

**MK. Kultur Jaringan
(Biologi Sem 6)**

TOPIK XI



FUSI & KULTUR PROTOPLAST

Paramita Cahyaningrum Kuswandi
(email : paramita@uny.ac.id)
FMIPA UNY

2014



Tissue Culture Applications

- ✓ Micropropagation
- ✓ Germplasm preservation
- ✓ Somaclonal variation
- ✓ Haploid & dihaploid production
- ✓ *In vitro* hybridization – protoplast fusion

Keragaman baru dari kultur jaringan

- Meskipun kultur jaringan bertujuan untuk menghasilkan tanaman true-to-type
- Juga bisa untuk menghasilkan tanaman baru
- Metode yang digunakan :
 1. Induksi mutasi
 2. Induksi keragaman somaklonal
 3. Fusi protoplast

Fusi protoplast

- Transfer materi genetik pada tumbuhan tingkat tinggi biasanya adalah dengan metode hibridisasi konvensional / seksual
- Metode lain yang dapat digunakan adalah dengan hibridisasi aseksual
- Yaitu antar sel-sel somatik yang sudah tidak mempunyai dinding sel (**protoplast**)
- Disebut dengan **hibridisasi somatik**



Genetic manipulation

- = manipulasi genetik = mengubah susunan genetik tanaman
- Adalah metode transmisi materi genetik antar sel tanaman (bisa beda spesies atau beda genus) tanpa melalui fase generatif

- Manipulasi genetik bisa dilakukan dengan beberapa cara :
 - Hibridisasi somatik
 - Hibridisasi sitoplasmik
 - Transplantasi nukleus/kromosom/organel lain
 - Transformasi dengan *Agrobacterium*

1. Hibridisasi Somatik

- = parasexual hybridization
- Bergabungnya nukleus dan sitoplasma antar 2 protoplast

2. Hibridisasi sitoplasmik

- Bergabungnya nukleus dan sitoplasma dari protoplasma A dengan sitoplasma dari protoplasma B
- Bisa untuk melihat efek transmisi materi genetik melalui sitoplasma
- E.g. cytoplasmic male sterility

3. Transplantation

- Memasukkan nukleus / kromosom / bagian kromosom / organel lain spt plastida dan mitokondria
- Seperti membuat tanaman transgenik tetapi dengan fusi protoplast

4. Transformasi

- Penambahan gen ke dalam suatu sel atau protoplast memerlukan vektor
- Gen perlu diisolasi
- Vektor biasanya adalah *Agrobacterium tumefaciens*
- Tapi biasanya untuk tanaman dikotil

Persyaratan untuk manipulasi genetik

- Sel hibrid harus stabil secara genetik
- Harus bisa meregenerasi tanaman dari protoplast atau kultur sel
- Tanaman tidak 'female sterile'
- Sifat genetiknya harus bisa diwariskan

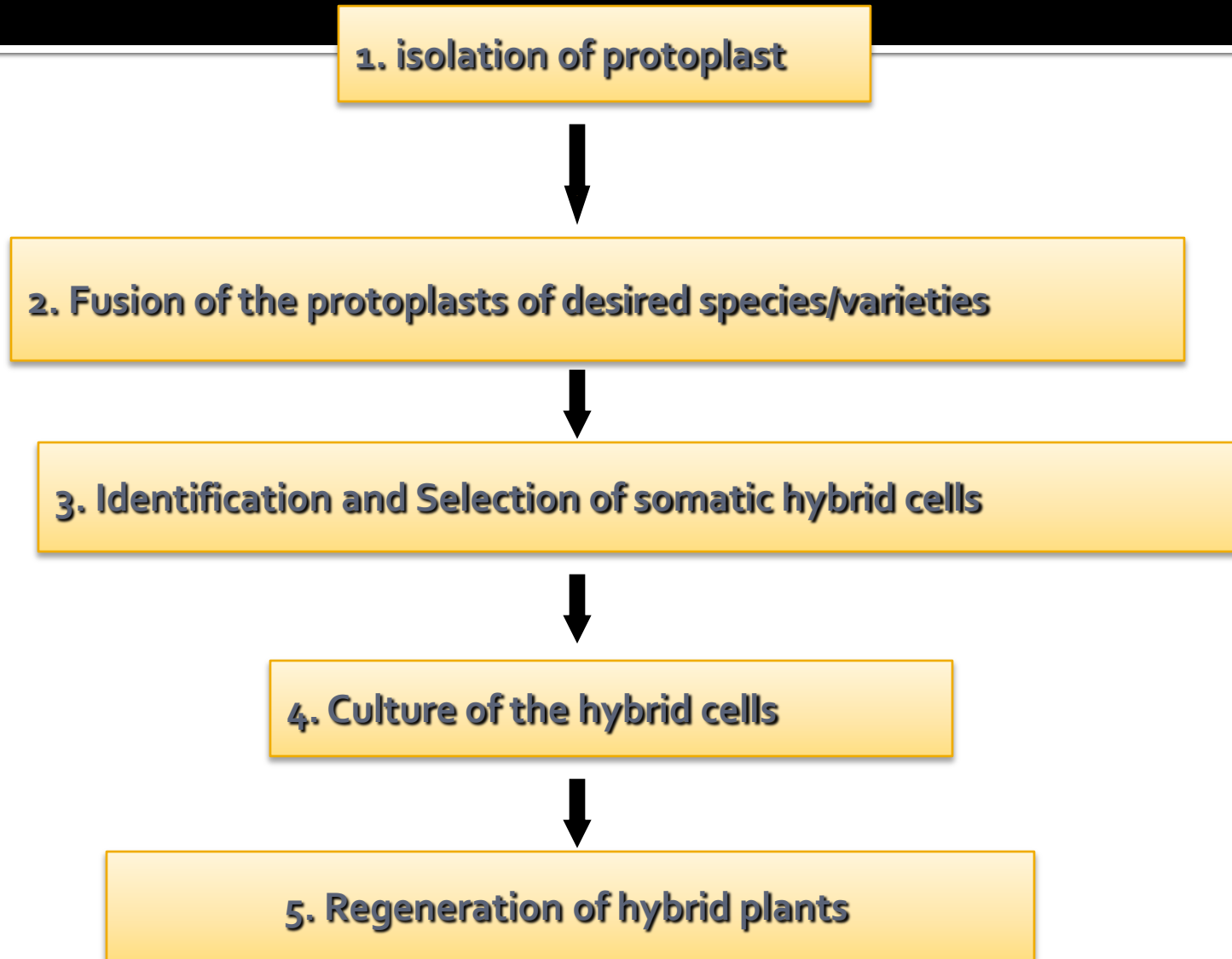
Manfaat hibridisasi somatik

1. Menghasilkan hibrida yang tidak bisa dilakukan dengan persilangan biasa
2. Untuk menghasilkan tnmn poliploid jika tidak bisa dilakukan dengan kolkisin
3. Bisa menghasilkan hybrid cytoplasm (cybrid)

Tahapan hibridisasi somatik

- ❖ Pemilihan materi tanaman
- ❖ Sterilisasi
- ❖ Perlakuan enzim
- ❖ Fusi dan seleksi hasil fusi / hibrid
- ❖ Kultur protoplast, regenerasi dinding sel, dan induksi pembelahan sel
- ❖ Regenerasi tanaman
- ❖ Verifikasi dan kontrol produk hasil fusi
- ❖ Uji tanaman baru

Somatic hybridization technique

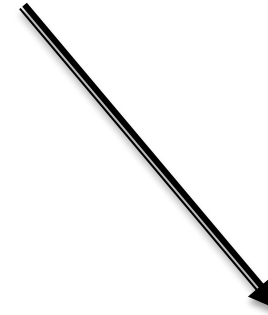
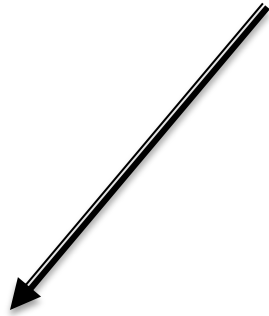


1. Isolasi Protoplast

- Bahan tanam dapat diambil dari sumber in vivo atau in vitro
- Jika sumber eksplan in vitro ; sudah steril
- Jika sumber eksplan in vivo ; belum steril sehingga harus disterilisasi terlebih dahulu
- Cara sterilisasi tergantung pada eksplan yang akan digunakan sebagai sumber protoplast

Isolation of Protoplast

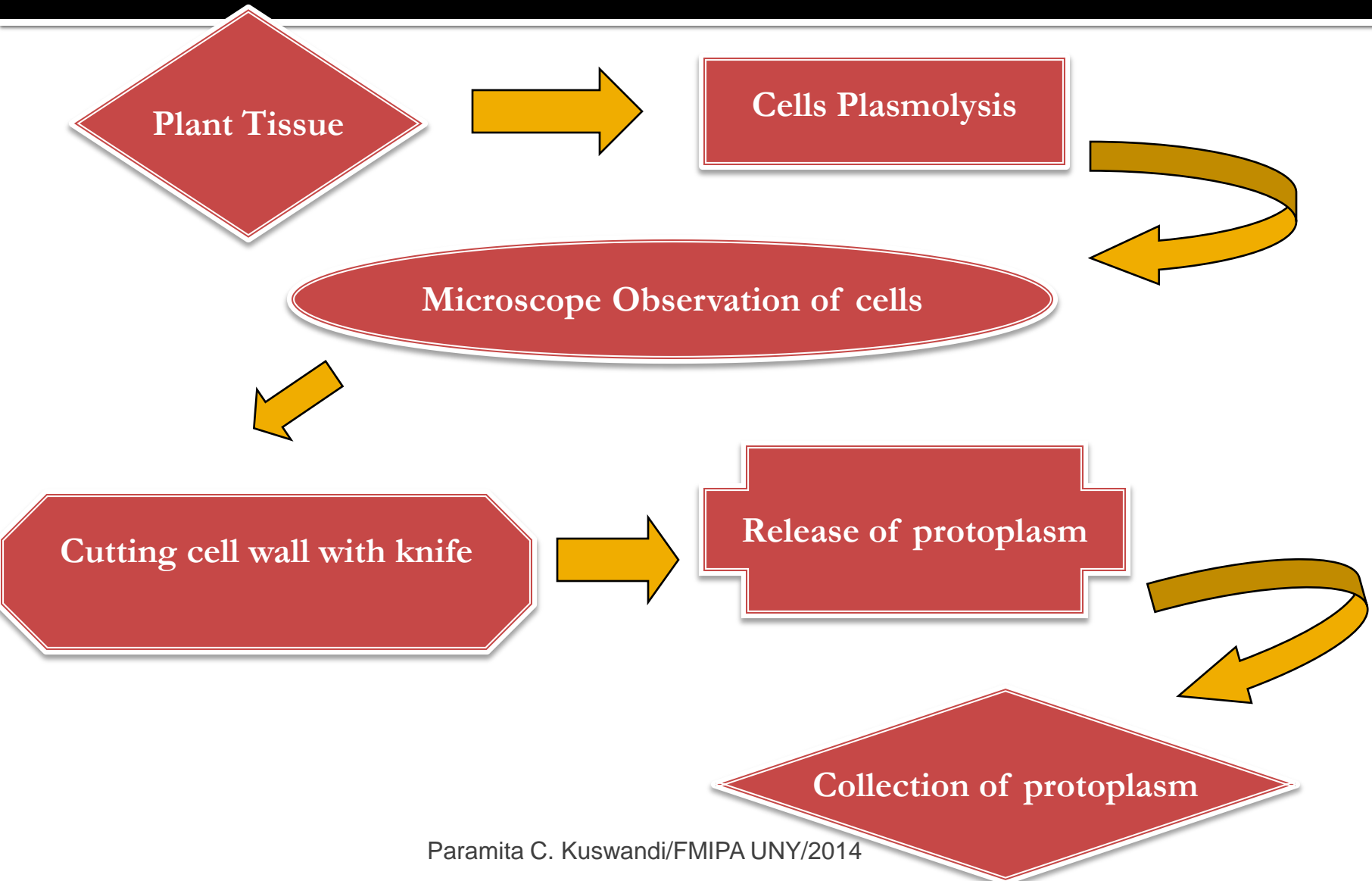
(Separation of **protoplasts** from plant tissue)



1. Mechanical Method

2. Enzymatic Method

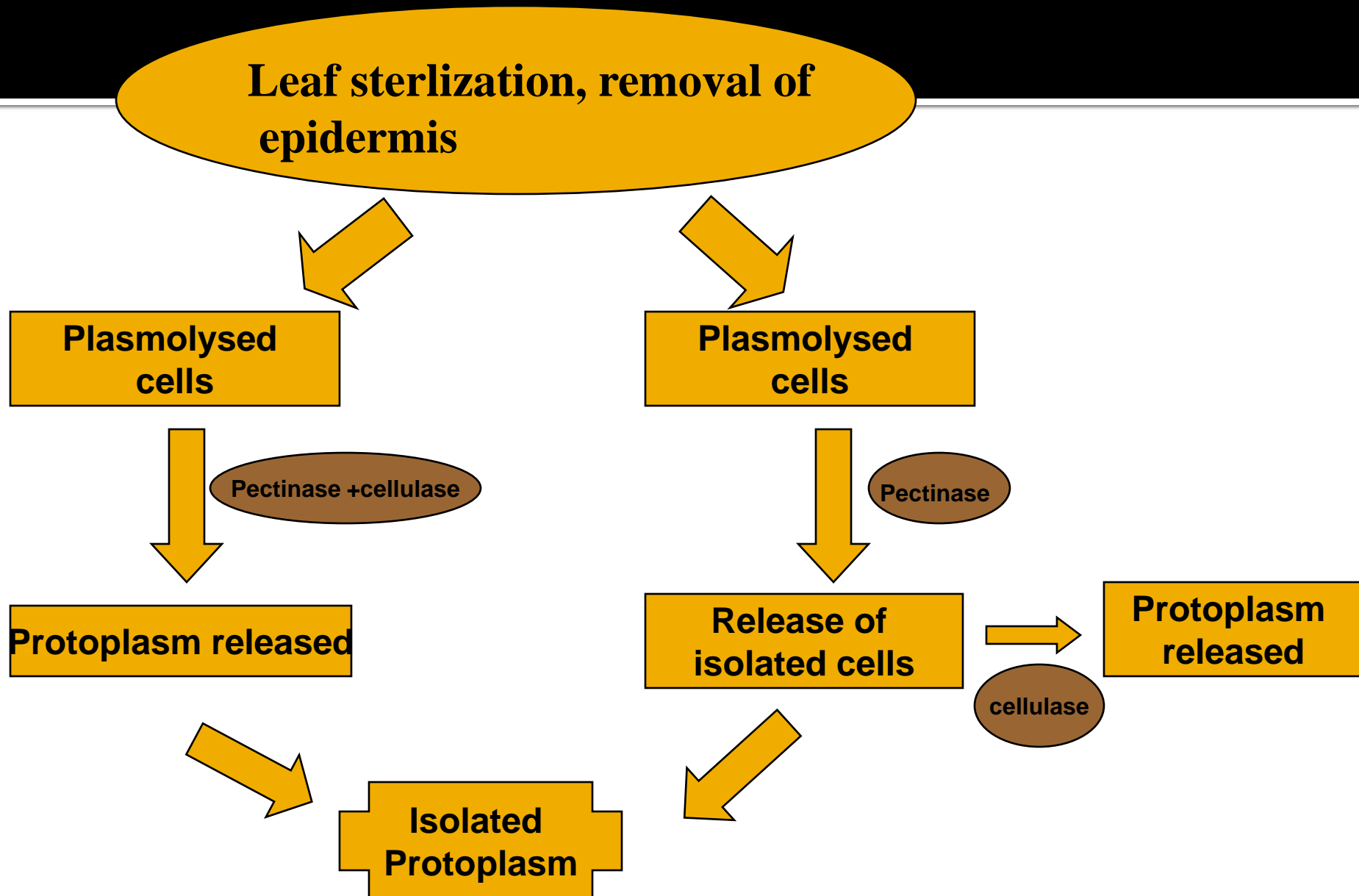
Mechanical Method



Mechanical Method

- ✓ Used for vacuolated cells like onion bulb scale, radish and beet root tissues
- ✓ Low yield of protoplast
- ✓ Laborious and tedious process
- ✓ Low protoplast viability

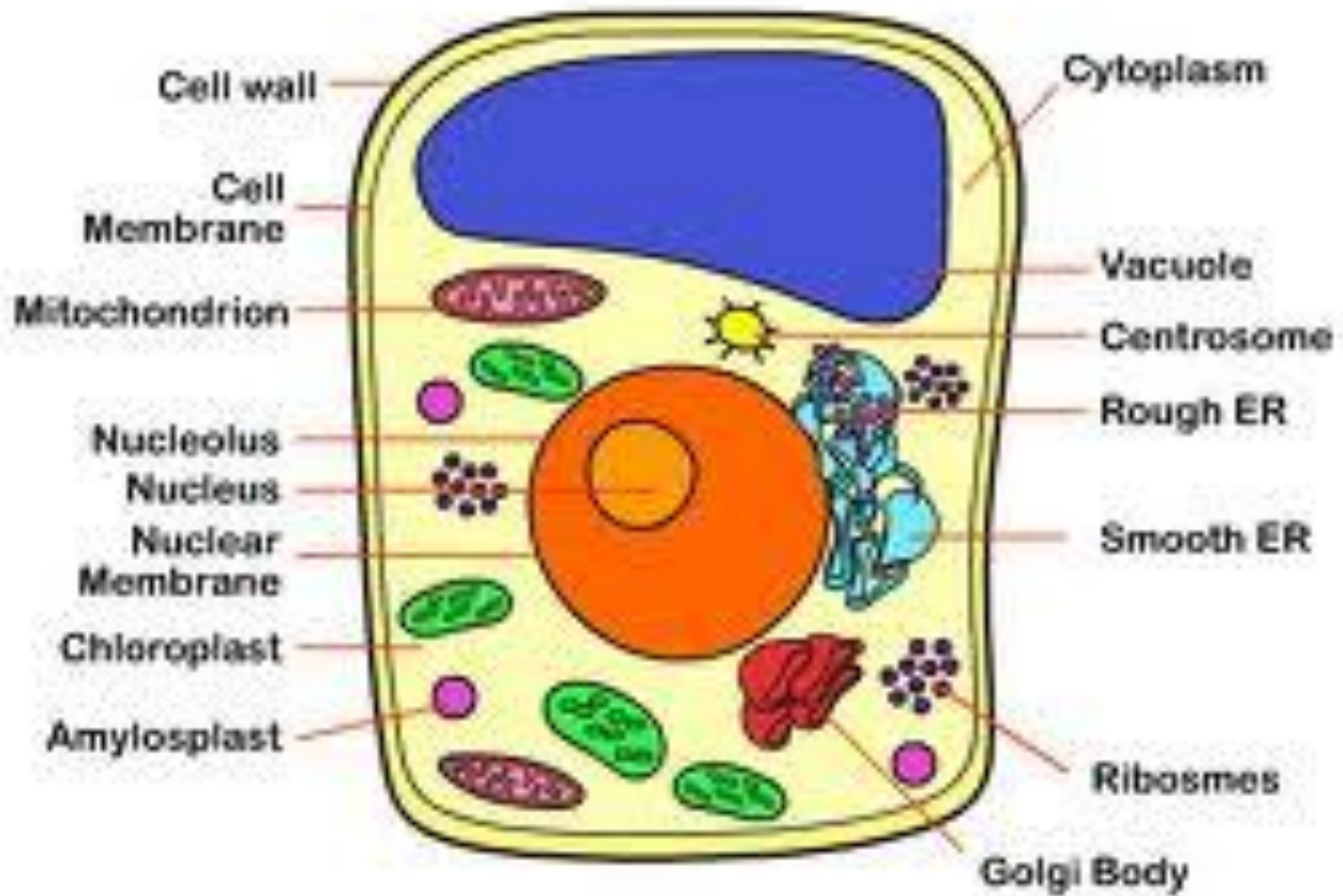
Enzymatic Method



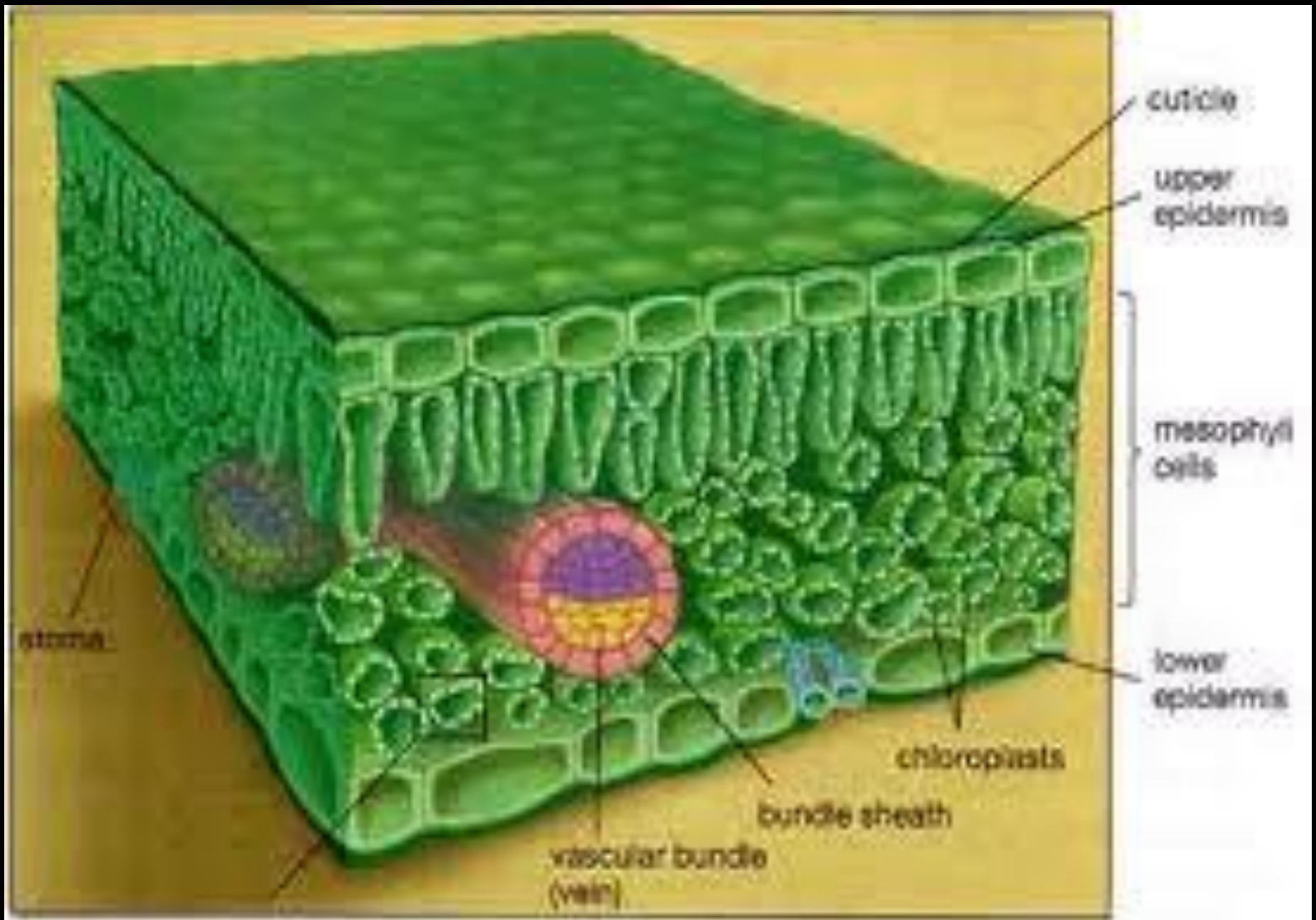
Enzymatic Method

- Used for variety of tissues and organs including leaves, petioles, fruits, roots, coleoptiles, hypocotyls, stem, shoot apices, embryo microspores
- Mesophyll tissue - most suitable source
- High yield of protoplast
- Easy to perform
- More protoplast viability

- Enzim yang digunakan adalah yang dapat mendegradasi dinding sel
- Terdapat berbagai macam enzim, biasanya dari mikroba
- Harus bisa mendegradasi selulosa, pektin, dan hemiselulose ; komponen pembentuk dinding sel tanaman
- Jika sumber protoplast adalah suspensi sel, maka diambil pada saat fase eksponensial karena dinding sel masih tipis



www.sciencewithme.com



- Tekanan osmotik yang cukup diperlukan supaya protoplast tidak rusak
- Dapat digunakan bahan kimia seperti mannitol untuk menjaga tekanan osmotik

2. Fusi protoplast

1. Spontaneous fusion :

During enzyme treatment, protoplasts sometimes join to form multinucleate protoplasts

2. Induced fusion :

- a) Mechanical fusion
- b) Chemofusion
- c) Electrofusion

Mechanical fusion

- Di bawah mikroskop
- Dengan micromanipulator atau perfusion micropipette
- Protoplast didekatkan/difusikan secara manual

Chemofusion

- Menggunakan chemical fusogen seperti sodium nitrate, polyethylene glycol (PEG), calcium ions (Ca^{2+})
- Menyebabkan protoplast saling mendekat dan terjadi fusi

Electrofusion

- Mild electric stimulation is used
- Aliran listrik menyebabkan protoplast saling mendekat, membentuk struktur seperti rantai
- Aliran listrik yang lebih tinggi selama bbrp detik menyebabkan membran terbuka dan terjadi fusi

Hasilnya....

- **Heterokaryon** : jika 2 protoplast berbeda (beda genus atau spesies) berhasil menyatu
- **Homokaryon** : jika 2 protoplast yang menyatu dari jenis/spesies sama
- Dalam suatu hasil percobaan dari dua macam protoplast (A dan B) akan diperoleh :
 - Protoplast yang tidak berhasil menyatu
 - Homokaryon AA dan Bb
 - Heterokaryon AB
 - Multiple karyons

3. Identifikasi dan Seleksi

1. Seleksi hibrid somatik

- a) Negative selection : sel yang tumbuh dimatikan, dan sel yang tidak tumbuh dibiarkan hidup
- b) Positive selection : yang dibiarkan hidup adalah sel yang hidup

2. Seleksi mutan

Seleksi hibrid somatik

- **Direct isolation**
hibrida dipilih langsung menggunakan mikropipet/mikrokapiler/mikromanipulator
- **Visual**
penggunaan protoplast dengan dan tanpa kloroplast, dan pewarnaan
- **Pemisahan berdasar sifat fisik**
dengan perbedaan tegangan listrik, hasil sentrifuse

- **Genetic complementation**

Hibrida yang dihasilkan bisa mempunyai sifat yang berbeda dari tetuanya. Jika masing2 tetua sensitif/resistan terhadap senyawa tertentu maka hibridnya bisa menjadi sensitif/resistan terhadap kedua senyawa

- **Efek heterosis**

Pertumbuhan hibrida lebih baik daripada tetua

Seleksi mutan

- Mutasi dapat diinduksi pada protoplast dengan bahan kimia (e.g. EMS), metode fisik (e.g. sinar gamma), atau transformasi dengan *Agrobacterium*
- Seleksi sel mutan dilakukan **secara langsung** (misal mutan yang lebih tahan terhadap faktor tertentu) atau **tidak langsung** (sel non-mutan dibunuh dan sel mutan dipindah ke media dengan nutrisi yang lebih baik)

5. Kultur protoplast

- Regenerasi dinding sel
- Pembelahan sel
- Pembentukan kalus
- Diferensiasi / pembentukan jaringan dan organ
- Kultur protoplast biasanya dilakukan di tempat gelap, dan sub kultur dilakukan untuk regenerasi

Beberapa metode kultur protoplast

1. Menggunakan media cair di cawan petri
2. Media padat
3. Di dalam micro-chambers
4. Micro-drop method
5. Nurse culture/feeder layer technique
6. Media cair diatas media padat
7. Kultur menggunakan agarose-bead/agarose-disc

5. Regenerasi tanaman

- Regenerasi kultur protoplast membentuk tanaman baru ditentukan oleh bbp faktor :
 - Genotipe eksplan
 - Jaringan asal
 - Kondisi pertumbuhan tanaman eksplan
 - Media

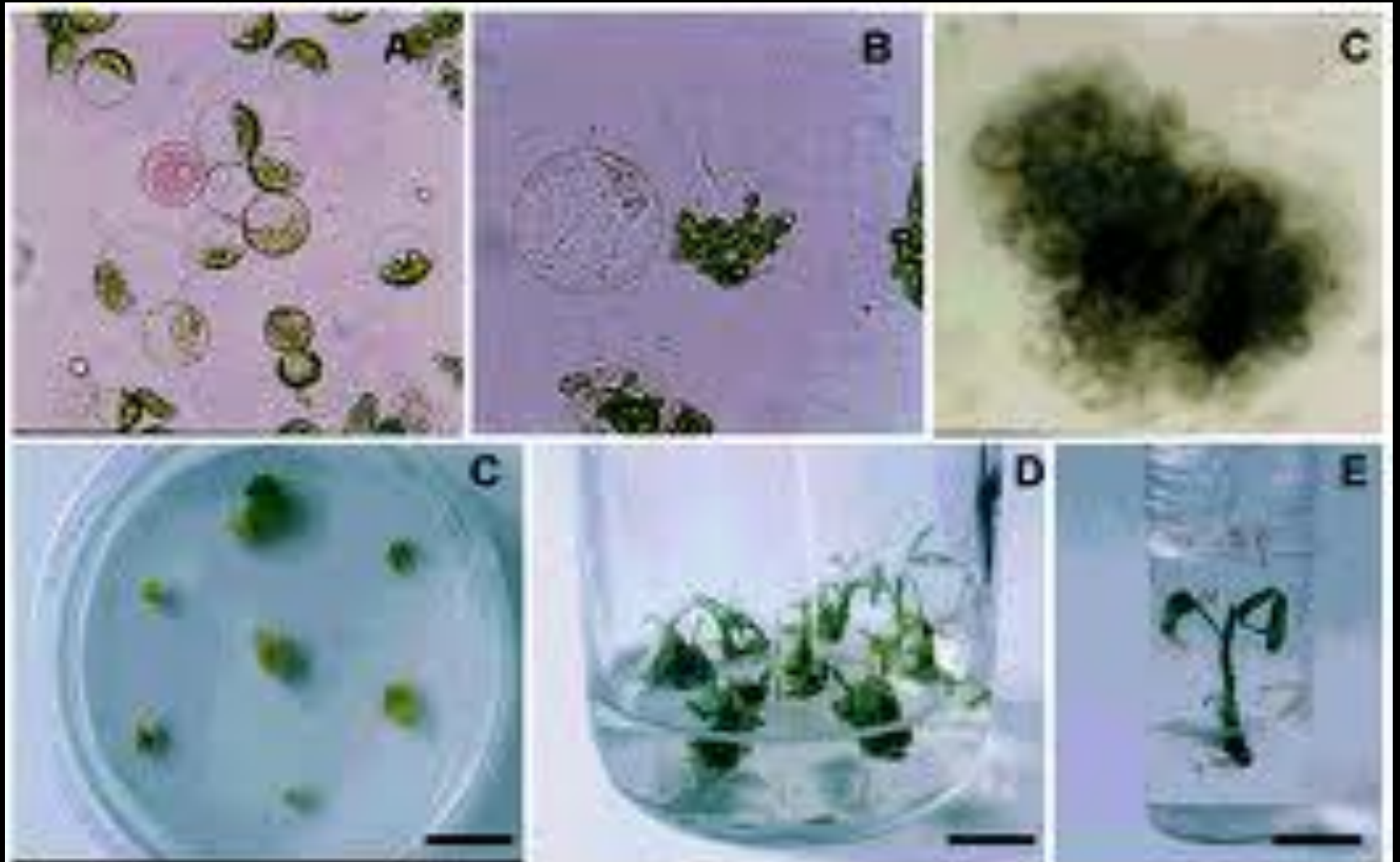


Figure 1 - Plant regeneration from protoplasts of *Stylosanthes galeata*. (A) isolated protoplasts 400 x, (B) in vitro dividing cell 400 x, (C) microcalli 200 x, (D) organogenic calli (bar = 1.33 cm), (E) shoot initiation from calli (bar = 1.33 cm), (F) rooting plantlet (bar = 0.67cm).



Springer Images



CYBRID

- Cybrid = cytoplasmic hybrid
- Diperoleh saat salah satu protoplasma yang berfusi kehilangan nukleusnya
- Salah satu inti sel bisa mati karena waktu pembelahan dengan inti sel yang lain tidak sama
- Biasanya hasilnya lebih bisa diregenerasi menjadi bibit

- Nukleus dapat dihilangkan dengan tujuan membuat cybrid
- Disebut dengan di-enukleasi / denucleated (nukleus dihilangkan)
- Dengan metode :
 - Fisik (dengan sinar gamma)
 - Kimia (penambahan zat cytochalasin B)
 - Sentrifugasi

Permasalahan

- Metode seleksi yang efisien sulit dilakukan
- Hasilnya bisa steril
- Muncul chimer
- Jenis ploidi yang tidak diinginkan
- Banyak variasi ditemukan pada hasil

Transformasi dengan *Agrobacterium tumefaciens*

- Dengan prosedur co-cultivation :
protoplast ditumbuhkan dengan kultur bakteri Agrobacter
- Fusi antara protoplast normal dengan protoplast dari jaringan tumor

