dan 0.5 mM CaCl₂ melalui sentrifugasi masing-masing 120 x g selama 10 menit. Pada saat dikulturkan, protoplas ditentukan kerapatannya menjadi 3 x 10⁴ protoplas/ml.

Kultur protoplas dan regenerasi tanaman

Kultur protoplas dilakukan menurut metode yang dilakukan oleh Chaput *et al.* (1990). Sebanyak 0.5 ml protoplas yang sudah ditentukan kerapatannya dilarutkan dalam 6 ml medium VKM (Binding, 1975) yang ditambah 250 mg/l PEG 6000, 3.3 % (w/v) glukosa dan 3.2 % (w/v) mannitol sebagai osmotikum dan 0.05 % (w/v) MES buffer dengan komposisi zat pengatur tumbuh sebagai

Tabel 3. Pengaruh ada tidaknya sirkulasi udara pada kultur terhadap jumlah protoplas daun mesofil yang dihasilkan dari inkubasi 4 jenis enzim yang berbeda pada 2 kultivar kentang dihaploid

Larutan Enzim	Rendamen Protoplas ($\times 10^6$ protoplas/g berat basah daun)			
	Sirkulasi Udara		Tanpa Sirkulasi Udara	
	BF15 (HI)	SVP10	BF15 (HI)	SVP10
E1	1.15 \pm 0.21	0.97 \pm 0.35	0.11 \pm 0.09	0.07 \pm 0.05
E2	4.71 \pm 1.27	3.66 \pm 2.44	0.25 \pm 0.11	*)
E3	4.55 \pm 1.55	3.45 \pm 1.78	0.22 \pm 0.16	0.10 \pm 0.09
E4	1.07 \pm 0.79	1.55 \pm 0.99	0.07 \pm 0.04	*)

Ket : Isolasi protoplas masing-masing dilakukan 3 kali. *) tidak dilakukan

berikut : medium M1 : 0.2 mg/l 2.4-D, 0.5 mg/l zeatin, 1 mg/l NAA (Sihachakr *et al*, 1988), medium M2 : 0.2 mg/l 2.4-D, 0.5 mg/l BAP, 1 mg/l NAA (modifikasi Sihachakr *et al*, 1988), medium M3 : 1 mg/l NAA, 0.4 mg/l BAP (Kao, 1981) dan medium M4 : 0.25 mg/l NAA, 0.5 mg/l BAP, 0.4 mg/l 2.4-D (Foulger dan Jones, 1986). Protoplas diinkubasi dalam gelap pada 27°C selama 7 hari, kemudian diberi penyinaran dengan intensitas 62 μ E/m²/s. Setelah berumur 15 hari, kultur diencerkan 10 kali dengan medium yang sama, tetapi hanya menggunakan satu kombinasi zat pengatur tumbuh menurut Serraf *et al* (1991) yaitu 2 mg/l BAP dan 0.1 mg/l 2.4-D. Untuk merangsang pertumbuhan kali, kultur yang berumur 15 hari setelah pengenceran ditanam dalam medium MS yang ditambah 0.5 mg/l NAA dan 0.5 mg/l zeatin untuk pembesaran kali (Sihachakr *et al*, 1989). Pada medium ini dihitung efisiensi penaburan (*plating efficiency*) yang

didefinisikan sebagai jumlah protoplas yang dapat membentuk koloni setelah berumur 25 hari terhadap jumlah protoplas yang ditaburkan pada awal kultur. Setelah berumur 20-30 hari pada medium pembesaran kali, koloni kali dipindahkan dalam 10 jenis medium regenerasi dengan komposisi seperti pada Tabel 2.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sirkulasi udara yang diberikan pada kultur *in vitro* sangat mempengaruhi pertumbuhan tanaman. Tanaman menjadi lebih vigor, tidak bercabang daun lebih hijau dan lebih lebar sehingga sangat menguntungkan sebagai sumber protoplas. Sebaliknya tanaman yang ditumbuhkan tanpa sirkulasi udara umumnya tumbuh dengan banyak cabang dengan daun dan batang kecil disertai tumbuhnya akar-akar udara (Gambar 1). Pada

Tabel 4. Efisiensi penaburan (*plating efficiency*) dari protoplas kentang yang dikulturkan pada medium yang berbeda (%) dihitung pada saat kultur berumur 25 hari

Media	BF15 (HI) ¹⁾	SVP10 ¹⁾
M1: 0.2 mg/l 2.4-D, 0.5 mg/l zeatin, 1 mg/l NAA	5.9 \pm 1.4	4.7 \pm 2.2
M2: 0.2 mg/l 2.4-D, 0.5 mg/l BAP, 1 mg/l NAA	4.5 \pm 1.7	2.1 \pm 1.9
M3: 1 mg/l NAA, 0.4 mg/l BAP	0.4 \pm 0.07	0.004 \pm 0.003
M4: 0.25 mg/l NAA, 0.5 mg/l BAP, 0.4 mg/l 2.4-	3.8 \pm 1.12	1.3 \pm 0.7

D

Ket : Isolasi protoplas dilakukan 3 kali, masing-masing 10 petridish pada saat penaburan dengan kerapatan 3×10^4 protoplas/ml, sebanyak 6.5 ml per petridish

Tabel 5. Persentase regenerasi tunas dari kali yang berasal dari protoplas pada 10 jenis media regenerasi pada umur 8 minggu

Media	Kultivar BF15 (HI)	Kultivar SVP10
Media A	23.33 (7/30)	7.41 (2/27)
Media B	41.67 (15/36)	25.93 (7/27)
Media C	27.27 (9/33)	10.00 (3/30)
Media D	7.41 (2/27)	14.81 (4/27)
Media E	18.52 (5/27)	9.10 (3/33)
Media F	13.89 (5/36)	00.00 (0/30)
Media G	25.00 (9/36)	6.67 (2/30)
Media H	23.33 (7/30)	3.33 (1/30)
Media I	00.00 (0/27)	00.00 (0/27)
Media J	6.67 (2/30)	00.00 (0/27)

kultivar BF15 (HI) selain menghasilkan daun yang lebar-lebar beberapa daun yang dihasilkan pada kultur yang bersirkulasi udara dapat membentuk daun trifoliat seperti halnya jika tanaman kentang ditumbuhkan secara *in vivo*. Kultivar SVP 10 yang ditumbuhkan pada kultur yang tidak bersirkulasi udara sebagian besar tidak dapat dijadikan sumber protoplas karena daun yang dihasilkan berukuran kecil sehingga amat sulit penanganannya. Sirkulasi udara dapat diberikan dengan cara menutup tabung kultur dengan kapas atau busa, kemudian pada ruangan kultur diberikan sirkulasi udara dengan menggunakan kipas angin.

Rendamen protoplas yaitu jumlah protoplas yang dihasilkan per gram daun, selain ditentukan oleh enzim yang dipergunakan juga sangat dipengaruhi oleh kualitas daunnya. Daun-daun lebar berwarna hijau tua yang dihasilkan pada kultur yang bersirkulasi udara menghasilkan rendamen jauh lebih tinggi dibandingkan daun-daun yang kecil. Sirkulasi udara dapat meningkatkan rendamen protoplas sampai 10 kali lipat. Inkubasi dalam empat jenis larutan enzim selama 16 jam dalam gelap seperti dilakukan oleh Sihachkr *et al.*, (1989) menghasilkan rendamen yang berbeda-beda (Tabel 3).

Enzim E2 dan E3 menghasilkan protoplas jauh lebih tinggi dibandingkan enzim E1 dan E4. Sedangkan kultivar BF15 menghasilkan protoplas lebih banyak dibandingkan kultivar SVP10. Dilihat

dari komposisi enzimnya, enzim E3 lebih sederhana dan ekonomis dibandingkan enzim E2. Enzim ini hanya mengandung selulase RS 0.5 % dan Pectolyase Y-23 0.05%. Penggunaan larutan enzim menurut Nelson (1983) pada kultivar Desiree, Maris Piper dan King Edward hanya menghasilkan $1.9-2.4 \times 10^6$ Protoplas/ml (Foulger dan Jones, 1986). Hasil penelitian ini serupa dengan hasil yang diperoleh Sihachkar *et al.* (1989) pada *Solanum melongena* dan *Solanum khasianum*. Jika diperiksa viabilitas dengan FDA (*fluorescein diasetate*) menurut Widholm *et al.* (1972), maka 80-90 % protoplas yang dihasilkan adalah viabel.

Pembentukan dinding sel dan awal pembelahan sel merupakan faktor penting yang menentukan pertumbuhan protoplas. Pada kondisi ini kerapatan sel pada awal kultur sangat mempengaruhi (Tan, 1987). Pada kerapatan lebih besar dari 3×10^4 Protoplas/ml, pembentukan dinding sel dan pembelahan sel menjadi terhambat (data tidak dicantumkan). Protoplas pada umumnya membentuk dinding sel pada 24-48 jam setelah penaburan yang ditandai dengan hilangnya bentuk bulat menuju ke oval. Pembelahan sel mulai terjadi 3-5 hari setelah penaburan. Persentase pembelahan pada hari ke-7 yang diamati dari beberapa bidang pandang mikroskop menunjukkan bahwa penggunaan 4 medium yang berbeda menghasilkan persentase pembelahan yang bervariasi dari 32-

47%. Media M1 (0.2 mg/l 2.4D, 0.5 mg/l zeatin dan 1 mg, 1 NAA) menghasilkan persentase pembelahan tertinggi baik pada kultivar BF15 maupun kultivar SVP10.

Setelah kultur berumur 10-15 hari, mikrokalik telah mulai tampak dengan mata telanjang. Pengenceran kultur menjadi 10 kali (Serraf *et al.*, 1991) meningkatkan pertumbuhan kalik dengan cepat. Pindahkan kalik dari medium cair ke medium padat MS ditambah 0.5 mg/l zeatin dan 0.5 ml/l NAA mempercepat pembesaran kalik sampai mencapai diameter 1-4 mm. Pada tahap ini tampak pembentukan nodul-nodul yang meristematik berwarna hijau. Pada tahap ini dihitung jumlah koloni yang tumbuh untuk menentukan efisiensi penaburan (*plating efficiency*). Pada tabel 4 dapat dilihat bahwa media M1 menghasilkan efisiensi penaburan yang tertinggi.

Penggantian zeatin menjadi BA pada konsentrasi yang sama (M2), sedikit menurunkan jumlah protoplas yang tumbuh, sedangkan tidak adanya 2.4-D (M3) amat sangat menurunkan protoplas yang tumbuh. Beberapa penelitian sebelumnya juga menunjukkan hasil yang serupa (Thomas, 1981; Kao, 1977; Tavazza dan Ancora, 1986; Foulger dan Jones, 1986). Zat pengatur tumbuh 2.4-D boleh tidak ditambahkan jika dalam kultur ditambahkan 0.585 g/l MES (Foulger dan Jones 1986). Pada percobaan ini respon ke dua kultivar hampir serupa terhadap 4 jenis media penaburan tersebut, akan tetapi kultivar BF15 lebih banyak menghasilkan kalik dibandingkan kultivar SVP10.

Kalik yang berdiameter 1-4 mm ditransfer ke medium regenerasi. Medium A-F adalah medium yang mengandung zeatin, sedangkan medium F-J adalah medium yang mengandung 2iP. Pada umur dua minggu, kalik pada media A-E berwarna hijau tua yang meristematik, kemudian dua minggu berikutnya mulai generasikan tunas. Tunas yang terbentuk umumnya satu tunas per koloni, walaupun ada beberapa koloni yang menghasilkan banyak tunas. Pada medium F-J, warna kalik kuning kehijauan. Persentase kalik yang beregenerasi berkurang jika

zeatin diganti menjadi 2iP, tunas yang dihasilkan berukuran lebih kecil dan lemah, lebih sedikit dan berwarna kekuningan. Media B (Sihachakr, 1988) adalah media yang menghasilkan tunas terbanyak (tabel 5). Mengganti zeatin pada medium B menjadi 2iP (medium G) masih tetap menghasilkan tunas, tetapi mengganti zeatin pada medium D menjadi medium I tidak dapat menghasilkan tunas.

Respon kultivar BF15 terhadap media regenerasi lebih baik dibandingkan kultivar SVP10. Penggantian zeatin menjadi 2iP, sangat mengurangi regenerasi tunas pada kultivar SVP10. Pada tabel 5 dapat dilihat bahwa hanya medium G dan H saja yang dapat meregenerasikan tunas pada kultivar SVP10. Hasil ini melengkapi percobaan Shepard (1982) bahwa pembentukan tunas dari kalik asal protoplas sangat tergantung pada genotipa. Masson *et al.*, (1987) dapat meregenerasikan protoplas kentang dihaploid kultivar D90 dan D91 yang sulit bergenerasi dengan cara merubah lama penyinaran dan intensitas cahaya selain konsentrasi zat pengatur tumbuh.

Tunas yang terbentuk umumnya tumbuh lambat pada semua medium regenerasi. Pindahkan tunas secara langsung ke media MS tanpa hormon (Sihachakr, 1988) kadang-kadang mengakibatkan kematian tunas atau semakin memperlambat pertumbuhan. Penggunaan medium MS yang ditambah 0.25 mg/l BA dan 0.1 mg/l IAA akan sangat merangsang pertumbuhan tunas, bahkan sel-sel yang meristematik sanggup menghasilkan tunas, sehingga tunas yang terbentuk pada setiap kalik menjadi lebih banyak. Setelah 2-3 minggu pada media tersebut, tunas dapat dipindahkan ke medium MS tanpa hormon untuk perbanyak klonal maupun perakaran.

KESIMPULAN

Percobaan ini telah menghasilkan suatu prosedur isolasi yang efisien dan ekonomis dengan menggunakan larutan enzim E3 yang berisi enzim Cellulase RS 0.5 % dan Pectolyase Y-23 0.5 %. Efisiensi penaburan akan tinggi jika menggunakan media M1 atau M2, sedangkan regenerasi protoplas,

seperti dikemukakan peneliti yang lain, sangat tergantung genotipa. Penggunaan zeatin lebih mendorong regenerasi dibandingkan 2iP. Tunas yang terbentuk pada medium regenerasi akan dapat tumbuh lebih baik jika dipindahkan ke dalam medium MS dengan 0.25 mg/l BA dan 0.1 mg/l IAA dibandingkan langsung dipindahkan pada medium tanpa hormon.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Proyek Hibah Tim, URGE, DIKTI yang berjudul : Merakit kultivar kentang kentang toleran terhadap penyakit regenegasi (PVX, PVY, PLRV), penyakit layu bakteri dan penyakit hawar daun melalui ekstraksi, transformasi dan fusi. (Peneliti Utama : Prof Dr G.A. Wattimena). Ucapan terima kasih kepada Prof Dr G. Ducreux (Univ Paris Sud XI) dan Dr G.J.H. Gubben (CPRO-DLO The Nethernad) yang telah memberikan kultivar kentang dihaploid dan Mrs Chantal Legall, Mrs Annick Ambroise, Mrs Alline Sarvaes teknisi di Universitas Paris Sud XI dan Didi, Asep, Erma, Agus dan Helmi teknisi di Jurusan Budidaya Pertanian dan PAU Bioteknologi-IPB.

DAFTAR PUSTAKA

- Austin, S., M.A. Baer, M.K. Ahlenfeldt, P.J. Kazmierczak, P.J. Helgelson (1985). Interspecific fusion in *Solanum Tuberosum*. *Theor Appl Genet.* 71:72-175.
- Bajaj, Y.P.S. 1977. Protoplas isolation, culture and somatic hybridization, In: Reinert, J and Y.P.S. Bajaj (eds.). *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Springer-Verlag, Berlin, Hedelberg, New York.
- Bajaj, Y.P.S and S.K. Sapory, 1986. biotechnology of potato improvement. In: Bajaj Y.P.S. (ed.) *Biotechnology of plant improvement, Vol.III, Potato*. Spinger, Berlin Heidelberg, New York.
- Binding, H. 1975. Reproducibly high plating efficiencies of isolated protoplasts from shoot cultures of tobacco. *Physiol. Plant.* 35: 225-227.
- Binding, H., S. M. Jain, J. Fingers, G. Mordhorst, R. Nehls and J. Gresel. 1982. Somatic hybridization of an atrazine resistant biotype of *Solanum nigrum* with *Solanum tuberosum*. Part 1: Clonal variation in morphology and in atrazine sensitivity. *Theor. Appl. Genet.* 63: 273-277.
- Bokelmann, G.S. and S. Roest, 1983. Plant regeneration from protoplas of potato (*Solanum tuberosum* L cv Bintje). *Z. Pflanzenphysiol.* 109:259-265.
- Chapat, M.H., D. Sihachakr, G. Ducreux, D. Marie and N. Barghi. 1990. Somatic hybrid plant produce by electrofusion between dihaploid potatoes: BF 15 (H1), Aminca (H6) and Cardinal (H3). *Plant Cell Reports* 9:411-414.
- Calberg, I., S. Karlsson, and T. Eriksson. 1987. Improved culture technique for potato protoplast. In: Bajaj Y.P.S. (ed.) *biotechnology of plant improvement, Vol.III, Potato*. Springer, Berlin Heidelberg, New York.
- Cocking, E.C. 1960. A method for isolation of plant protoplast and vacuola. *Nature* 187: 962-963
- Foulger D. and M.G.K. Jones. 1986. Improved efficiency of genotype - dependent regeneration from protoplasts of important potato cultivars. *Plant Cell reports* 5:72-76.
- Frearson, E. M., J. B. Power, and E.C.Cocking. 1973. The isolation, culture and regeneration of petunia leaf protoplasts. *Dev.Biol.* 33:130-137.

- Haberlach, G. T., B.A.Cohen, N. A. Reichert, M.A.Bear, L.E.Towill, and J.P.Hegelson. 1985. Isolation, culture and regeneration of protoplasts from potato and several related solanum species. *Plant Sci.* 39:67-74.
- Hunt, G.J. and J.P.Hegelson. 1989. A medium and simplified procedure for growing single cell from solanum species. *Plant Sci.* 60: 251-257.
- Kao, K.N. 1981. Plant protoplast fusion and somatic hybrids. In proceedings of symposium on plant tissue culture, Peking, 1978. p.331-339. Pitman Publishing Ltd., London.
- Masson, J.M.Lecerf, P.Rousselle, P. Peremmec, and G.Pelletier. 1987. Plant regeneration from protoplast of diploid potato derived from crosses of *Solanum tuberosum* with wild solanum species. *Plant Sci.* 53:167-176.
- Matteij, W.M. and K.J.Puite. 1992. Tetraploid potato hybrids through protoplast fusion and analysis their performance in the field. *Theor. Appl. Genet.* 83:807-812.
- Mendizá, H.A. 1987. Advance in population breeding and its potensial impact on the efficiency of breeding potatoes for deve-losing countries, p 234-246. In G.J.Jeelis and D.E.Richardson (eds): The production of new potato varieties technology advances. Cambridge Univ. Press, Combridge.
- Mollers, C., S.Zhang, and G.Wenzel. 1992. The influence of silver thiosulfate on potato protoplast culture. *Plant Breeding.* 108: 12-18.
- Morel G. and R.H. Wetmore. 1951. Fern callus tissue culture. *Am.J. Bot.* 38:141-143.
- Murashige, T and F.Skoong. 1962. A rivised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Nelson, R.S. 1983. Plant regeneration from protoplas of *Solanum tuberosum* and *Solanum brevidens*. PhD Thesis, University of Bath UK.
- Nishiguchi, M., T. Sato and F. Motoyoshi, 1987. An inproved method for electroporation in plant protoplast: infection of tobacco protoplast by tobacco mosaic virus particles. *Plant Cell Reports* 6:90-93.
- Serraf, I., D. Sihachakr, N.T.L. Chi, C. Herbreteau, L. Rossignol, and G. Ducreux. 1988. Highrate of plant regeneration from cultured protoplasts of two medician plant : *Solanum khasianum* ait. and *Solanum khasianum* C.B. Clarke. *J. Plant Physiol.* 133:498-501.
- Serraf, I., D. Sihachakr, G. Ducreux, S. Brown, M. Allot, N. Barghi, and L. Rossignol. 1991. Interspecific somatic hybridization in potato by protoplast electrofusion. *Plant Sci.* 76:115-126.
- Shepard, J.F. (1982). Cultivar dependant cultural refinements in potato protoplast regeneration. *Plant Sci Lett.* 26:127-132.
- Sihachakr, D., R. Haicour, M.H.Chaput, E.Barrientos, G. Ducreux, L. Rossignol. 1989. Somatic hybrid plants produced by electrofusion between *Solanum melongena* L. and *Solanum torvum* Sw. *Theor. Appl. Genet.* 77:1:6.
- Sihachakr, D., R. Haicour, I.Serraf, E.Barrientos, C.Herbreteau, G.Ducreux, L.Rossignol, and V. Souvannavong. 1988. Electrofusion for production of somatic hybrid plant of *Solanum melongena* L. and *Solanum khasianum* C.B. Clark. *Plant Sci.* 57:215-223.

- Takabe, I., G.Labib and G.Melchers, 1971. Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplast of tobacco. *Naturwissenschaften* 58:318-320.
- Tan, M.M.C. 1987. Somatic hybridization and cybridisation in some *Solanaceae*. Academisch proefschrift. Vrije Universiteit te Amsterdam.
- Tavazza, R. and G.Ancora, 1986. Plant regeneration from mesophyll protoplasts in commercial potato cultivars (Primura, Kennebec, Spunta, Desiree). *Plant Cell Rep.* 5:243-346.
- Thomas, E. 1981. Plant regeneration from shoot culture-derived protoplasts of tetraploid potato (*Solanum tuberosum* cv. Maris Bard). *Plant Sci. Lett.* 23:81-88.
- Upadya, M.D. 1975. Isolation and culture of mesophyll protoplast of potato (*Solanum tuberosum*). *Potato Res.* 18:438-445.
- Wei, Zhi-Ming, H.Kamada and H.Harada. 1986. Transformation of *Solanum nigrum* L protoplas by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Reports* 5:93-96.
- Widholm, J.M. 1972. The use of flourescein diasetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cell. *Stain Techn.* 47:189-194.