

INDUKSI KALUS DAN REGENERASI TANAMAN DARI KULTUR ANTERA PADI F1 HYBRID (*ORYZA SATIVA L.*) *

[Callus Induction and Plant Regeneration from Anther Cultures
of Rice Hybrid F1 (*Oryza Sativa L.*)]

Ita Dwimahyani, Ishak dan Sobrizal

P3TIR-BATAN, PO BOX 7010 JKSKL
Jakarta 12070

ABSTRACT

A haploid breeding program was initiated to develop doubled haploid blast tolerance rice breeding via anther culture. Blast tolerant variety (Laka) was crossed with Kencana Bali (sensitive to blast). Anthers from F1 were cultured on two kind of media (combination of N6 macro salt and MS micro salt) containing 1 mg/l NAA + 0,1 mg/l kinetin called medium-1 and another one containing 1 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l kinetin called medium-2. Anthers were treated with cold shock (4°C) for 5 and 10 days before cultured. Results of experiment showed that F1 plants derived anthers were able to form callus. Number of plantlets were produced during anthers culture consisted of 482 green plants and 50 albinos. Most of green plants did not produced root. Root growth of plantlets were induced with 1.5-4.5 mg/l IBA in MS medium.

Kata kunci/keywords: kultur antera/anther cultures; pemuliaan/breeding; haploid ganda/double haploid; padi/rice.

PENDAHULUAN

Penyakit bias yang disebabkan oleh jamur *Pyricularia oryzae* pada tanaman padi gogo merupakan kendala utama untuk pengembangan padi tersebut pada lahan kering. Perbaikan ketahanan padi terhadap penyakit bias dapat dilakukan dengan kultur antera dengan cara melakukan persilangan antara padi unggul yang tidak toleran bias dengan padi yang tidak unggul tetapi toleran bias. Plantlet yang dihasilkan dari kultur antera tanaman F1 akan homogen pada generasi R1.

Kultur antera dalam penelitian ini diharapkan dapat mempersingkat waktu yang diperlukan untuk mencapai tanaman *homozygot* yaitu dengan terjadinya penggandaan kromosom haploid secara spontan. Keberhasilan mendapatkan tanaman hijau dari kultur antera akan

memperbesar kemungkinan untuk memperoleh karakter yang diinginkan dari tanaman heterozigot atau hasil dari persilangan serta dapat mempersingkat waktu seleksi (Morrison dan Evans, 1988).

Aplikasi kultur antera dari tanaman F1 hasil persilangan akan dapat memacu program pemuliaan pada masa yang akan datang (Collins dan Genovesi, 1981). Respon setiap genotipe terhadap pembentukan kalus embriogenik dari kultur antera sangat berbeda terutama dari subspecies *indica* (Zhang and Qifeng, 1993). Perbaikan efisiensi kultur antera untuk mendapatkan kalus embriogenik dan plantlet terns dilakukan oleh peneliti yang bergerak di bidang ini. Raina dan Zapata (1997) telah memperbaiki efisiensi kultur antera dengan memodifikasi sumber nitrogen dalam medium. Sedangkan Xie *et*

* Penelitian ini dibiayai oleh Pemerintah Indonesia melalui Riset Unggulan Terpadu VI (RUT VI).

al. (1995) berhasil memperbaiki efisiensi dari kultur mikrospora padi dengan menggunakan maltosa.

Tujuan penelitian kultur antera padi dari tanaman Fl untuk jangka pendek adalah mendapatkan tanaman haploid ganda yang diinduksi dari dua jenis media kalus. Sedangkan tujuan jangka panjang untuk memperoleh tanaman haploid ganda yang toleran terhadap penyakit bias.

BAHAN DAN CARA KERJA

Persiapan material tanaman

Antera dan malainya dari var. Laka (toleran penyakit bias), Kencana Bali (peka terhadap bias) dan tanaman Fl (silangan Laka dan Kencana Bali) diambil saat tanaman berumur sekitar 80-100 hari, yaitu pada saat malai belum muncul ke permukaan (stadium bunting). Antera padi bersama malainya diberi perlakuan cekaman dingin dengan suhu 4°C selama 5 dan 10 hari, setelah itu antera dikultur pada media untuk pembentukan kalus.

Media pembentukan kalus

Media untuk pembentukan kalus yang digunakan adalah N6 (Chu *et al*, 1975) kemudian dikombinasikan dengan menggunakan unsur mikro dari MS (Murashige and Skoog, 1962) dan ditambahkan nikotinamida 0,5 mg/1; asam nikotinat 0,5 mg/1, thiamin HC11 mg/1, sukrosa 50 g/1, dan inositol 100 mg/1. Media dibagi dalam dua jenis; pertama media mengandung NAA 1 mg/1 + kinetin 0,1 mg/1 disebut media-1, media kedua mengandung 2,4-D 1 mg/1 + kinetin 0,1 mg/1 disebut media-2, diatur pH media 5,8 sebelum di autoklaf. Gabah bersama malai disterilkan dengan menggunakan HgCb (0,05%) selama 20 menit, kemudian dibilas tiga kali dengan air suling steril. Gabah dilepas dari malainya dengan menggunakan skalpel. Kulit gabah dibuka dan antera padi dilepas satu persatu dengan pisau,

kemudian dikultur pada media kalus sebanyak 30 antera untuk setiap cawan petri.

Media regenerasi

Semua kalus yang sudah terbentuk pada media kalus kemudian dipindahkan ke media regenerasi yang komposisinya hampir sama dengan media kalus kecuali hormon pertumbuhannya diganti dengan BAP 1 mg/1 dan NAA 0,05 mg/1. Sebelum kalus dipindahkan, kalus yang besar berdiameter 0,5cm dibagi menjadi potongan-potongan kecil kemudian baru dikultur pada media regenerasi. Kultur ditempatkan dalam ruang tumbuh dengan suhu 27°C dengan periode 16 jam terang dan 8 jam gelap.

Media pembentukan planlet dan akar

Semua pucuk tanaman yang terbentuk pada media regenerasi dipindahkan ke media MS bebas hormon untuk pembentukan planlet. Planlet yang tidak mampu membentuk akar pada media MS bebas hormon dipindahkan ke media MS mengandung 1,5, 3,0 dan 4,5 mg/1 IB A (Indole-3-Butyric Acid).

HASIL

Induksi kalus dari kultur antera

Kalus diinduksi dari kultur antera yang berasal dari tiga genotipe padi yaitu Laka, Kencana Bali dan tanaman Fl (silangan antara Laka dan Kencana Bali) yang sudah diberikan cekaman dingin selama 5 dan 10 hari. Varietas Laka adalah varietas padi gogo yang mempunyai ketahanan terhadap penyakit bias, sedangkan Kencana Bali adalah peka. Pengamatan yang dilakukan terhadap pertumbuhan kalus menunjukkan bahwa antera yang berasal dari antera tanaman Fl mampu membentuk kalus embriogenik akan tetapi varietas Laka dan Kencana Bali sebagai induknya tidak membentuk kalus sama sekali (Tabel 1).

Pembentukan mikrokalus dapat diamati dengan mata telanjang setelah anthera dikultur selama 6 minggu di media induksi kalus. Perkembangan selanjutnya membutuhkan waktu sekitar 10-15 hari baru dapat dipindahkan ke media regenerasi. Pengamatan di bawah mikroskop terhadap kalus yang sudah terbentuk memperlihatkan bentuk globular dan kompak (Gambar 1). Pengamatan awal dari tahap perkembangan kalus kultur anthera padi ditandai dengan membengkaknya anthera dan selanjutnya anthera membuka akibat desakan pertumbuhan mikrospora dari kultur anthera. Pembelahan sel-sel mikrospora tersebut secara bertahap membentuk mikrokoloni perkembangan selanjutnya terbentuk masa kalus. Pengaruh cekaman dingin selama 5 dan 10 hari yang dikombinasikan dengan pemberian hormon tumbuh memperlihatkan hasil yang tidak begitu berbeda (Tabel 1). Pembentukan kalus dari kultur anthera tidak terjadi pada waktu bersamaan pada media kalus. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa pembentukan kalus masih terjadi sampai 12 minggu setelah anthera dikultur. Frekuensi pembentukan kalus selama pengamatan sangat rendah sekali (data tidak ditampilkan). Kalus embriogenik yang terbentuk dipindahkan ke ruang cahaya, sebagian mampu berdiferensiasi membentuk pucuk tetapi sebagian lagi tidak. Apabila masa kalus yang terbentuk tidak segera dipindahkan ke media regenerasi, kalus tersebut tidak mampu berdiferensiasi. Pindahkan kalus ke media regenerasi harus tepat waktu sehingga *te^maflijpS& difejrejtisiasinya tidak hilanj*. Kalus yang berumur lebih dari dua bulan yang tumbuh pada media kalus tidak mempunyai kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi pucuk setelah dipindahkan ke media regenerasi.

Regenerasi dan pembentukan akar tanaman

Kalus yang dipilih adalah mempunyai struktur globular dan kompak, kemudian dipindahkan ke media regenerasi untuk

diferensiasi pucuk. Diferensiasi kalus menjadi pucuk ditandai dengan terbentuknya spot-spot hijau pada kalus yang terjadi pada hari ke 4 dan 7. Spot-spot hijau ini berdiferensiasi menjadi pucuk membutuhkan waktu 7-10 hari pada media regenerasi. Pucuk-pucuk yang sudah terbentuk ini kemudian dipindahkan lagi ke media MS bebas hormon. Secara bertahap pucuk ini berkembang menjadi tanaman di media MS bebas hormon pada hari ke 10-15. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa sebagian tanaman yang berasal dari kultur anthera padi adalah albino dan sebagian lagi diperoleh tanaman hijau. Tanaman albino ini di media MS bebas hormon mampu membentuk akar, sedangkan tanaman yang hijau sama sekali tidak membentuk akar. Perbandingan jumlah tanaman albino dengan tanaman hijau yang dihasilkan dari kultur anthera padi adalah sekitar 1:9,6 (Tabel 2). Sekitar 482 tanaman hijau yang dihasilkan selama kultur anthera padi ini tidak mampu membentuk perakaran, tetapi pucuk-pucuk baru selalu tumbuh dan berkembang. Akar dari tanaman tersebut dapat diinduksi dengan membuat seri perlakuan menggunakan IBA pada konsentrasi 1,5, 3,0 dan 4,5 mg/l dalam media MS. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa IBA mampu menstimulasi pembentukan akar dari plantlet yang dihasilkan selama kultur anthera (Tabel 3). Penggunaan IBA 3 mg/l dalam media MS dapat menstimulasi pembentukan akar lebih baik bila dibandingkan dengan menggunakan DBA 1,5 mg/l atau 4,5 mg/l dalam media MS (Tabel 3). Pembentukan akar dari plantlet mulai terjadi pada hari ke 10 setelah plantlet di kultur pada media untuk pertumbuhan akar. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa pertumbuhan akar dari plantlet yang tumbuh pada media MS mengandung IBA sangat lambat sekali bila dibandingkan pertumbuhan akar dari tanaman albino yang tumbuh pada media MS bebas hormon. Pengamatan terhadap pertumbuhan akar pada minggu keempat adalah sekitar 2,0 cm atau

lebih (Gambar 2). Planlet-planlet yang sudah mempunyai akar dapat dipindahkan ke ember plastik untuk pertumbuhan selanjutnya.

Tabel 1. Pengaruh Cekaman dingin dan kombinasi honnon tumbuh terhadap pembentukan kalus

Cekaman (media)	Pembentukan kalus dari tiga genotipe		
	Var. laka	Tanaman Fl	Var. K. Bali
A5 (media-1)	0	32	0
A5(media-2.)	0	20	0
A10(media-1)	0	16	0
A10(media-2)	0	2	0

A5 = antera diberi cekaman dingin 5 hari; A10 = antera diberi cekaman dingin selama 10 hari.

Tabel 2. Pembentukan planlet dari kalus yang ditumbuhkan pada media regenerasi

Genotipe	Pembentukan planlet pada media regenerasi	
	Hijau	Albino
Laka	-	-
Fl (LakaxKencana)	582	50
Kencana	-	-

Tabel 3. Pengaruh hormon IBA terhadap pembentukan akar planlet berasal dari kultur antera

Konsentrasi IBA	Jumlah planlet	Jumlah planlet berakar	% Planlet berakar
0,0 mg/l	26	0	0,0
1,5 mg/l	174	120	68,33
3,0 mg/l	156	127	81,41
4,5 mg/l	117	66	56,40

PEMBAHASAN

Perkembangan kalus dari kultur antera berasal dari mikrospora yang terdapat dalam antera. Mikrospora dari antera padi Fl akan dapat diuji apakah membawa gen yang toleran terhadap bias atau tidak pada generasi R1. Secara teoritis tanaman yang dihasilkan dari kultur antera tanaman Fl pada penelitian ini kemungkinan akan membawa gen toleran bias 50% dan yang peka 50%. Oleh karena itu, tanaman yang dihasilkan

dari kultur antera ini 50% kemungkinan akan diperoleh tanaman homozigot toleran blast dan 50% akan mendapatkan tanaman homozigot peka.

Rendahnya frekuensi pembentukan kalus pada tanaman hybrid Fl sama dengan yang dilaporkan oleh Reiffers dan Freire (1990) dan Raina *et al.* (1987). Frekuensi pembentukan kalus sangat tergantung dari genotip dan media yang digunakan (Rackoczy *et al.* 1997). Pembentukan kalus juga dipengaruhi oleh perlakuan awal seperti cekaman dingin (Qu dan Chen, 1983) dan kondisi tumbuh kultur media (Goldberg *et al.* 1993; Xie *et al.* 1995). Miah *et al.* (1996) memproduksi tanaman haploid ganda yang tahan terhadap garam melalui kultur antera. Keuntungan memproduksi tanaman haploid ganda dari kultur antera hanya membutuhkan waktu dua generasi untuk mencapai homozigot.

Kedua tetua dari tanaman padi Fl yaitu Laka dan Kencana Bali tidak mampu membentuk kalus walaupun telah diberi cekaman dingin selama 5 dan 10 hari. Ishak dan Ita Dwimahyani (1997), melaporkan bahwa cekaman dingin (4°C) pada antera padi sebelum dikultur akan memperbaiki pembentukan kalus. Keberhasilan mendapatkan kalus embriogenik dari tanaman Fl kemungkinan disebabkan terjadinya heterosis pada antera sehingga menstimulasi mikrospora untuk mampu membelah dan selanjutnya membentuk kalus. Heterosis merupakan fenomena yang sering terjadi pada tanaman hibrid. Zhuping (1997) telah melaporkan terjadinya perbaikan kesuburan tanaman dari kultur antera tanaman Fl. Perbaikan kesuburan tanaman hasil persilangan antara Japonika dan Indika melalui kultur antera sangat mungkin terjadi karena heterosis (Yuan, 1990, 1991). Adanya pembentukan kalus yang tidak serentak dari kultur antera padi pada penelitian ini juga sudah dilaporkan pada kultur antera padi varietas Arias (Ishak dan Ita Dwimahyani, 1997). Tanaman haploid ganda yang diperoleh dari penelitian ini akan dapat diuji ketahanannya

terhadap penyakit bias pada generasi R1. Apakah tanaman tersebut raembawa gen ketahanan terhadap bias atau tidak. Kalau ternyata tanaman haploid tersebut membawa gen yang toleran terhadap bias, maka tanaman yang diperoleh ini adalah tanaman homozigot yang toleran terhadap bias.

KESIMPULAN DAN SARAN

Hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa telah terjadi heterosis pada antera tanaman Fl sehingga antera mempunyai kemampuan membentuk kalus embriogenik, sedangkan antera dari kedua tetuanya tidak mempunyai kemampuan untuk membentuk kalus. Perlakuan cekaman dingin selama 5 hari pada antera sebelum dikultur dengan media kultur menggunakan hormon pertumbuhan 2.4-D + kinetin mampu mendapatkan kalus embriogenik lebih baik bila dibandingkan dengan perlakuan lainnya seperti cekaman dingin 10 hari yang ditumbuhkan pada media mengandung NAA + kinetin. Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa pembentukan kalus embriogenik dari kultur antera sangat tergantung dari genotipe yang digunakan sebagai sumber eksplan. Oleh karena itu disarankan perlu melakukan penelitian kultur antera yang intensif sehingga diperoleh teknologi yang "reproducible" dalam memperoleh tanaman haploid ganda untuk membantu program pemuliaan tanaman pada masa yang akan datang.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih pada Yulidar dan Sutisna yang telah membantu penelitian ini hingga selesai.

DAFTAR PUSTAKA

- Chu CC, Wang CC, and Sun CS. 1975.** Establishment of efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on nitrogen sources. *Scientia Sinica* **18**, 659- 668.
- Collins GB and Genovasi AD. 1991.** Anther culture and its application to crop improvement. In Tomes DT, Ellis BE, Harney PM, Kasha KJ, Pattaerson RL (EHs) *Application of Plant Cell and Tissue Culture to Agriculture an Industry*. University of Guelph. Ontario, 1-24
- Goldberg RB, Beals TP and Sanders PM. 1993.** Anther development: Basic principles and practical applications. *The Plant Cell* **5**, 1217-1229.
- Ishak dan Ita Dwimahyani. 1997.** Induksi kalus dan regenerasi tanaman dari kultur antera padi var. Arias. *Jurnal Bioteknologi Pertanian* **2** (2), 44-48.
- Morrison RA and Evans DA. 1988.** Haploid plant from tissue culture: New plant varieties in a shortened time frame. *BioTechnology* **6**, 684-690.
- Miah MAA, Pathan MS and Quayum HA. (1996).** Production of salt tolerant rice breeding line via doubled haploid. *Euphytica* **91**, 285-288
- Murashige T and Skoog F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiology* **15**, 473-497.
- Qu RD and Chen Y. 1983.** A preliminary research on the function of enhancement of callus induction frequency by cold pretreatment in rice anther culture. *Acta Phytophysiological Sinica* **9**, 375-381.
- Rackozcy MT, Smiech M and Malepszy S. 1997.** The influence of genotype and medium on rye (*Secale cereale* L.) anther culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **48**, 15-21.
- Raina SK, Sathish P, and Sarma KS. 1987.** Plant regeneration from in vitro cultures of anthers and mature seeds of rice (*Oryza sativa* L.) cv. Basmati-370. *Plant Cell Report* **6**, 4-45.
- Raina SK and Zapata SK 1997.** Enhancement anther culture efficiency of india rice (*Oryza sativa* L.) Through modification of the culture media. *Plant Breeding* **116**, 305-315.
- Reiffers I and Freire AB. 1990.** Production double haploid rice plants (*Oryza sativa* L.) by anther culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **21**, 165-170.
- Xie J, Gao M, Cai Q, Cheng X, Shen Y and Hang Z. 1995.** Improved isolated microspore culture efficiency in medium with maltose and optimized growth

regulator combination in Japonica rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 42, 245-250.

Yuan LP. 1990. Advances on Hybrid rice breeding by two-line method. *Science Agricultural Sinica* 23 (3), 1-6.

Yuan LP. 1991. Outlook on the development of hybrid rice breeding. In: Xiong ZM and Min SK (eds). *Prospects of Rice Farming for 2000*. Zhejiang Publishing House of

Science & Technology. Hangzhou. China, 205-221.

Zhang C and Qifeng C. 1993. Genetic studies of rice (*Oryza sativa* L.) anther culture response. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 34, 177-182.

Zhuping Y. (1997). Breeding of widely compatible restore lines in rice (*Oryza sativa* L.) through anther culture. *Euphytica* 95, 253-258.



Gainbar I. Pembentukan kalus • embriogenik dari kultur antera tanaman Fl. Kalus berasal dari pembelahan mikrospora yang terdapat dalam antera



Gainbar 2. Pembentukan akar planlet pada media MS mengandung IBA