

Pengaruh Auksin dan Sitokinin terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Jaringan Meristem Kentang Kultivar Granola

Karjadi, A.K. dan Buchory A.

Balai Penelitian Tanaman Sayuran, Jl. Tangkuban Parahu 517 Lembang, Bandung 40391
Naskah diterima tanggal 20 Desember 2005 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 19 Maret 2008

ABSTRAK. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Balai Penelitian Tanaman Sayuran mulai bulan Maret sampai September 2004. Perlakuaannya adalah penumbuhan jaringan meristem kentang varietas Granola pada media MS ditambah suplemen sukrose 30 g/l, air kelapa 100 ml/l, CaP 2 mg/l, myoinositol 100 mg/l, agar 6,5 g/l, pH 5,7, serta zat pengatur tumbuh NAA (0,01, 0,05, dan 0,10 mg/l), BAP/2-ip (0,01 dan 0,05 mg/l). Rancangan menggunakan acak lengkap dengan 19 perlakuan dan setiap perlakuan menggunakan 20 tabung reaksi kultur tanaman yang berisi 3 ml media sebagai ulangan. Hasil yang didapat, 18% jaringan meristem dapat tumbuh menjadi plantlet pada umur 15 minggu setelah tanam. Pertumbuhan jaringan meristem dipengaruhi oleh ketersediaan zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin yang ditambahkan ke dalam media. Penambahan NAA atau sitokinin (BAP, 2-ip) secara tersendiri pada berbagai konsentrasi yang tidak dikombinasikan, memberikan pengaruh yang kurang menguntungkan pada pertumbuhan jaringan meristem. Jaringan meristem kentang Granola tumbuh baik pada media yang berisi kombinasi NAA dan BAP.

Katakunci: *Solanum tuberosum*; Jaringan meristem; ZPT; NAA; BAP.

ABSTRACT. Karjadi, A.K and Buchory A. 2008. The Effect of Auxin and Cytokinin on the Growth of Potato Meristem cv. Granola. The experiment was conducted in Tissue Culture Laboratory of Indonesian Vegetable Research Institute from March until September 2004. The treatments were MS medium with supplement of sucrose 30 g/l, coconut water 100 ml/l, CaP 2 mg/l, myoinositol 100 mg/l, agar 6.5 g/l, pH 5.7, and growth hormone of NAA (0.01, 0.05, 0.10 mg/l) and BAP/2-ip (0.01 and 0.05 mg/l). The experiment was arranged in a randomized complete design with 19 medium composition as treatments, and 20 replications of test tube culture with 3 ml medium each treatment. The results showed that 18% of meristem could develop plantlet within 15 weeks after planting. Meristem growth depended on the availability of auxin and cytokinin in the medium. The medium with NAA supplement or cytokinin (BAP, 2-ip) singly, gave negative effect on meristem growth. Granola potato meristem could develop well on combination media of NAA and BAP.

Keywords: *Solanum tuberosum*; Meristem; Growth regulator; NAA; BAP.

Di Indonesia, tanaman kentang merupakan salah satu komoditas yang mendapat prioritas pengembangan, karena produk tanaman ini dapat dipakai sebagai sumber karbohidrat dan mempunyai potensi dalam diversifikasi pangan. Mendukung pengembangan tersebut, diperlukan benih bermutu dan dalam program perbenihan kentang, penggunaan benih bebas patogen mutlak diperlukan. Benih tersebut dapat diperoleh melalui kultur jaringan disertai dengan pengujian patogen secara intensif dan dilanjutkan dengan teknik perbanyakan cepat secara *in vitro* atau *in vivo*.

Teknik kultur jaringan adalah suatu metode untuk mengisolasi bagian dari tanaman, seperti protoplasma, sel, sekelompok sel, jaringan, dan organ, serta menumbuhkannya dalam kondisi aseptik sehingga bagian-bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi

tanaman lengkap (Gunawan 1987). Gemborg dan Skyluk dalam Thorpe (1981), menyatakan bahwa keberhasilan dalam teknologi dan aplikasi metode kultur jaringan erat dengan penyediaan hara yang mencukupi dan sesuai dengan kultur sel ataupun jaringan. Terdapat dua hal yang seringkali sangat menentukan keberhasilan kultur jaringan, yaitu asal eksplan dan media kultur yang dipergunakan.

Prinsip utama teknik kultur jaringan pada tanaman adalah berdasarkan teori sel yang dikemukakan oleh Schwann dan Schleiden dalam Pierik (1987), yaitu setiap unit biologi terkecil yang mempunyai kemampuan untuk beregenerasi membentuk tanaman lengkap. Untuk perbanyakan, dianjurkan menggunakan meristem bersama daun primordia. Sebaliknya, jika tujuan untuk menghilangkan infeksi penyakit sistemik virus, jaringan meristem harus bebas dari daun primordia

dan ukuran eksplan tidak melampaui 0,5 mm (Roca *et al.* 1978, Goodwin *et al.* 1980).

Kultur meristem adalah teknik perbanyakan *in vitro* yang dipergunakan sejak tahun 1950 untuk mendapatkan tanaman bebas penyakit sistemik, terutama virus dari tanaman yang terinfeksi. Eksplan yang dipergunakan adalah titik tumbuh dengan ukuran 0,05-0,1 mm. Bagian meristematik yang diambil untuk keperluan tersebut adalah jaringan meristem pucuk terminal atau aksilar (Casell dan Long 1982, Griffiths *et al.* 1990). Sel-sel jaringan meristematik umumnya stabil, karena mitosis pada sel meristem terjadi bersamaan dengan pembelahan sel yang terus-menerus, sehingga duplikasi DNA yang berlebihan dapat dihindari. Hal ini menyebabkan tanaman yang dihasilkan identik dengan tanaman donor (Brown *et al.* 1988, Stance 1968).

Perbanyakan *in vitro* ini mempunyai beberapa keuntungan bila dibandingkan dengan cara konvensional, yaitu bebas penyakit, dalam waktu relatif singkat dapat dihasilkan tanaman dalam jumlah banyak dan tidak bergantung musim (Gunawan 1987). Teknik kultur jaringan diakui sebagai metode dalam perbanyakan tanaman yang pelaksanaannya meliputi persiapan media, eksplan/bahan tanaman, penanaman, penumbuhan serta aklimatisasi. Media kultur jaringan mengandung unsur-unsur penting berupa garam-garam mineral, sukrose, vitamin, dan zat pengatur tumbuh (ZPT). Bahan-bahan tersebut merupakan bahan esensial untuk pertumbuhan dan perkembangan tanaman.

Dalam kultur jaringan ada 2 golongan ZPT yang sangat penting, yaitu sitokinin dan auksin. Zat pengatur tumbuh ini mempengaruhi pertumbuhan dan morfogenesis dalam kultur jaringan. Auksin banyak digunakan dalam kultur jaringan untuk perpanjangan sel, pembentukan akar adventif, dan menghambat pembentukan tunas adventif dan tunas ketiak, sedang NAA (1-*naphthalene acetic acid*) adalah ZPT yang termasuk dalam golongan auksin.

Sitokinin adalah senyawa turunan adenine dan berperan dalam pengaturan pembelahan sel dan morfogenesis. Sitokinin digunakan untuk merangsang terbentuknya tunas, berpengaruh dalam metabolisme sel, dan merangsang sel dorman serta aktivitas utamanya adalah mendorong pembelahan sel.

Menurut Hu dan Wang (1983), George dan Sherington (1993), pada kultur jaringan, sitokinin berperan dalam mendorong pembelahan sel atau jaringan yang digunakan sebagai eksplan dan merangsang perkembangan pucuk-pucuk tunas. Dalam perbanyakan *in vitro*, sitokinin digunakan untuk mengatasi dormansi apikal dan mempertinggi percabangan tunas lateral dari ketiak daun.

BAP merupakan salah satu sitokinin yang sering digunakan dalam penelitian kultur jaringan. Murashige (1974) menyatakan bahwa 2-ip merupakan sitokinin yang paling efektif dibandingkan dengan sitokinin lainnya. Perbedaan jenis tanaman dan asal eksplan akan mempengaruhi keefektifan ZPT yang digunakan.

Teknik kultur jaringan sangat membantu dalam usaha eliminasi patogen. Dengan metode ini, dipilih bagian-bagian tanaman atau sel-sel yang tidak mengandung patogen terutama virus, kemudian menumbuhkan sel-sel tersebut dan meregenerasikan kembali menjadi tanaman lengkap yang sehat dalam media buatan. Secara konvensional tidak ada cara yang efektif untuk menghilangkan virus dari bahan tanaman.

Kultur meristem adalah salah satu teknik kultur jaringan menggunakan eksplan berupa jaringan-jaringan meristematik. Jaringan meristem yang digunakan dapat berupa meristem pucuk terminal atau meristem aksilar. Dalam kultur meristem perkembangan diarahkan untuk mendapatkan tanaman sempurna dari jaringan meristem tersebut dan bila mungkin sekaligus memperbanyaknya (Gunawan 1987, Espinoza *et al.* 1989).

Dasar dari teknik kultur jaringan adalah teori totipotensi sel yang dikemukakan Haberlandt tahun 1902 (Schilde-Rentschler dan Schmiediche 1984) yang meramalkan adanya kemungkinan untuk mengkultur sel-sel somatik pada media buatan. Hal ini dapat dilakukan dengan memanipulasi media kultur tersebut sedemikian rupa sehingga sel-sel tersebut dapat bereproduksi *in vitro* dan mengalami perkembangan dengan mengikuti tahapan perkembangan yang terjadi pada tumbuhan normal. Perkembangan ini akan menginduksi suatu sel tunggal untuk menjadi suatu tumbuhan yang mampu hidup terus.

Penelitian untuk mengetahui perlakuan yang tepat dari konsentrasi auksin (NAA) dan sitokinin

(BAP, 2-ip) serta pengaruh kombinasi kedua ZPT tersebut terhadap pertumbuhan dan perkembangan jaringan meristem kentang kultivar Granola.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Balai Penelitian Tanaman Sayuran Lembang mulai bulan Maret sampai September 2004 Bahan tanaman adalah jaringan meristem dari tanaman kentang varietas Granola. Media dasar adalah MS (Murashige dan Skoog 1962) yang dimodifikasi dengan menambahkan sukrose 30 g/l, air kelapa 100 ml/l, CaP 2 mg/l, myoinositol 100 mg/l, dan agar 6,5 g/l dengan pH media dipertahankan sekitar 5,7. Perlakuan yang diuji adalah konsentrasi NAA, BAP dan 2-ip yang ditambahkan pada media dasar, yaitu NAA (0,01, 0,05, dan 0,10 mg/l), BAP (0,01 dan 0,05 mg/l), serta 2-ip (0,01 dan 0,05 mg/l).

Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap dengan 19 perlakuan dan ulangan 20 kali (Tabel 1).

Eksplan tunas umbi kentang dicuci dengan air bersih, lalu dicelupkan ke dalam larutan alkohol 70% dan direndam dalam larutan kloroks 15-

20% selama 10-15 menit. Eksplan dibilas dengan akuades steril 3-5 kali dan dipindahkan ke cawan petri steril yang dialasi kertas saring.

Pengambilan jaringan meristem dilakukan di lingkungan steril (*laminar airflow cabinet*) di bawah binokuler/*disecting* mikroskop dengan pembesaran 20-40 kali. Primordia daun yang menutupi jaringan meristem dibuang satu persatu dengan jarum atau pisau skalpel. Kemudian jaringan meristem dengan 2 daun primordia dipotong sampai mencapai ukuran 0,2-0,4 mm dan potongan jaringan tersebut ditanam pada tabung reaksi yang berisi media dasar 3 ml. Kultur diinkubasikan di ruang kultur bersuhu 20-22°C, dengan periode pencahayaan 16 jam terang dan 8 jam gelap. Setiap perlakuan menggunakan 20 tabung kultur meristem. Subkultur ke media perlakuan yang sama dilakukan setelah jaringan meristem berkembang menjadi plantlet atau bergantung dari keadaan media tumbuh kultur.

Pengamatan parameter utama dilakukan terhadap jumlah daun dan tinggi tanaman. Tinggi plantlet diukur dari permukaan media sampai dengan bagian tertinggi dari plantlet. Sedangkan pengamatan penunjang dilakukan terhadap persentase eksplan yang membentuk plantlet. Waktu pengamatan dimulai dari 2 minggu setelah inokulasi (MSI) dan selanjutnya dilakukan pengamatan setiap minggu sampai minggu ke-15.

Data yang terkumpul dianalisis menggunakan uji Scott-Knot.

Tabel 1. Komposisi media penumbuhan jaringan meristem kentang (*The media composition for potato meristem culture*)

Media	Perlakuan (Treatments)
A	MS + NAA 0,01 mg/l
B	MS+ NAA 0,05 mg/l
C	MS+ NAA 0,10 mg/l
D	MS + BAP 0, 01 mg/l
E	MS + BAP 0,05 mg/l
F	MS + 2 – ip 0,01 mg/l
G	MS + 2 – ip 0,05 mg/l
H	MS + NAA 0,01 mg/l + BAP 0,01 mg/l
I	MS + NAA 0,05 mg/l + BAP 0,01 mg/l
J	MS + NAA 0,10 mg/l + BAP 0,01 mg/l
K	MS +NAA 0,01 mg/l + BAP 0,05 mg/l
L	MS + NAA 0,05 mg/l + BAP 0,05 mg/l
M	MS + NAA 0,10 mg/l + BAP 0,05 mg/l
N	MS + NAA 0,01 mg/l + 2 – ip 0,01 mg/l
O	MS + NAA 0,05 mg/l + 2 – ip 0,01 mg/l
P	MS + NAA 0,10 mg/l + 2 – ip 0,01 mg/l
Q	MS +NAA 0,01 mg/l + 2 – ip 0,05 mg/l
R	MS + NAA 0,05 mg/l + 2 – ip 0,05 mg/l
S	MS + NAA 0,10 mg/l + 2 – ip 0,05 mg/l

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini tidak ditemukan kultur yang mati dan tidak terjadi kontaminasi baik oleh bakteri maupun jamur. Hal ini diduga akibat proses sterilisasi berjalan baik dan ukuran eksplan memenuhi syarat. Dalam penumbuhan jaringan meristem, jaringan mati biasanya disebabkan terlalu kecilnya ukuran eksplan, sehingga kemampuan tumbuhnya tidak dapat dipertahankan (Quak 1961). Penyebab lain adalah pemotongan jaringan yang kurang hati-hati sehingga sebagian sel-sel jaringan meristem rusak. Sel-sel tersebut dapat juga mati karena pengaruh panas dari alat-alat yang digunakan pada waktu pemotongan atau penanaman eksplan.

Menurut Gunawan (1987) dan Hu dan Wang (1983), kontaminasi merupakan faktor pembatas dalam keberhasilan kultur jaringan yang dapat berasal dari (1) bahan tanaman baik eksternal maupun internal, (2) organisme kecil yang masuk ke dalam media, (3) botol kultur dan peralatan yang kurang steril, (4) lingkungan kerja dan ruang kultur, dan (5) kecerobohan dalam pelaksanaan.

Dari seluruh eksplan yang ditanam, hanya 18% yang dapat tumbuh menjadi plantlet pada pengamatan 15 MSI. Perlakuan yang mampu mendorong jaringan meristemnya tumbuh menjadi plantlet adalah perlakuan N (NAA 0,01 mg/l dan 2-ip 0,01mg/l). Penumbuhan jaringan meristem untuk tujuan eliminasi penyakit sistemik, diharapkan tidak membentuk kalus. Walaupun demikian, kalus terbentuk pada perlakuan P (NAA 0,10 mg/l dan 0,01mg/l 2-ip), Q (NAA 0,01 mg/l dan 2-ip 0,05 mg/l), R (NAA 0,05 mg/l dan 2-ip 0,05 mg/l), dan S (NAA 0,10 mg/l dan 2-ip 0,05 mg/l).

Warna daun yang terbentuk secara keseluruhan berwarna hijau, tetapi sampai minggu ke-15 ada beberapa plantlet yang daunnya berubah warna menjadi kuning dan akhirnya coklat. Perubahan warna daun tersebut kemungkinan disebabkan oleh kurangnya konsentrasi auksin dalam jaringan tanaman (Hussey dan Stacey 1981, Mellor dan Smith 1967).

Pertumbuhan dan perkembangan eksplan terlihat pada umur 3 MSI, tetapi pertumbuhan tunas dan daun umumnya baru terlihat 6-7 MSI, kecuali pada perlakuan media dengan penambahan ZPT tunggal, NAA, BAP, dan 2-ip. Untuk jumlah daun, perlakuan 2-ip selalu lebih baik dari perlakuan BAP. Jumlah daun terbanyak terdapat pada perlakuan NAA, dan yang paling rendah, yaitu konsentrasi 0,010 mg/l yang dikombinasikan dengan kedua konsentrasi BAP dan 2-ip.

Data Tabel 2 memperlihatkan bahwa dari seluruh perlakuan, hanya 7 perlakuan yang sudah memperlihatkan pertumbuhan batang, yaitu perlakuan I (konsentrasi NAA 0,01 mg/l + BAP 0,010 mg/l) dan N (NAA 0,01 + 2-ip 0,010 mg/l), dengan rerata jumlah daunnya lebih tinggi dari perlakuan lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa perkembangan eksplan bergantung juga pada kandungan hormon endogen yang mampu merangsang pembentukan daun tanpa pengaruh tambahan hormon dari luar. Hasil penelitian Wang dan Huang (1975) serta Roca *et al.* (1978) mengungkapkan bahwa ketepatan ZPT yang ditambahkan sangat penting dalam organogenesis, karena akan terjadi interaksi antara ZPT yang digunakan dengan zat-zat endogen yang terdapat dalam jaringan tumbuhan. Bila tunas tumbuh /muncul pada media dengan konsentrasi sitokinin

Tabel 2. Jumlah daun dan tinggi plantlet umur 15 MSI (*Leaves number and plantlet height at 15 WAI*)

Medium	Perlakuan (<i>Treatments</i>)	Jumlah daun (<i>Leaves number</i>)	Tinggi plantlet (<i>Plantlet height</i>), cm
A	MS + NAA 0,01 mg/l	2,67 d	0,00 d
B	MS+ NAA 0,05 mg/l	3,67 d	0,00 d
C	MS+ NAA 0,10 mg/l	4,67 c	0,00 d
D	MS + BAP 0, 01 mg/l	4,33 c	0,00 d
E	MS + BAP 0,05 mg/l	5,67 c	0,00 d
F	MS + 2 – ip 0,01 mg/l	7,33 b	0,00 d
G	MS + 2 – ip 0,05 mg/l	8,00 b	1,00 c
H	MS + NAA 0,01 mg/l + BAP 0,01 mg/l	12,00 a	2,34 a
I	MS + NAA 0,05 mg/l + BAP 0,01 mg/l	3,00 d	0,00 d
J	MS + NAA 0,10 mg/l + BAP 0,01 mg/l	5,00 c	0,00 d
K	MS +NAA 0,01 mg/l + BAP 0,05 mg/l	10,00 a	2,00 a
L	MS + NAA 0,05 mg/l + BAP 0,05 mg/l	6,00 c	0,67 c
M	MS + NAA 0,10 mg/l + BAP 0,05 mg/l	5,00 c	0,00 d
N	MS + NAA 0,01 mg/l + 2 – ip 0,01 mg/l	10,00 a	1,67 b
O	MS + NAA 0,05 mg/l + 2 – ip 0,01 mg/l	6,00 c	0,00 d
P	MS + NAA 0,10 mg/l + 2 – ip 0,01 mg/l	9,33 a	2,17 a
Q	MS +NAA 0,01 mg/l + 2 – ip 0,05 mg/l	9,33 a	0,67 c
R	MS + NAA 0,05 mg/l + 2 – ip 0,05 mg/l	2,67 d	0,00 d
S	MS + NAA 0,10 mg/l + 2 – ip 0,05 mg/l	5,00 c	0,00 d

rendah (BAP atau 2-ip) berarti ada kemungkinan sudah terdapat sitokinin endogen yang mencukupi, sehingga tidak diperlukan penambahan sitokinin dari luar.

Tanaman tertinggi terdapat pada perlakuan H (NAA 0,010 mg/l + BAP 0,010 mg/l) diikuti oleh K (NAA 0,010 mg/l + BAP 0,05 mg/l) dan P (NAA 0,010 mg/l + 2-ip 0,010 mg/l) kemudian menurun pada perlakuan media dengan penambahan ZPT, NAA, BAP, 2-ip, dan media yang diberi perlakuan NAA 0,05 dan 0,10 mg/l dengan kombinasi 2-ip 0,05 mg/l.

Terlihat juga bahwa pertumbuhan jaringan meristematik pada media yang hanya ditambah auksin atau sitokinin, pertumbuhan dan perkembangan dari eksplan tidak sebaik pada media yang ditambah hormon auksin (NAA) dan sitokinin (BAP) 2-ip. Di sini terlihat bahwa penambahan hormon auksin dan sitokinin dapat merangsang pembelahan sel. Tapi pertumbuhan dari setiap plantlet bervariasi bergantung dari konsentrasi auksin dan sitokinin yang ditambahkan ke media tumbuh.

Plantlet yang tumbuh dan berkembang dari jaringan meristem pada umumnya akan berakar. Pertumbuhan akar pada plantlet kentang sangat dipengaruhi oleh kehadiran ZPT auksin yang relatif tinggi, konsentrasi sitokinin tinggi biasanya akan menghambat pembentukan atau pertumbuhan akar dari plantlet kentang varietas Granola.

KESIMPULAN

1. Penambahan NAA, BAP, dan 2-ip secara tersendiri pada berbagai konsentrasi memberikan pengaruh yang kurang menguntungkan pada pertumbuhan jaringan meristem kentang varietas Granola.
2. Jaringan meristem kentang varietas Granola tumbuh baik pada media yang berisi kombinasi hormon NAA dengan BAP atau 2-ip.

PUSTAKA

1. Brown, C.R., S. Kwiathowski, M.W. Martin, and P.E. Thomas. 1988. Eradication of PVS from Potato Clones Through Excession of Meristems from In Vitro Heat Treated Shoots. *Amer. Pot. J.* 32:558-560.

2. Cassels A.C. and R.D. Long. 1982. The Elimination of Potato Viruses X, Y, S and M in Meristem and Explants Cultures of Potato in the Presence of Virazole. *Potato Res.* 25:165-173.
3. Espinoza, N., R. Lizarraga, D.S. Rodriguez, F. Burton, J. Bryan, and J.H. Dodds. 1989. *Tissue Culture, Micropropagation, Conservation and Export of Potato Germplasm*. CIP. Research Guide I. International Potato Center. Lima Peru. 25 p.
4. George. E.F. and Sherington. 1993. *Plant Propagation by Tissue Culture, the Technology Part*. 12nd (ed). Exegetics. Limited, England. p. 591-601.
5. Goodwin, P.B, Y.C. Kim, and T. Adisarwanto. 1980. Propagation of Potato by Shoot Tip Culture, Shoot Multiplication. *Potato Res.* 23:9-18.
6. Griffiths, H.M., S.A Slack, and J.H. Dodds. 1990. Effect of Chemicals and Heat Therapy on Virus Concentration in In Vitro Potato Plantlets. *Can. J. Bot.* 68:1515-1521.
7. Gunawan, L.W. 1987. *Teknik Kultur Jaringan Tumbuhan*. Pusat Antar Universitas (PAU), Bioteknologi, IPB. Bogor. Hlm. 6-19.
8. Hu, C.Y. and P.J. Wang. 1983. Meristem Shoot Tip and Bud Cultures. In D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato and Y. Yamada (Eds). *Hand Book of Plant Cell Culture*. Vol 1. *Technologies for Propagation and Breeding*. Mac. Millan Publ. Co. N.Y. p. 177-227.
9. Hussey, G; Stacey, N.J. 1981. In Vitro Propagation of Potato (*Solanum tuberosum* L). *Annals of Botany*. 48:787-796.
10. Mellor, F.C. and S.R. Smith. 1967. Eradication of Virus x, Thermotherapy. *Phytopathol.* 57:674-679.
11. Murashige, T. 1974. Plant Propagation Through Tissue Culture. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25:135-166.
12. _____ and F. Skoog. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Culture. *Physiol. Plantarum.* 15:473-479.
13. Pierik, R.L.M. 1987. *In Vitro Culture of Higher Plants*. Martinus Nijhoff. Publisher. Dordrecht. 344 p.
14. Quak, F. 1961. The Treatment and Substances Inhibity, Virus Multiplication in Meristem Culture in Obtain Virus Free Plant. *Ad. Hort. Sci.* 141-144.
15. Roca, W.M, N.O. Espinoza, M.R. Roca, and J.E. Bryan. 1978. Tissue Culture Methods for the Rapid Propagation of Potatoes. *Amer. Pot. J.* 55:691-701.
16. Stace-Smith, R. 1968. Eradication of Potatoes Viruses X and S by Thermotherapy and Axillary Bud Culture. *Phytopathol.* 58:169-179.
17. Thorpe T.A. 1981. *Plant Tissue Culture. Methods and Application in Agriculture*. Academic Press. Inc. New York. p. 45-113.
18. Wang, P.J. and L.C. Huang. 1975. Callus Cultures from Potato Tissue and Exclusion of Potato Virus X, from Plants Regenerated from Shoot Tips. *Can. J. Pot.* 53:2565-2567.