

PENENTUAN TAHAP PERKEMBANGAN MIKROSPORA TERONG cv. Fabian UNTUK INDUKSI MIKROSPORA EMBRIOGENIK

Devi Bunga Pagalla¹, Magfirahtul Jannah¹, Ari Indrianto^{2,RIP}, Endang Semiarti², Annisa Sholikhah²

¹Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Gorontalo, Jl. Prof. B.J. Habibie, Bone Bolango 96554, Gorontalo, Indonesia.

²Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Jl. Teknik Selatan, Sleman 55281, Yogyakarta, Indonesia
Email: devibungapagalla@ung.ac.id

ABSTRAK

Produksi tanaman haploid ganda melalui kultur mikrospora sangat menguntungkan dalam pemuliaan tanaman untuk memperoleh tanaman yang bersifat homozigot dengan karakter unggul dalam waktu yang lebih cepat dibandingkan metode konvensional. Mikrospora yang dikultur *in vitro* dengan kombinasi kondisi kultur dan *stress* yang optimal, dapat mengubah jalur perkembangan mikrospora dari gametofitik normal ke jalur sporofitik sehingga menghasilkan embrio dan tanaman haploid atau *double* haploid (DH). Dalam penelitian ini dilakukan tahap awal kultur mikrospora yaitu penentuan tahap perkembangan mikrospora yang tepat untuk diinduksi menjadi mikrospora embriogenik. Tahap perkembangan mikrospora terong cv. Fabian yang dapat diinduksi menjadi embriogenik yaitu tahap uninukleat akhir dan binukleat awal.

Kata-kata kunci: uninukleat akhir, binukleat, embriogenesis mikrospora, *double* haploid

1. PENDAHULUAN

Solanaceae merupakan salah satu keluarga sayuran yang paling penting untuk pertanian global. Di antara berbagai spesies solanaceous, tembakau (*Nicotiana tabacum*), kentang (*Solanum tuberosum*), tomat (*Solanum lycopersicum*), terong (*Solanum melongena*), dan lada (*Capsicum annum*) adalah lima tanaman yang sangat penting di dunia. Familia Solanaceae sangat responsif terhadap berbagai teknik kultur (Segui-Simarro, 2016). Kultur antera menjadi alternatif regenerasi tanaman haploid terong yang paling populer digunakan seperti yang dilakukan oleh Chinese Research Group of Haploid Breeding, 1978; Rotino *et al.*, 1987; Tuberosa *et al.*, 1987; Khatun *et al.*, 2006; Salas *et al.*, 2012; dan Rotino, 2016. Kultur mikrospora pada terong pertama kali dilaporkan oleh Gu (1979) dan Miyoshi (1996) induksi kalus dan planlet dari mikrospora, dan kemudian Bal *et al.*, (2009). Produksi haploid atau ganda haploid melalui androgenesis dapat meningkat dua kali lipat dalam waktu yang relatif singkat. Namun pada terong, masih jauh dari optimal, karena salah satu kelemahan utama dalam teknik ini adalah produksi *double* haploid masih diregenerasi dari kalus bukan embrio secara langsung (Corral-Martinez *et al.*, 2008).

Embriogenesis mikrospora (kultur mikrospora) merupakan salah satu metode pemuliaan yang dapat digunakan untuk memproduksi tanaman haploid atau ganda haploid terong. Produksi tanaman haploid atau ganda haploid dari mikrospora memberikan keuntungan yang sangat besar bagi pemulia tanaman untuk memproduksi sejumlah besar tanaman homozigot

(galur murni) atau tanaman F1 dalam satu kali generasi (Summers *et al.*, 1992). Produksi garis homozigot melalui kultur mikrospora dapat diperoleh dalam waktu yang relatif singkat dan tidak membutuhkan biaya yang besar dibandingkan dengan metode pemuliaan konvensional yang membutuhkan penyilangan beberapa kali sehingga membutuhkan waktu yang lebih lama untuk menghasilkan tanaman F1 (Snape, 1989; Maluszynski *et al.*, 2003; Adhikari & Kang, 2017).

Kuncup bunga dan tahap perkembangan mikrospora memiliki korelasi yang kuat dalam pembentukan embrio melalui induksi embriogenesis mikrospora. Tahap perkembangan mikrospora *vacuolated* merupakan tahap perkembangan yang memungkinkan untuk terjadinya *reprogramming* mikrospora pada kebanyakan spesies (Olmedilla, 2010).

Pemilihan atau seleksi kuncup bunga merupakan tahap awal dalam kultur mikrospora. Pemilihan dan penentuan kuncup bunga yang tepat akan mendukung keberhasilan kultur mikrospora. Kuncup bunga dan tahap perkembangan mikrospora memiliki hubungan dalam pembentukan embrio melalui induksi embriogenesis mikrospora (Adhikari & Kang, 2017). Oleh karena penelitian ini bertujuan untuk menentukan tahap perkembangan mikrospora yang tepat sebagai langkah awal kultur mikrospora terong cv. Fabian untuk diinduksi menjadi mikrospora embriogenik.

2. METODOLOGI

2.1 Alat dan Bahan

Alat untuk mengamati tahap perkembangan mikrospora meliputi *OptiLab advance 2.2* (Miconos) mikroskop *fluorescence inverted* (Nikon Diaphot 300, Japan), mikroskop stereo (Nikon, Japan) mengamati morfologi antera, batang pengaduk dan cawan petri ukuran 35x15 mm.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi medium B (Kyo & Harada, 1986) sebagai medium starvasi sukrosa dan nitrogen, kuncup bunga terong cv. Fabian berbagai ukuran sebagai sumber eksplan, alkohol 70%, akuades dan *tissue*.

2.2 Prosedur Kerja

Kuncup bunga dipetik dan dikumpulkan dari tanaman terong cv. Fabian yang berumur 30-40 hari. Sebelum diamati, kuncup bunga yang dipetik diukur terlebih dahulu (Panjang kuncup bunga, panjang petala, panjang antera dan diameter kuncup bunga). Kemudian antera disterilisasi menggunakan akuades selama 3 menit sebanyak 3x, lanjut sterilisasi dengan alkohol 70% selama 5 menit lalu dibilas akuades sebanyak 3x. Antera dari setiap kuncup bunga dikumpulkan dalam cawan petri ukuran 35x15 mm, diberi 1 ml medium B, digerus menggunakan batang pengaduk, hingga semua antera pecah dan mikrospora keluar. Mikrospora diamati dibawah mikroskop cahaya *Fluorescence Inverted*. Distribusi mikrospora tetrad/meiosis, uninukleat awal/*young microspore* (YM), uninukleat tengah/*mid microspore* (MM), uninukleat akhir/*Vacuolate Microspore* (VM), binukleat awal/*young bicellular pollen* (YBP), dan polen matang (*Mature pollen*). Tahap perkembangan mikrospora yang teramati dibawah mikroskop diidentifikasi fase perkembangannya pada setiap kuncup bunga yang berbeda. Tahap perkembangan mikrospora diamati pada 10 bidang pandang setiap cawan petri menggunakan *software Optilab 2.2*.

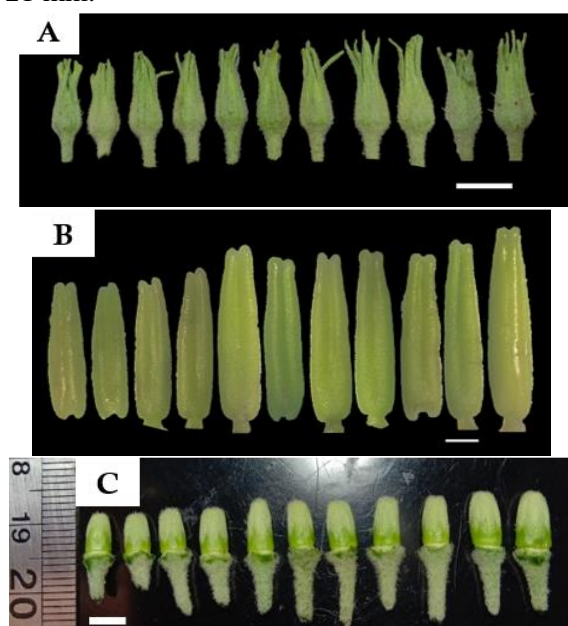
Data penelitian yang diperoleh merupakan data kuantitatif dan kualitatif yang ditunjukkan dengan gambar untuk setiap tahap perkembangan mikrospora yang teramati.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Hasil

Kuncup bunga terong cv. Fabian memiliki bentuk kuncup bunga lonjong, bagian sepala panjang, mahkota bunga berwarna ungu, kadang ditemukan berduri (*spina*) dan tangkai bunga (*Pedicellus*) cukup panjang (Gambar 1). Rata-rata

diameter kuncup bunga (Tabel 1) untuk setiap interval panjang kuncup bunga, diameter terbesar 5.97 mm pada interval panjang kuncup bunga 20->21 mm.



Gambar 1. Morfologi kuncup bunga terong cv. Fabian A) Kuncup bunga yang diamati, Skala bar= 10 mm; B) Morfologi antera, Skala bar= 1 mm; C) Morfologi petala, Skala bar= 5 mm.

Dalam satu kuncup bunga terong umumnya memiliki 5 antera, namun selama pengamatan ditemukan juga kuncup bunga dengan empat, enam, tujuh, delapan bahkan sepuluh antera (Tabel 1) Hal ini tergantung jenis dan varietas terong, dan besar kecilnya diameter kuncup bunga.

Tabel 1. Jumlah antera tiap 10 kuncup bunga dan rata-rata panjang petala dan diameter kuncup bunga.

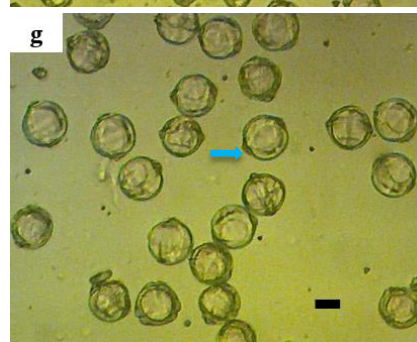
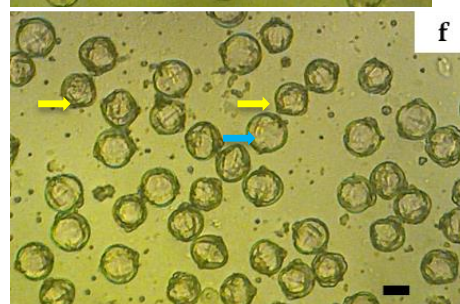
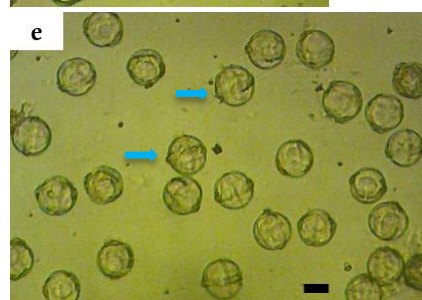
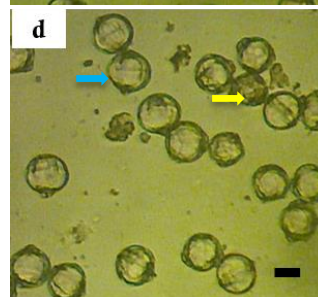
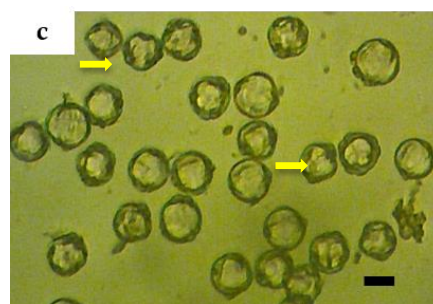
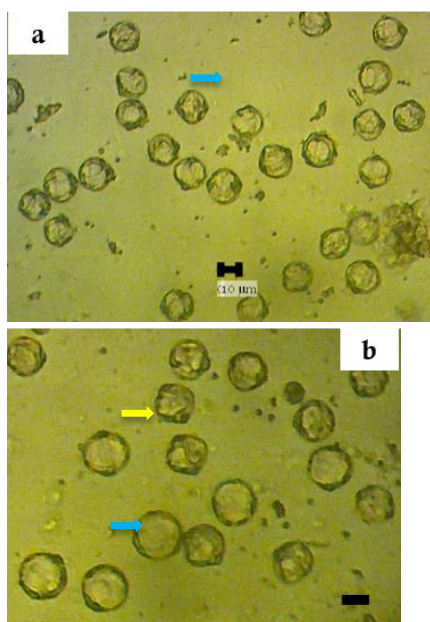
Kultivar	Panjang Kuncup Bunga (mm)	Rata-rata Ukuran		Jumlah antera tiap 10 kuncup bunga
		Diameter kuncup bunga (mm)	Panjang Petala (mm)	
	8.0-9.0	2.89	5.60	
	10.0-11.0	3.63	6.50	
	12.0-13.0	4.44	7.88	
	14.0-15.0	4.93	8.00	53
	16.0-17.0	5.55	8.77	
	18.0-19.0	5.88	8.83	
	20.0->21.0	5.97	9.42	

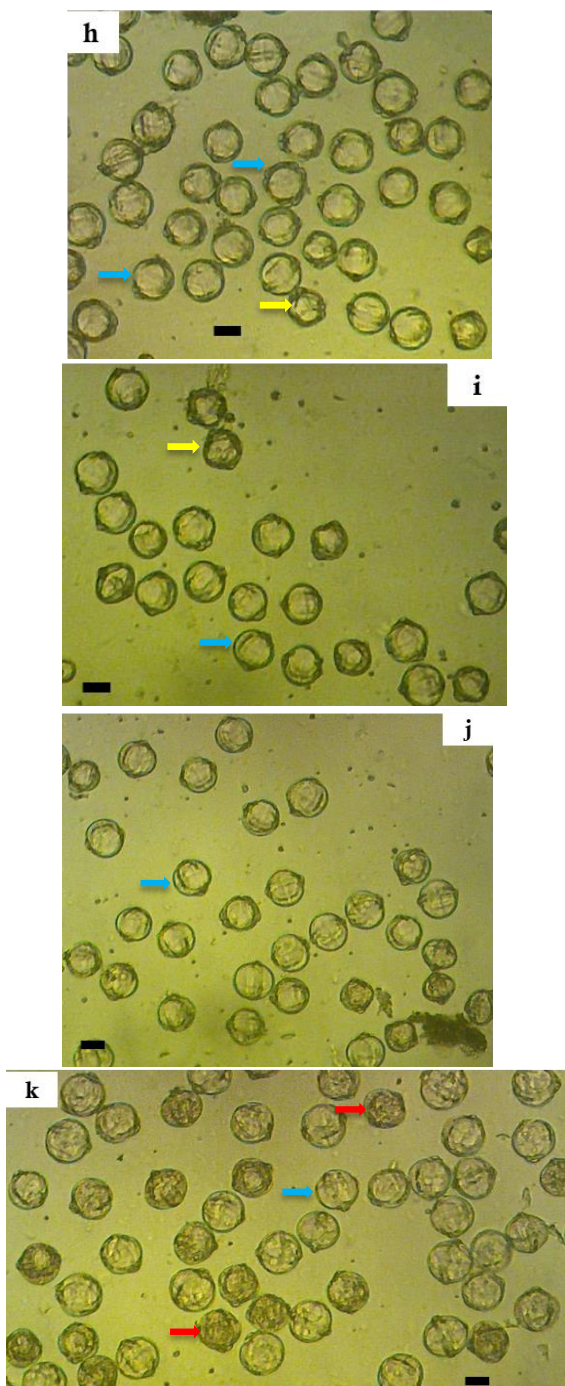
Tahap perkembangan mikrospora yang teramati pada ukuran kuncup bunga (Gambar 1) dan (Tabel 2.), mikrospora yang teramati tidak semua tahap perkembangan mikrospora. Gambar 2 menunjukkan bahwa tahap perkembangan mikrospora yang teramati hampir sama. Tahap perkembangan yang teramati yaitu uninukleat

tengah/MM (panah kuning), uninukleat akhir/VM (panah biru) dan binukleat awal/YBP (panah merah). Fase binukleat akhir (*mature pollen*) dan fase tetrad serta uninukleat awal tidak ditemukan pada ukuran dan morfologi kuncup bunga yang diamati. Tahap uninukleat tengah banyak dijumpai pada panjang antera 4-4.9 mm (Gambar 1.a) sedangkan tahap uninukleat akhir/ VM dan binukleat awal/YBP ditemukan pada panjang antera 5.5->6. Berdasarkan hasil pengamatan, dapat diasumsikan bahwa tahap tetrad dan uninukleat awal dapat ditemukan pada ukuran panjang antera dibawah 4 mm.

Tabel 2. Hasil pengukuran 11 kuncup bunga terong cv. Fabian; PK (panjang kuncup/mm); DK (diameter kuncup/mm); PP (panjang petala/mm); PA (panjang antera/mm); dan JA (jumlah antera).

PK	DK	PP	PA	JA
14	5.04	5.5	4.5	6
14	5.15	5.5	4	6
15	5.29	6	4.95	5
15	5.51	6.5	5	6
15	5.30	7.5	5.5	5
16	5.52	7	5.3	5
16	5.35	7	5.5	6
18	5.73	6.5	5.5	5
18	5.71	7	5	5
16	6.18	8	5.5	6
18	6.64	8	6	6





Gambar 2. Tahap perkembangan mikrospora pada berbagai ukuran kuncup bunga terong cv. Fabian. Panah kuning (Uninukleat tengah/MM); Panah biru (Uninukleat akhir/VM) dan Panah merah (YBP). Skala bar= 10 μ m.

3.2 Pembahasan

Kuncup bunga dan tahap perkembangan mikrospora memiliki korelasi yang kuat dalam pembentukan embrio melalui induksi embriogenesis mikrospora. Tahap perkembangan mikrospora *vacuolated* merupakan tahap perkembangan yang memungkinkan untuk terjadinya *reprogramming* mikrospora pada

kebanyakan spesies (Olmedilla, 2010). Menurut Salas *et al.*, (2012) mengungkapkan bahwa pada terong, mikrospora pada tahap *young microspore* (YM) dan *mid-microspore* (MM) tidak menunjukkan respons pertumbuhan setelah ditransfer ke medium embriogenesis. Tahap optimal untuk induksi embriogenesis bukanlah tahap transisi dari *vacuolate microspore* (VM) ke tahap *young bicellular pollen* (YBP). Ketika VM dan YBP dikultur dalam medium cair, keduanya menunjukkan respon pertumbuhan kearah mikrospora embriogenik. Panjang kuncup bunga 15-15.9 mm pada terong cv. Bandera, mengandung 72,3% VM+YBP, sedangkan kisaran Panjang antera 6-6.4 mm mengandung 72% VM+YBP. Menurut Salas *et al.*, (2012) panjang kuncup bunga menentukan stadium perkembangan mikrospora pada terong (*Solanum melongena* L.cv. Bandera).

Menurut Pagalla *et al.*, (2020) tahap kuncup bunga yang sesuai merupakan penentu penting keberhasilan kultur mikrospora dimana ukuran morfologi kuncup bunga yaitu panjang kuncup bunga, dan panjang antera berkorelasi dengan tahap perkembangan mikrospora dan tahap perkembangan anter. Hal ini juga sesuai dengan tahap perkembangan mikrospora pada terong cv. Fabian (Tabel 2) dan (Gambar 2) menunjukkan korelasi antara tahap perkembangan mikrospora yang teramati dengan ukuran morfologi kuncup bunga.

Pada kultur antera tomat (Adhikari & Kang, 2017) mengungkapkan bahwa panjang antera merupakan parameter yang kuat untuk menentukan tahap perkembangan mikrospora. Kuncup bunga biasanya dipanen ketika mikrospora pada tahapan uninukleat akhir hingga binukleat awal (Ferrie & Caswell, 2011). Kuncup bunga terong yang mengandung stadium mikrospora uninukleat akhir dan binukleat awal sekitar 70 % adalah fase yang tepat untuk induksi androgenesis (Salas *et al.*, 2012).

Kuncup bunga terong yang mengandung VM+YBP dengan persentase yang tinggi digunakan untuk induksi embriogenesis mikrospora dengan perlakuan medium B starvasi dan cekaman suhu.

4. SIMPULAN

Berdasarkan hasil pengamatan tahap perkembangan mikrospora pada kuncup bunga terong cv. Fabian dapat disimpulkan bahwa panjang kuncup bunga dan panjang antera dapat digunakan sebagai acuan untuk mengetahui tahap perkembangan mikrospora dalam antera.

DAFTAR PUSTAKA

- Adhikari, P. B. & Kang, W.H. 2017. Association of Floral Bud and Anther Size with Microspore Developmental Stage in Campari Tomato. *Horticultural Science and Technology* 35(5):608-617.
- Bal, U., Ellialtioglu, S., Abak, K. 2009. Induction of symmetrical nucleus division and multi-nucleate structures in microspores of eggplant (*Solanum melongena* L.) cultured in vitro. *Sci Agric*. 66:535–539.
- Corral-Martinez P, Nuez F, & Seguí-Simarro J.M. 2008. Recent advances in eggplant microspore cultures for production of androgenic doubled haploids. In: Prohens J, Badenes ML (eds) *Modern variety breeding for present and future needs* UPV Press. Proceeding of the 18th EUCARPIA general congress. Valencia, Spain:104–108
- Ferrie, A.M.R. & Caswell, K.L. 2011. Isolated Microspore Culture Techniques and Recent Progress for Haploid and Doubled Haploid Plant Production. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 104 (3):301-309
- Gu, S.R. 1979. Plantlets from isolated pollen culture of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Acta Bot Sin* 21:30–36
- Khatun, F., Bahadur, M. & Nasiruddin, K.M. 2006. Regeneration of Eggplant through Anther Culture. *Pakistan Journal of Biosciences*. 9(1):48-53
- Maluszynski M, Kasha, K.J. & Szarejko, I. 2003. Published doubled haploid protocols in plant species. In Maluszynski, M., Kasha, K.J., Forster, B.P., and Szarejko, I. eds, *Doubled haploid production in crop plants: A manual*. Springer, Dordrecht, The Netherlands:309-335
- Miyoshi, K. 1996. Callus induction and plantlet formation through culture of isolated microspores of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Plant Cell Rep* 15:391–395.
- Olmedilla, A. 2010. *Plant developmental biology-biotechnical perspective: volume 2*. Chapter 2 Microspore embryogenesis. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Pagalla, D.B., Indrianto, A., Maryani & Semiarti, E. 2020. Induction of Microspore Embryogenesis (*Solanum melongena* L.) ‘Gelatik’. *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology (JTBB)*. 05(02): 124-131.
- Research Group of Haploid Breeding. 1978. Induction of haploid plants of *Solanum melongena* L. Proceedings of the “symposium on plant tissue culture”. *Sci. Press, Peking*: 227–232.
- Rotino, L.G. 2016. Anther Culture in Eggplant (*Solanum melongena* L.). In *Vitro Embryogenesis in Higher Plants. Methods in Molecular Biology*. Springer Science+Business Media New York. 1359:453-466
- Salas, P., Rivas-Sendra, A., Prohens, J. & Seguí-Simarro, J.M. 2012. Influence of the stage for anther excision and heterostyly in embryogenesis induction from eggplant anther cultures. *Euphytica* 184:235–250.
- Seguí-Simarro, J.M. 2016. Chapter 9: Androgenesis in Solanaceae. In *Vitro Embryogenesis in Higher Plants, Methods in Molecular Biology*. 1359:209-244.
- Snape, J. 1989. Doubled haploid breeding: theoretical basis and practical applications. In *Review of advances in plant biotechnology*. 2nd Int. Symposium Genetic Manipulation in Crops. International Maize and Wheat Improvement Center and International Rice Research Institute (CIMMYT and IRRI), Manila, The Philippines:19-30.
- Summers, W.L., Jaramillo, & T.Bailey. 1992. Microspore Developmental Stage and Anther Length Influence the Induction of Tomato Anther Callus. *Hortscience*. 27(7):838-840.

Tuberosa, R., Sanguineti, M.C. & Conti, S. 1987. Anther culture of egg-plant (*Solanum melongena* L.) lines and hybrids. Genet Agr 41:267–27.