

Transformasi, Studi Molekuler, dan Bioasai Tanaman Ubi Jalar untuk Ketahanan terhadap Hama atau Penyakit

Alberta Dinar Ambarwati, D.W. Utami, D. Damayanti, A. Sisharmini, T.J. Santoso, M. Herman, dan Minantyorini

Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor

ABSTRAK

Perakitan tanaman ubi jalar transgenik tahan hama boleng atau penyakit virus dilakukan dengan menyisipkan gen *proteinase inhibitor* (*pinII*) atau gen *coat protein* (CP) dari *Sweet Potato Feathery Mottle Virus* (SPFMV) ke dalam genom tanaman. Penguasaan teknik transformasi, molekuler, dan bioasai akan sangat mendukung keberhasilan dalam perakitan tanaman transgenik. Pada tahun 2000 dilakukan penelitian transformasi dengan gen *pinII* dan gen CP-SPFMV melalui penembakan partikel maupun *Agrobacterium tumefaciens*, serta mempelajari teknik dasar molekuler dan bioasai. Eksplan daun dan petiol ubi jalar varietas Jewel digunakan sebagai jaringan target. Ekstraksi DNA tanaman dilakukan dengan beberapa modifikasi CTAB dan bioasai dilakukan pada umbi ubi jalar putativ transgenik dan nontransgenik (kontrol). Transformasi melalui penembakan partikel dengan ko-transformasi *pTwa* (*pinII*, *Bar*) dan *pRQ6* (*Gus*, *hpt*) belum menghasilkan transforman yang tahan pada seleksi higromisin 25 mg/l. Sedangkan melalui *A. tumefaciens* dihasilkan 18 tanaman putativ transgenik yang ditransformasi dengan gen *pinII* dan enam tanaman putativ transgenik dengan gen CP-SPFMV. Hasil kuantitas konsentrasi DNA berkisar 0,7-1,8 µg/µl. Optimasi PCR diperoleh pada kondisi 95°C selama 30 detik, 50°C selama 60 detik, dan 72°C selama 45 detik. Pengujian bioasai pada 32 umbi berdasarkan jumlah lubang gerakan menunjukkan rata-rata skor kerusakan umbi 4,4-4,5 dengan persentase mortalitas *Cylas* pada tanaman putativ transgenik lebih tinggi (30,8%) dibandingkan dengan tanaman nontransgenik (15%).

Kata kunci: Transformasi, molekuler, bioasai, *pinII*, CP-SPFMV, ubi jalar

ABSTRACT

The production of transgenic sweet potato resistant to pest or virus disease was done by inserting proteinase inhibitor (*pinII*) gene or coat protein (CP) of Sweet Potato Feathery Mottle Virus (SPFMV) gene into sweet potato genome through transformation technique. Knowledge of transformation, molecular, and bio-assay is therefore important in contributing the success to produce transgenic plant. Experiment was conducted in 2000, including some activities: transformation with *pinII* and CP-SPFMV gene via particle bombardment and *Agrobacterium tumefaciens*, study on basic molecular, and bioassay. Explants from petiole and leaf pieces of sweet potato cv. Jewel were used as target tissues. DNA extraction used the modification of CTAB method and bioassay was conducted on storage roots of putative transgenic plants and non transgenic plants (control). Transformation via particle bombardment with co-transformation of *pTwa* (*pinII*, *Bar*) and *pRQ6* (*Gus*, *hpt*) have not produced the transformant yet surviving in hygromycin selection (25 mg/l). Transformation via *A. tumefaciens* produced 18 and six putative transgenic plants transformed with *pinII* and CP-SPFMV gene, respectively. The quantity of the DNA concentration was about 0.7-1.8 µg/µl. Optimization of PCR was obtained at

95°C for 30 sec, 50°C for 60 sec, and 72°C for 45 sec. Bioassay on 32 storage roots based on the number of punctures, showed the score damaged roots was 4.4-4.5 and the percentage of *Cylas* mortality on putative transgenic plants (30.8%) was higher than on untransformed plants (15%).

Key words: Transformation, molecular, bioassay, *pinII*, CP-SPFMV, sweet potato

PENDAHULUAN

Serangan hama boleng ubi jalar *Cylas formicarius* maupun penyakit virus yang disebabkan oleh *Sweet Potato Feathery Mottle Virus* (SPFMV) merupakan kendala dalam budi daya ubi jalar, yang dapat menyebabkan kehilangan hasil 30-100% (Chalfont *et al.*, 1990; Nakano *et al.*, 1994).

Berkembangnya bioteknologi memungkinkan penggunaan sumber gen yang berasal dari organisme lain, yang tidak tersedia dalam plasma nutfahnya. Untuk mendapatkan tanaman ubi jalar yang mempunyai ketahanan terhadap hama bo-leng *C. formicarius* dapat dilakukan dengan menyisipkan gen *proteinase inhibitor* (*pinII*) ke dalam genom tanaman ubi jalar. Sedangkan untuk ketahanan terhadap penyakit virus SPFMV dengan menyisipkan gen *coat protein* dari SPFMV. Penyisip-an gen ketahanan ini dapat dilakukan dengan teknik transformasi gen melalui penembakan partikel (Prakash dan Varadarajan, 1992) atau melalui *Agrobacterium tumefaciens* (Newell *et al.*, 1995; Otani *et al.*, 1998).

Keberadaan/ekspresi gen pelapor Gus dapat dideteksi melalui pengujian his-tokimia dengan cara merendam jaringan transforman dalam larutan β -glucuronidase (Jefferson *et al.*, 1987). Sedangkan identifikasi terjadinya integrasi gen sasaran dapat dikonfirmasi melalui analisis molekuler, misalnya dengan teknik PCR atau *Southern Blot*. Dengan teknik PCR, sekuen DNA dari gen *pinII* atau gen CP-SPFMV yang diapit oleh primer oligonukleotida spesifik dari gen ini dapat diamplifikasi sebanyak pengulangan siklus dalam proses PCR tersebut, sehingga dapat terdeteksi keberadaannya dalam genom tanaman (Chee *et al.*, 1991). Tanaman yang positif mengandung gen sasaran masih perlu diuji tingkat ekspresi atau keefektifannya terhadap hama atau penyakit target melalui bioasai. Evaluasi ketahanan ubi jalar terhadap hama boleng dapat dinilai berdasarkan banyaknya lubang gresakan pada permukaan umbi (Rolston *et al.*, 1979), persentase luas permukaan umbi yang rusak atau kedalaman umbi yang rusak (Hahn dan Leuschner, 1981). Penelitian Newell *et al.* (1995) telah mendapatkan tanaman ubi jalar transgenik yang mengekspresikan enzim β -glucuronidase, *cowpea trypsin inhibitor*, dan *snowdrop lectin* setelah melalui analisis *Southern Blot*, RNA dot blot, dan analisis protein menggunakan deteksi *chemiluminescence*.

Dengan telah diperolehnya beberapa tanaman putativ transgenik hasil transformasi dengan gen *pinII* maupun gen CP-SPFMV, maka pada tahun anggaran 2000 dapat dilakukan penelitian awal untuk pengujian molekuler, yaitu optimasi teknik ekstraksi DNA ubi jalar dan PCR serta pengujian

ketahanan ubi jalar terhadap hama boleng. Di samping itu, kegiatan transformasi dengan gen *pinII* atau gen CP-SPFMV masih dilanjutkan untuk mendapatkan jumlah tanaman yang lebih banyak.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan pada tahun 2000 di Kelti Biologi Molekuler, Balitbio, Bogor dan merupakan penelitian lanjutan dari tahun anggaran (TA) 1998/99. Eksplan yang digunakan untuk penelitian transformasi adalah potongan daun dan petiol yang diambil dari kultur sumber eksplan (*mother stocks*) ubi jalar varietas Jewel, sedangkan daun dan umbi tanaman putativ transgenik ubi jalar masing-masing digunakan sebagai materi untuk analisis molekuler dan bioasai.

Transformasi dengan Gen *pinII* melalui Penembakan Partikel

Metode transformasi menggunakan prosedur Klein *et al.* (1988) dengan alat *gen gun* (Biolistic PDS 1000/He) Biorad. Kondisi yang digunakan untuk penembakan berdasarkan hasil optimasi penelitian tahun sebelumnya, yaitu tekanan 1100 psi, jumlah tembakan dua kali dengan jarak tembak 7 dan 9 cm. Penembakan menggunakan sistem ko-transformasi *pTwa* (*pinII*, Bar) dengan *pRQ6* (Gus, *hpt*) pada molaritas 2 : 1. Eksplan daun dan petiol hasil transformasi selanjutnya ditum-buhkan pada media induksi dan regenerasi dengan seleksi higromisin 25 mg/l.

Transformasi dengan Gen *pinII* atau gen CP-SPFMV melalui *A. tumefaciens*

Transformasi untuk ketahanan terhadap hama menggunakan *Agrobacterium* strain LBA4404 yang mengandung *pGA643pin* dengan gen ketahanan antibiotik kanamisin. Sedangkan transformasi untuk ketahanan terhadap penyakit virus SPFMV menggunakan plasmid *pMON10574-1* yang berisi gen *coat protein* SPFMV, *nptII*, dan *uidA*. Prosedur transformasi berdasarkan metode Newell *et al.* (1995) atau modifikasinya. Eksplan daun dan petiol diinokulasi dengan *A. tumefaciens* selama 30-60 menit. Ko-kultivasi menggunakan media dengan penambahan asetosi-ringon 10 mg/l selama 3 sampai 4 hari. Seleksi ketahanan kalus dan regenerasi di-lakukan dengan kanamisin 50 mg/l. Tunas atau planlet hasil transformasi diaklima-tisasi dan ditanam di rumah kaca.

Ekstraksi DNA dan Analisis PCR

Ekstraksi DNA ubi jalar menggunakan modifikasi metode CTAB (Porebski *et al.*, 1997; Varadarajan dan Prakash, 1991). Sebelum dilakukan ekstraksi DNA, daun tanaman ubi jalar diberi perlakuan gelap dengan cara ditutup dengan aluminium foil selama 12-48 jam (Varadarajan dan Prakash, 1991). Bufer ekstraksi terdiri dari 100 mM Tris HCl, 50 mM EDTA, 500 mM

NaCl, 0,3% β -mercaptoethanol, 2% CTAB, dengan penambahan PVP 50 mg (Porebski *et al.*, 1997). Pemurnian DNA dengan menambahkan campuran chloroform dan octanol (24 : 1). Uji kuantitas konsen-trasi DNA menggunakan spektrofotometer. Hasil DNA yang diperoleh, selanjutnya digunakan untuk analisis PCR dengan mesin PCR *Programable Thermal Controller* (MJ Research Inc, Massachussetts, USA).

Bioasai terhadap Hama Boleng *C. formicarius*

Umbi ubi jalar tanaman putativ transgenik dan nontransgenik (kontrol) di-infestasi, masing-masing dengan 5 pasang imago per umbi. Pengamatan kerusakan umbi dilakukan 1 minggu setelah infestasi dengan menghitung jumlah lubang gerekan (Rolston *et al.*, 1979). Setelah 3 minggu diinfestasi, umbi dibelah untuk menghitung jumlah larva dan pupa yang hidup.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Transformasi

Induksi kalus dan regenerasi eksplan hasil transformasi menggunakan media Gosukonda *et al.* (1995) maupun Newell *et al.* (1995) yang sudah digunakan untuk penelitian regenerasi ubi jalar tanpa ditransformasi pada tahun anggaran sebelumnya (Ambarwati *et al.*, 2000). Transformasi dengan gen *pinII* dilakukan secara langsung dengan penembakan partikel dan secara tidak langsung melalui vektor *A. tumefaciens*. Eksplan daun dan petiol yang ditransformasi melalui penembakan partikel belum ada yang tumbuh atau tahan pada media seleksi 3 dengan higromisin 25 mg/l. Persentase kalus tahan pada seleksi 2 (12-25%) juga berkurang dibandingkan dengan seleksi 1 (34-65%) (Tabel 1).

Proses transformasi melalui penembakan partikel bersifat random, sehingga ada kemungkinan jaringan/sel tersebut tidak ikut tertransformasi sehingga tidak mempunyai ketahanan pada media seleksi. Di samping itu, kerusakan sel/jaringan akibat faktor fisik selama proses penembakan akan lebih besar dibandingkan dengan melalui *A. tumefaciens*. Konsentrasi higromisin 25 mg/l yang digunakan Otani *et al.* (1998) pada transformasi ubi jalar melalui *A. tumefaciens* tampaknya masih terlalu tinggi untuk penyeleksi pada transformasi secara langsung. Oleh karena itu, masih perlu dilakukan penelitian optimasi konsentrasi higromisin yang tepat sebagai agen seleksi

Tabel 1. Kalus terseleksi pada transformasi ubi jalar dengan gen *pinII* melalui penembakan partikel pada ko-transformasi *pTwa* : *pRQ6*

| Eksplan | Jumlah eksplan | Kalus terseleksi 1 | Kalus terseleksi 2 | Kalus terseleksi 3 |
|---------|----------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Daun | 98 | 34 (34,7%) | 12 (12,2%) | 0 |
| Petiol | 138 | 90 (65,2%) | 35 (25,4%) | 0 |

Seleksi higromisin 25 mg/l; *pTwa*: *pinII*; Bar, *pRQ6*: Gus; *hpt*

untuk transformasi melalui penembakan partikel.

Teknik transformasi yang lain adalah melalui vektor *A. tumefaciens*. Teknik ini tampaknya lebih memberikan harapan untuk mendapatkan tanaman transgenik dibandingkan dengan melalui penembakan partikel. Transformasi dengan *Agrobacterium* memberikan kemungkinan jaringan yang tertransformasi lebih besar, di samping integrasinya bersifat sederhana (*low copy number*), relatif lebih murah, dan reproduksibel (Songstad *et al.*, 1995; Siemens dan Schieder, 1996). Transformasi menggunakan *Agrobacterium* LBA4404 yang berisi *pGA643pin* (*pinII*, *nptII*) telah menghasilkan beberapa tanaman putativ transgenik setelah melalui seleksi kanamisin 50 mg/l. Setelah 3 kali subkultur (pada media seleksi 3) kalus masih bisa bertahan (31-41%) dan sebagian bisa beregenerasi membentuk tanaman, baik untuk eksplan daun maupun petiol (Tabel 2).

Kemampuan regenerasi eksplan petiol (8,5%) lebih besar dibandingkan dengan eksplan daun (1,5%). Hal yang sama dijumpai pada penelitian Lowe *et al.* (1994) di mana keberhasilan tertinggi juga diperoleh dari eksplan petiol.

Transformasi melalui *A. tumefaciens* juga dilakukan dengan gen CP-SPFMV untuk ketahanan terhadap penyakit virus SPFMV. Tabel 3 memperlihatkan beberapa kalus dan tunas yang lolos pada media seleksi.

Dengan terekspresinya gen Gus melalui Gus assay dan gen *nptII* (kanamisin) memberikan harapan bahwa gen sasaran CP-SPFMV telah ikut terintegrasi, karena ketiga gen tersebut terdapat dalam T-DNA yang ditransfer oleh *Agrobacterium* ke tanaman. Seperti halnya transformasi dengan gen *pinII*, pada transformasi menggunakan gen CP-SPFMV ini terlihat bahwa eksplan petiol lebih responsif untuk beregenerasi membentuk tanaman. Dari enam kalus yang lolos seleksi kanamisin menghasilkan enam tanaman regenerasi secara organogenesis. Penelitian Murata *et al.* (1998) menghasilkan ubi jalar yang positif mengandung gen CP-SPFMV melalui pengujian molekuler setelah ditransformasi secara langsung dengan elektropo-

Tabel 2. Transformasi ubi jalar dengan gen *pinII* melalui *A. tumefaciens*

| Eksplan | Jumlah eksplan | Kalus terseleksi 3 | Regenerasi |
|---------|----------------|--------------------|------------|
| Daun | 132 | 42 (31,8%) | 2 (1,5%) |
| Petiol | 189 | 78 (41,3%) | 16 (8,5%) |

Seleksi kanamisin 50 mg/l, *pGA643pin*, *pinII*, *nptII*

Tabel 3. Transformasi ubi jalar dengan gen CP-SPFMV melalui *A. tumefaciens*

| Eksplan | Jumlah eksplan | Kalus terseleksi 3 | Regenerasi |
|---------|----------------|--------------------|------------|
| Daun | 44 | 15 (34,1%) | 0 |
| Petiol | 38 | 6 (15,8%) | 6 (15,8%) |

Seleksi kanamisin 50 mg/l, *pMON10574-1*, CP-SPFMV, Gus, *nptII*

rasi dan penembakan partikel. Untuk memastikan keberadaan gen *pinII* maupun gen CP-SPFMV dalam genom tanaman putativ transgenik tersebut perlu dilakukan pengujian secara molekuler.

Studi Molekuler

Mengingat banyaknya kandungan metabolit sekunder pada ubi jalar dan belum pernah dilakukan ekstraksi DNA ubi jalar di Balitbio, maka sebagai pendahuluan studi molekuler akan dilakukan optimasi teknik ekstraksi DNA ubi jalar.

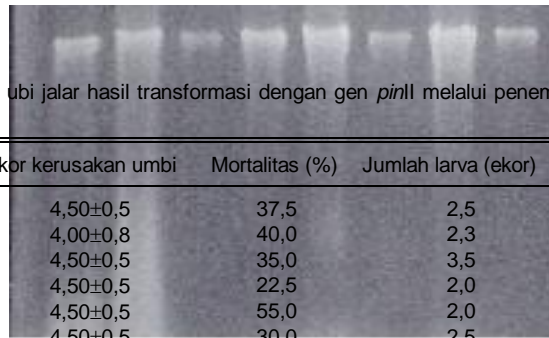
Ekstraksi DNA ubi jalar menggabungkan modifikasi metode Varadarajan dan Prakash (1991) dan Porebski *et al.* (1997). Metode ini khusus untuk tanaman dengan kandungan polisakarida dan polifenol tinggi. Polisakarida akan menyulitkan teknik ekstraksi karena membentuk suatu matriks gelatin sehingga DNA sukar dipisahkan dan tidak dapat teramplifikasi pada PCR dengan menghambat aktivitas Taq polimerase (Porebski *et al.*, 1997). Untuk itu, telah dilakukan beberapa modifikasi, seperti perlakuan gelap daun tanaman selama 12-48 jam sebelum diekstrak DNANYA (Varadarajan dan Prakash, 1991), penambahan β -mercaptoetanol dan pvp (*polivinilpirolidon*) dalam bufer ekstraksi (Porebski *et al.*, 1997). PVP merupakan suatu polimer solid dengan berat molekul tinggi yang akan mengikat polifenol melalui *hydrogen bonding* sehingga dapat dipisahkan dari DNA (Porebski *et al.*, 1997). Sharma *et al.* (2000) menambahkan *DEAE-cellulose* dalam purifikasi untuk mengeliminasi protein, polisakarida, dan polifenol pada ekstraksi DNA kacang tanah.

Dengan memodifikasi metode ini, telah diekstraksi delapan sampel tanaman ubi jalar hasil transformasi dari penelitian TA 1999/2000 (Gambar 1) sebelum dipurifikasi dengan RNA-se. Sedangkan hasil optimum kuantitas konsentrasi DNA menggunakan spektrofotometer pada rasio OD A260/A280 adalah 0,7-1,8 µg/µl (Tabel 4). Varadarajan dan Prakash (1991) menghasilkan sampel DNA ubi jalar dengan kuantitas 1,6-1,8 (A260/A280) yang selanjutnya dapat dipotong oleh beberapa enzim restriksi seperti Bgl II, Hae III, dan Xho. Untuk penelitian tahun selanjutnya akan dilakukan pemisahan hasil amplifikasi PCR dengan elektroforesis agarose gel dan pewarnaan *ethidium bromide*.

Bioasai

Di samping studi awal molekuler, telah dicoba pula pengujian (bioasai) untuk melihat keefektifan tanaman terhadap hama boleng *C. formicarius*. Bioasai dilakukan pada 32 umbi ubi jalar berumur 9 bulan dari tanaman putativ transgenik *pinII* yang diperoleh melalui penembakan partikel maupun *A. tumefaciens*. Setiap umbi diinfestasi dengan lima pasang imago hama boleng. Hasil bioasai disajikan pada Tabel 5 dan 6.

Dilihat dari rata-rata skor kerusakan umbi, yaitu 4,4 sampai 4,5 menunjukkan bahwa dalam setiap umbi terdapat kira-kira 11-15 lubang kerusakan. Sedangkan apabila dilihat dari tingkat mortalitas *Cylas* pada



Tabel 5. Bioasai umbi ubi jalar hasil transformasi dengan gen *pinII* melalui penembakan partikel terhadap hama boleng

| Sampel tanaman | Skor kerusakan umbi | Mortalitas (%) | Jumlah larva (ekor) | Jumlah pupa (ekor) |
|----------------|---------------------|----------------|---------------------|--------------------|
| 1 | 4,50±0,5 | 37,5 | 2,5 | 1 |
| 2 | 4,00±0,8 | 40,0 | 2,3 | 1 |
| 3 | 4,50±0,5 | 35,0 | 3,5 | 1 |
| 4 | 4,50±0,5 | 22,5 | 2,0 | 1,3 |
| 5 | 4,50±0,5 | 55,0 | 2,0 | 2 |
| 6 | 4,50±0,5 | 30,0 | 2,5 | 1 |
| 7 | 4,33±0,4 | 46,7 | 2,6 | 1,3 |
| 8 | 4,75±0,4 | 45,7 | 2,3 | 1,5 |
| Rata-rata | 4,40±0,5 | 39,05 | 2,4 | 1,2 |
| Kontrol | 4,80±0,4 | 10,0 | 9,2 | 4 |

Gambar 1. Hasil DNA yang diekstrak dengan metode modifikasi CTAB

Tabel 4. Hasil pengamatan kuantitas konsentrasi DNA

| Sampel | OD A260 | OD A280 | Kemurnian | Konsentrasi (µg/µl) | | | |
|-----------|----------|---------|-----------|---------------------|-----|------|------|
| 1 | 0,84 | 0,48 | 1,75 | 1,05 | | | |
| 2 | 0,90 | 0,55 | 1,84 | 1,13 | | | |
| 3 | 0,59 | 0,33 | 1,78 | 0,74 | | | |
| 4 | 0,89 | 0,50 | 1,78 | 1,11 | | | |
| 1 | 4,75±0,4 | 0,62 | 32,50 | 1,78 | 2,5 | 1,43 | 2,5 |
| 2 | 4,23±0,6 | 0,34 | 12,50 | 1,65 | 3,2 | 0,70 | 1,75 |
| Rata-rata | 4,50±0,4 | 0,79 | 22,50 | 1,87 | 2,8 | 1,85 | 2,1 |
| Kontrol | 4,80±0,4 | 0,33 | 10,00 | 1,70 | 4,2 | 0,77 | 3,0 |

tanaman putativ yang diuji menunjukkan persentase yang lebih tinggi (22,5-39%) dibandingkan dengan tanaman kontrol (10-20%). Demikian juga dengan rata-rata jumlah larva (2,6) maupun jumlah pupa (1,6) yang hidup pada tanaman putativ adalah lebih sedikit daripada yang ditemukan pada tanaman kontrol (6,7) dan (3,5). Beberapa peneliti menggunakan prosedur evaluasi ketahanan yang berlainan. Jayaramiah (1975) menggunakan persentase kerusakan umbi sebagai kriteria ketahanan. Metode seleksi ketahanan yang dikemukakan oleh Talekar (1982) adalah berdasarkan nilai rata-rata dan simpangan baku dari jumlah hama boleng tiap 1 kg umbi, persentase kerusakan umbi, atau jumlah hama boleng dan persentase kerusakan umbi.

Dari hasil yang telah diperoleh masih perlu ditindaklanjuti, misalnya dengan kegiatan transformasi untuk meningkatkan perolehan jumlah tanaman yang lebih memadai, melanjutkan kegiatan molekuler maupun bioasai sehingga diperoleh tanaman ubi jalar yang positif mengandung gen *pinII* atau gen CP-SPFMV serta mempunyai ketahanan terhadap hama boleng atau penyakit virus.

KESIMPULAN

1. Transformasi melalui *A. tumefaciens* menghasilkan 18 tanaman putativ transgenik ubi jalar yang ditransformasi dengan gen *pinII* dan 6 tanaman putativ transgenik yang ditransformasi dengan gen CP-SPFMV.
2. Studi pendahuluan molekuler untuk ekstraksi DNA menghasilkan DNA dengan kuantitas (A260/A280) sebesar 0,7-1,8 µg/µl.
3. Bioasai pada 32 umbi ubi jalar terhadap hama boleng di laboratorium menunjukkan rata-rata skor kerusakan umbi 4,4-4,5; persentase mortalitas *Cylas* pada tanaman putativ lebih tinggi dibandingkan dengan tanaman kontrol, sedangkan jumlah larva dan pupa hidup yang ditemukan pada tanaman putativ lebih sedikit daripada tanaman kontrol.

DAFTAR PUSTAKA

- Ambarwati, A.D., M. Herman, A. Sisharmini, E. Listanto, T.J. Santoso, dan Minantyorini. 2000. Transformasi tanaman ubi jalar untuk ketahanan terhadap hama dan penyakit. Laporan Hasil Penelitian TA 1999/2000. 62 hlm.
- Chalfont, R.B., R.K. Janson, D.R. Seal, and J.M. Schalk. 1990. Ecology and management of sweet potato insects. *Annu. Rev. Entomol* 35:157-180.
- Chee, P.P., R.F. Drang, and J.L. Slightom. 1991. Using polymerase chain reaction to identify transgenic plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 20:1928-1931.

- Gosukonda, R.M., A. Parobodessai, E. Blay, C.S. Prakash, and C.M. Peterson. 1995.** Thidiazuron-induced adventitious shoot regeneration of sweet potato (*Ipomoea batatas*). *In Vitro Cell Dev. Biol.* 31:65-71.
- Hahn, S.K. and K. Leuschner. 1981.** Resistance of sweet potato cultivars of African to sweet potato weevil. *Crop Sci.* 21:499-503.
- Jayaramiah, M. 1975.** Reaction of sweet potato varieties to damage of the weevil, *Cylas formicarius* (Fabr.) (Coleoptera : Curculionidae) and on the possibility of picking up of infestation by weevil. *Mysore J. Agric. Sci.* 9:418-421.
- Jefferson, R.A., T.A. Kavanagh, and M.W. Bevan. 1987.** Gus fusions: Glucuronidase as a versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6:3901-3907.
- Klein, T.M., M. Fromm, A. Weissinger, D. Tomes, S. Schaaf, M. Sletten, and J. Sanford. 1988.** Transformation of maize cells using high velocity microprojectile. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:4305-4309.
- Lowe, J.M., W.D.O. Hamilton, and C.A. Newell. 1994.** Genetic transformation in *Ipomoea batatas* (L.) Lam (sweet potato). *In Bajaj, Y.P.S. (Ed).* Biotechnology in Agriculture and Forestry. Plant Protoplasts and Genetic Engineering 29:304-316.
- Murata, T., Y. Okada, A. Saito, T. Kimura, M. Mori, M. Nishiguchi, K. Hanada, J. Sakai, and H. Fukuoka. 1998.** Transformation by direct gene transfer in sweet potato (*Ipomoea batatas* L. (Lam.)). Proceeding of International Workshop on Sweet Potato Production System toward the 21st Century. Miyakonojo, Japan. p. 159-180.
- Nakano, N., S. Fuentes, and L.F. Salazar. 1994.** Spot virus diseases detected in the tropics of South and Central America and South East Asia. *JIRCAS Paper* 1:58-65.
- Newell, C.A., J.M. Lowe, A. Merryweather, L.M. Rooke, and W.D.O. Hamilton. 1995.** Transformation of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] with *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of plants expressing cowpea trypsin inhibitor and snowdrop lectin. *Plant Science* 107:215-227.
- Otani, M., T. Shimada, T. Kimura, and A. Saito. 1998.** Transgenic plant production from embryogenic callus of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Biotechnology* 15(1):11-16.
- Porebski, S., L.G. Bailey, and B.R. Baum. 1997.** Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter* 15(1):8-15.
- Prakash, C.S. and U. Varadarajan. 1992.** Genetic transformation of sweet potato by particle bombardment. *Plant Cell Rep.* 11:53-57.

- Rolston, L.H., T. Barlow, T. Hernandez, S.S. Nilakhe, and A. Jones. 1979.** Field evaluation of breeding lines and cultivar of sweet potato for resistance to the sweet potato weevil. Hort. Sci. 14:634-635.
- Sharma, K.K., M. Lavanya, and V. Anjaiah. 2000.** A method for isolation and purification of peanut genomic DNA suitable for analytical applications. Plant Molecular Biology Reporter 18:393a-393h.
- Siemens, J. and O. Schieder. 1996.** Transgenic plants: Genetic transformation-recent developments and the state of the art. Plant Tissue Culture and Biotechnology 2(2):66-75.
- Songstad, D.D., D.A. Somers, and R.J. Grusbach. 1995.** Advances in alternative DNA delivery techniques. Plant Cell, Tissue, and Organ Culture 40:1-15.
- Talekar, N.S. 1982.** A search for sources of resistance to sweet potato weevil. *In* Villareal, R.L. and T.D. Griggs (*Eds.*). Sweet Potato. Proc. of the First Inter. Sym. AVRDC, Tainan, Taiwan. p. 147-156.
- Varadarajan, G.S and C.S. Prakash. 1991.** A rapid and efficient method for the extraction of total DNA from the sweet potato and its related species. Plant Molecular Biology Reporter 9(1):6-12.