

Teknologi Kultur Haploid untuk Mendukung Program Pemuliaan Tanaman Kakao

Sulistiyani Pancaningtyas¹⁾, Teguh Iman Santoso¹⁾, dan Bayu Setyawan¹⁾

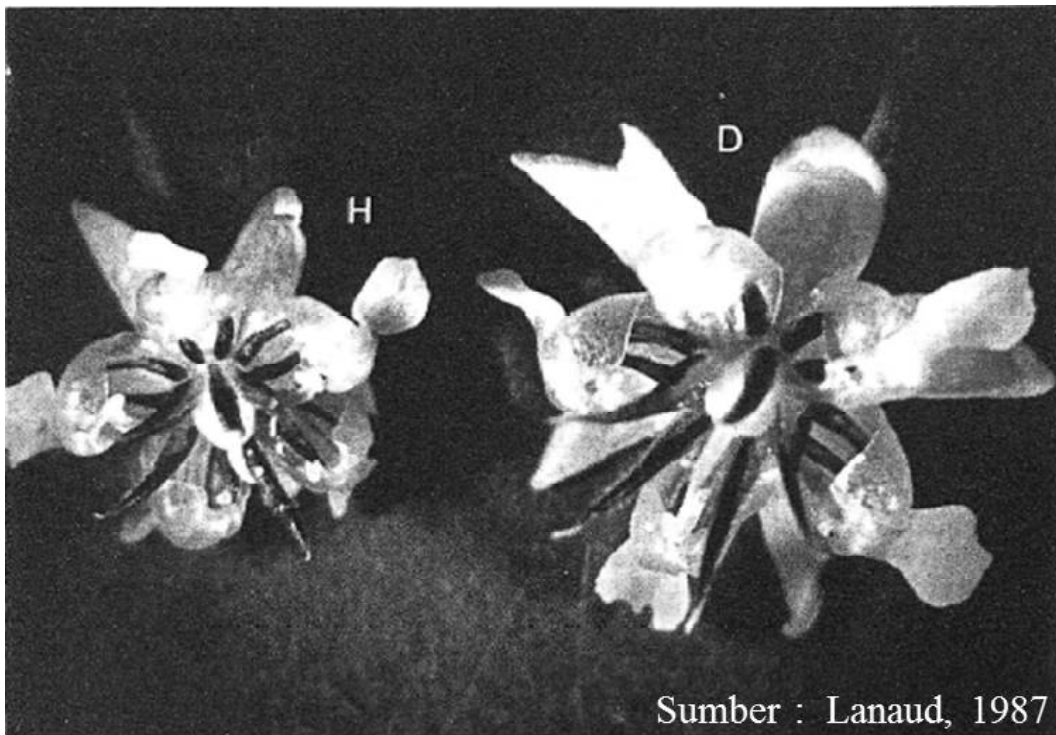
¹⁾Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia, Jl. PB. Sudirman 90 Jember 68118

Kegiatan pemuliaan tanaman kakao pada saat ini masih menggunakan metode konvensional yaitu persilangan, seleksi, dan eksplorasi sehingga memerlukan waktu yang lama untuk menghasilkan varietas/klon baru. Hal tersebut mendorong pengembangan pemuliaan tanaman kakao melalui pendekatan bioteknologi melalui embriogenesis somatik, somatik hibridisasi, dan regenerasi melalui kultur protoplas. Tahap yang lebih lanjut dari teknik embriogenesis pada tanaman adalah pembentukan klon baru tanpa melibatkan penyatuan sel gamet jantan dan betina, proses ini salah satunya dikenal sebagai kultur haploid/haploid ganda menggunakan antera maupun ovule. Melalui kultur haploid/haploid ganda diharapkan dapat memperpendek proses pemuliaan tanaman dan menghasilkan tanaman galur murni. Pada tanaman kakao, teknik ini belum pernah dikembangkan dan dilaporkan, sehingga studi awal kultur antera bermanfaat untuk program pemuliaan tanaman kakao.

Pendekatan teknologi pada bidang pertanian saat ini ditujukan untuk meningkatkan produktivitas dan kualitas tanaman. Perbaikan genetik pada tanaman kakao terutama digunakan untuk memproduksi tanaman yang memiliki ketahanan terhadap hama dan penyakit utama kakao, memiliki fenotipe unggul serta memiliki kualitas cita rasa yang tinggi. Secara konvensional, proses embriogenesis diperoleh melalui persilangan sel gamet jantan dan betina untuk menghasilkan hibrida F1, selanjutnya dua set kromosom pada tanaman F1 bersegregasi acak pada generasi-generasi selanjutnya. Keturunan dari generasi pertama (F1) bersifat heterozigot tetapi secara genetik seragam. Pemulia tanaman harus menyeleksi galur yang diinginkan dan menanamnya untuk sedikitnya 8-

10 generasi melalui seleksi yang terus menerus, sampai 2 set kromosom pada galur yang disilangkan menjadi identik (homozigot).

Dalam upaya meningkatkan efisiensi dari program pemuliaan tanaman dalam menghasilkan generasi yang homozigot, maka perlu dilakukan studi untuk menghasilkan tanaman homozigot melalui pendekatan teknologi kultur haploid, yang meliputi regenerasi dan produksi tanaman haploid ganda yang berasal dari gamet. Individu ini biasanya steril (mandul), oleh karena itu aplikasi zat tertentu seperti kolkisin, dapat menggandakan jumlah genom dan menghasilkan individu dengan jumlah genom normal (dikenal sebagai haploid ganda atau *doubled-haploid*) sehingga mampu bereproduksi seperti biasa. Selain itu, teknologi kultur haploid juga dapat digunakan sebagai suatu model untuk mempelajari aspek-aspek dasar dari



Bunga kakao dari tanaman haploid (H) pada sebelah kiri dan tanaman diploid (D) pada sebelah kanan

genetika tanaman dan embriogenesis. Tanaman haploid bersifat steril artinya tidak dapat menghasilkan biji. Akan tetapi pada kultur antera secara tidak langsung, kromosomnya mengalami duplikasi secara spontan sehingga menghasilkan tanaman haploid ganda yang bersifat fertil. Berdasarkan hasil penelitian Lanaud³⁾, tanaman haploid dapat dikenali perbedaannya dari tanaman diploid terutama pada saat tanaman tersebut sudah dipelihara dalam rumah kaca. Perbedaannya antara lain pada tinggi tanaman, warna, ukuran daun, dan perkembangan akar.

Kultur Haploid/Haploid Ganda pada tanaman kakao

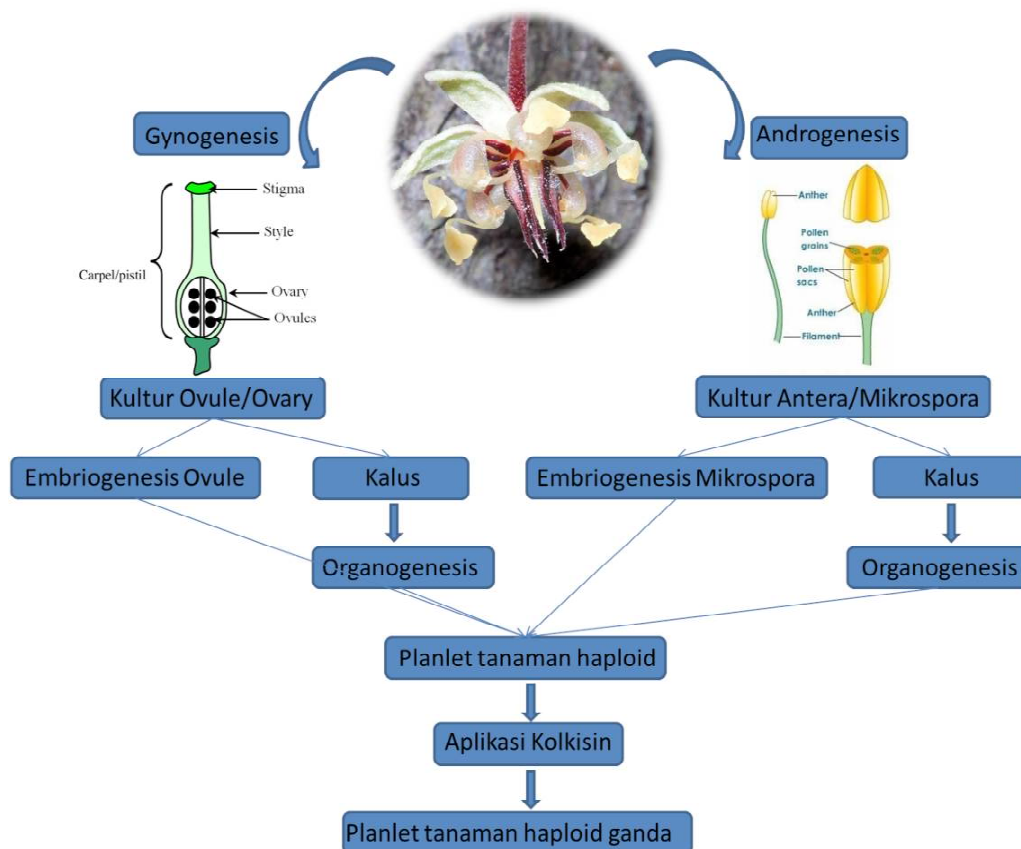
Program perbaikan genetik untuk tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) umumnya didasarkan pada produksi bibit hibrida yang diperbanyak secara generatif. Tanaman kakao membutuhkan waktu beberapa tahun untuk siklus reproduksinya, sehingga persilangan berulang dianggap kurang efisien lagi untuk dilakukan. Untuk mengatasi masalah heterogenitas yang disebabkan dari hibrida hasil persilangan, pemulia tanaman mencari tetua yang lebih homogen untuk digunakan pada program pemuliaan tanaman kakao. Oleh karena itu, diperlukan tanaman haploid atau haploid

ganda untuk mendapatkan galur murni yang homozigot untuk meningkatkan performa fenotipik baik secara spontan maupun melalui kultur haploid.

Kultur haploid pada tanaman kakao diperoleh melalui androgenesis melalui kultur antera dan mikrospora³⁾, sedangkan gynogenesis diperoleh melalui kultur ovule dan ovari⁴⁾. Pada kultur antera atau mikrospora maupun kultur ovari, genotipe, ukuran bunga, dan perlakuan pra-perlakuan sangat berpengaruh terhadap keberhasilan kultur. Ukuran bunga berkaitan dengan tahap perkembangan antera dan ovari. Bunga dengan ukuran panjang 4-6 mm dianggap ukuran yang sesuai untuk kultur haploid karena mikrospora berada pada tahap bi-nukleat dan ovari masak secara fisiologis⁴⁾.

Faktor-faktor yang Mempengaruhi Keberhasilan Kultur Haploid

Untuk meningkatkan peluang mendapatkan tanaman haploid ganda sering digunakan senyawa kimia kolkisin yang sifatnya dapat menginduksi poliploidi terutama apabila proses androgenesisnya terjadi secara langsung. Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi keberhasilan kultur haploid⁵⁾ adalah:



Kultur androgenesis (polen dan mikrospora) dan gynogenesis (ovule dan ovari) melalui proses embriogenesis dan pembentukan kalus

a. Genotipa Tanaman Tempat Antera Berasal

Pemilihan bahan awal atau sumber eksplan untuk kultur antera merupakan bagian yang sangat penting. Genotipe dari sumber bahan antera memegang peranan penting dalam menentukan keberhasilan kultur antera. Tidak terlalu banyak jenis tanaman yang mempunyai kemampuan untuk memproduksi tanaman haploid melalui kultur antera, bahkan dalam spesies yang sama pun kemampuannya dapat berbeda. Bahkan untuk spesies tanaman yang model seperti tembakau, beberapa genotipe menghasilkan tanaman haploid dengan laju yang lebih tinggi dibandingkan genotipe yang lain. Dikarenakan pengaruh genotipe tersebut maka penting untuk diperhatikan diversitas genetik tanaman apabila mengembangkan protokol untuk memproduksi tanaman haploid melalui kultur antera.

b. Komposisi Media Kultur

Androgenesis dapat diinduksi pada media sederhana seperti media N6 untuk polen tanaman tembakau dan beberapa spesies lainnya. Akan tetapi untuk sebagian besar spesies, media yang umum digunakan adalah MS (Murashige-Skoog) dan N6 atau variasi kedua media tersebut. Dalam beberapa hal media perlu diperkaya dengan senyawa organik kompleks seperti ekstrak kentang, air kelapa, dan casein hidrolisat. Pada sebagian besar spesies, sukrosa yang digunakan dalam media antara 2-3% sementara untuk beberapa spesies lain, khususnya tanaman sereal responnya lebih baik apabila konsentrasi gulanya lebih tinggi (hingga 15%). Pada beberapa spesies lain, penggunaan sumber karbohidrat seperti ribosa, maltosa, dan glukosa mempunyai pengaruh yang lebih baik dibanding dengan sukrosa.

Penggunaan zat pengatur tumbuh (ZPT) pada media kultur antera untuk beberapa spesies seperti tembakau tidak diperlukan. Akan tetapi, untuk sebagian besar spesies diperlukan auksin dalam media dengan konsentrasi rendah. Sitokinin yang dikombinasikan dengan auksin kadang-kadang diperlukan terutama untuk spesies yang memerlukan fase kalus sebelum dihasilkan tanaman haploid. Kultur antera umumnya memerlukan bahan pematat berupa agar. Akan tetapi, agar mengandung senyawa yang dapat menghambat proses androgenesis, maka diperlukan bahan pematat alternatif. Agarose dilaporkan merupakan bahan pematat yang paling baik untuk kultur antera spesies sereal. Alternatif lain adalah dengan menggunakan media cair dengan cara menaruh antera di atas permukaan media yang disebut kultur mengapung atau "float culture". Prosedur ini menggunakan antera yang dikulturkan pada media dua lapis, yaitu media cair di atas media padat. Selanjutnya dalam masa inkubasi, antera akan membuka secara normal dan mikrospora tersebar ke media. Mikrospora ini kemudian akan berkembang menjadi embrio. Selanjutnya, setelah dikecambahkan dan dipindahtanankan berkembang menjadi tanaman utuh.

c. Kondisi Tanaman Donor

Umur dan kondisi fisiologis tanaman donor sering mempengaruhi keberhasilan kultur antera. Pada sebagian besar spesies, respon yang paling baik berasal dari bunga (atau kelompok bunga) pertama yang dihasilkan oleh tanaman. Sebagaimana umumnya antera yang dikulturkan harus berasal dari bunga yang masih kuncup. Berbagai faktor lingkungan yang mempengaruhi pertumbuhan tanaman donor juga mempengaruhi tanaman haploid yang dihasilkan. Pada beberapa spesies, intensitas cahaya, lama penyinaran, dan suhu diketahui mempengaruhi jumlah tanaman haploid yang dihasilkan. Kondisi pertumbuhan optimum yang spesifik berbeda antara tanaman yang satu dengan yang lainnya. Secara umum hasil terbaik akan diperoleh dari tanaman yang pertumbuhannya sehat dan vigor.

d. Densitas Polen atau Antera

Densitas polen dan antera juga sangat berpengaruh terhadap keberhasilan kultur haploid secara androgenesis. Misalnya pada *Brassica napus* membutuhkan densitas minimum 3000 pollen/mL media kultur. Kultur dengan densitas yang tinggi, akan meningkatkan persentase keberhasilan perkecambahan secara *in vitro*. Akan tetapi, kultur dengan densitas yang terlalu tinggi akan menghambat pertumbuhan. Hal tersebut dikarenakan adanya persaingan unsur hara dalam medium dan timbulnya senyawa etilen dalam botol kultur.

e. Tahap Perkembangan Polen

Faktor yang sangat kritis yang mempengaruhi produksi tanaman haploid dari kultur antera adalah tahap perkembangan mikrospora. Pada sebagian besar jenis tanaman, antera hanya responsif selama fase uninukleat dari perkembangan polen. Sebaliknya, pada tanaman tembakau respon optimum ditemukan pada beberapa saat sebelum, selama, dan sesudah fase mitosis pertama dari polen (akhir fase uninukleat hingga awal binukleat dari mikrospora). Antera mengandung serbuk sari (polen), sehingga kultur antera berarti mengikut sertakan polen didalamnya. Polen yang masih muda (*immature*) atau mikrospora yang terkandung dalam antera dapat secara langsung beregenerasi membentuk embrio, disebut androgenesis atau membentuk jaringan kalus yang selanjutnya dapat diinduksi untuk meregenerasi menjadi tanaman di bawah pengaruh ZPT yang terkandung dalam media tanam. Polen bersifat haploid, dan tentunya sel-sel yang diproduksi oleh polen selama proses kultur juga bersifat haploid. Metoda lain untuk memproduksi tanaman haploid adalah dengan kultur ovul atau ovari (prosesnya disebut gynogenesis) atau melalui metoda eliminasi kromosom yang disebut metoda *Hordeum bulbosum*¹.

f. Pra-perlakuan

Pada beberapa spesies tanaman, produktivitas kultur anteranya dipengaruhi oleh perlakuan pemberian suhu pada kuncup bunga sebelum proses sterilisasi dan isolasi antera.

Produktivitas tanaman haploid tembakau yang dihasilkan sering meningkat dengan perlakuan penyimpanan kuncup bunga pada suhu 7-8°C selama 12 hari⁶). Untuk jenis tanaman lain, penyimpanan dapat dilakukan pada suhu antara 4-10°C selama 3 hari sampai dengan 3 minggu. Umumnya penyimpanan pada suhu yang lebih rendah memerlukan waktu yang lebih pendek atau sebaliknya. Perlakuan suhu pra inkubasi pada tanaman tertentu, seperti sawi pakcoy, dengan cara menyimpan biakan pada suhu 35°C selama 1-3 hari sebelum diinkubasi pada suhu 25°C diketahui dapat meningkatkan keberhasilan kultur antera⁷).

Manfaat Kultur Haploid dalam Pemuliaan Tanaman

Pemanfaatan teknologi kultur haploid bagi pemulia tanaman dilakukan untuk meningkatkan efisiensi proses pemuliaan tanaman dalam menghasilkan tanaman homozigot yang selama ini dilakukan secara konvensional. Penggunaan tanaman haploid ganda pada program pemuliaan terbukti dapat mengurangi waktu yang dibutuhkan untuk pengembangan suatu kultivar. Keunggulan lain dari penerapan kultur haploid adalah untuk mendeteksi mutasi dan rekombinan yang unik, karena mutasi yang resesif tidak muncul dalam keadaan diploid⁸). Selain itu, kultur haploid juga dapat digunakan untuk penggandaan jumlah kromosom sehingga nantinya diperoleh tanaman homozigot.

Penggunaan mikrospora pada kultur haploid lebih dipilih para pemulia dibandingkan kultur antera karena memiliki beberapa kelebihan yang meliputi: (a) populasi mikrospora yang jumlahnya jauh dan lebih homogen sebagai eksplan awal, (b) tidak adanya zat penghambat pertumbuhan yang bocor dari degradasi jaringan antera, dan (c) tidak adanya kompetisi pertumbuhan, seperti pada jaringan penghubung antera⁹). Kultur mikrospora efektif dalam mengatasi masalah pembentukan albino pada kultur antera tanaman sereal¹⁰), dan menghasilkan frekuensi penggandaan kromosom secara spontan yang tinggi¹¹). Haploid ganda juga bermanfaat dalam proses seleksi, terutama untuk sifat poligenik, karena rasio keragaman genetik menjadi lebih sederhana dan

lebih sedikit tanaman yang digunakan untuk mendapatkan genotipe tertentu. Selanjutnya, tanaman haploid ganda berguna dalam penelitian yang berhubungan dengan sifat resesif, karena efek dominannya tidak menutupi keragaman fenotipik tanaman.

Kendala yang Dihadapi dalam Kultur Haploid Menggunakan Antera

Protokol yang digunakan dalam kultur antera untuk menghasilkan tanaman haploid relatif lebih mudah baik untuk spesies yang berbeda maupun kultivar yang berbeda. Akan tetapi, dalam kultur antera kerap ditemui masalah seperti kalus terkontaminasi yang berasal dari dinding antera yang tercampur bersama dengan polen yang nantinya akan menghasilkan kalus atau jaringan yang diploid atau poliploid. Selain itu, tanaman dari antera seringkali merupakan populasi heterogen serta pada beberapa spesies ditemukan perkembangan pollen yang tidak seragam. Kendala lain yang dihadapi antara lain adalah hasil yang diperoleh rendah yang disebabkan kegagalan antera untuk tumbuh dan juga embrio yang dihasilkan gagal berkembang, terjadi ketidakstabilan genetik, terbentuknya tanaman albino (khususnya pada tanaman sereal), dan tanaman haploid ganda yang dihasilkan terkadang tidak selalu homozigot. Embrio kultur mikrospora dalam media cair untuk jangka waktu yang panjang akan menyebabkan penurunan kemampuan regenerasi embrio dan terjadi *browning* setelah dipindahkan ke media padat. Oleh karena itu, perlu dilakukan modifikasi media, seleksi tahap perkembangan mikrospora serta optimasi tahap pra-perlakuan.

Solusi untuk Mengatasi Kendala Kultur Haploid

Embriogenesis mikrospora dan ovari dipengaruhi oleh banyak faktor seperti genotipe tanaman donor dan status pertumbuhannya, tahap perkembangan mikrospora, kondisi kultur, pra-perlakuan, dan media kultur. Perlakuan stres merupakan perlakuan yang paling sering digunakan untuk menginduksi embriogenesis mikrospora, salah satunya adalah penerapan kejut

panas dalam waktu singkat, pra-perlakuan dengan suhu dingin, dan perlakuan pengurangan karbon. Namun, saat ini penambahan zat kimia juga telah dilakukan untuk menginduksi embriogenesis pada kultur mikrospora. Berdasarkan beberapa penelitian menunjukkan bahwa tingkat embriogenesis mikrospora dan regenerasi tanaman dapat ditingkatkan dengan penambahan *histone deacetylase inhibitors* (HDI)¹²⁾, penambahan antioksidan dan *reduced ascorbate*, dan *reduced glutathione*¹³⁾. Penambahan perlakuan tersebut masing-masing dapat meningkatkan embriogenesis mikrospora. Namun, penambahannya hingga tingkatan tertentu juga dapat menghambat, sehingga perlu diperhatikan komposisi yang tepat tiap perlakuan tersebut untuk menunjukkan peningkatan embriogenesis mikrospora yang optimum.

Untuk mengatasi kendala penurunan regenerasi karena kultur dalam waktu lama, maka diperlukan perlakuan agitasi (penerapan kultur menggunakan *shaker*) dan penggantian medium untuk meningkatkan frekuensi embriogenesis dan kualitas embrio¹⁴⁾. Perlakuan aerasi menggunakan *shaker* dapat menghilangkan inhibitor yang terakumulasi di media kultur, sehingga dapat meningkatkan embriogenesis pada kultur mikrospora. Beberapa mikrospora utamanya yang berasal dari mikrospora yang tua seringkali mengakumulasi inhibitor atau toksik di dalam medium yang menyebabkan mikrospora tersebut tidak dapat berkembang menjadi embrio.

Penutup

Pengembangan teknologi kultur haploid untuk menghasilkan tanaman kakao unggul dapat dilakukan secara androgenesis melalui kultur antera/mikrospora dan secara gynogenesis melalui kultur ovarium/ovule. Kultur haploid yang telah diperoleh selanjutnya digandakan menggunakan kolkisin untuk mendapatkan tanaman haploid ganda yang nantinya dapat dimanfaatkan untuk menghasilkan galur murni unggul baru tanaman kakao. Penggunaan tanaman haploid ganda pada program pemuliaan telah terbukti dapat mengurangi waktu yang dibutuhkan untuk pengembangan suatu kultivar dan untuk mendeteksi adanya mutasi resesif tidak muncul dalam keadaan diploid.

Sumber Pustaka:

- ¹⁾Bajaj, Y.P.S. (1983). In vitro production of haploids. In: *Handbook of Plant Cell Culture*, Vol. 1: Techniques for Propagation and Breeding. Ed. D.A. Evans *et al.* Macmillan, New York. 228–287.
- ²⁾Guha, S. & S.C. Maheshwari (1964). In Vitro Production of Embryos from Anthers of *Datura*. *Nature*, 204, 497.
- ³⁾Lanaud, C. (1987). Doubled haploids of cocoa (*Theobroma cacao* L.) 1. Observation of Fertility. *Plant Breeding*, 99, 187-195.
- ⁴⁾Sivachandran, R.; Gnanam, R.; Sudhakar, D.; Suresh, J.; Ganesh Ram, S.; Gangai Selvi, R. (2017). Development of in vitro gynogenesis system in cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Chemical Science Review and Letters*, 6(24), 2169-2177.
- ⁵⁾Reed, S.M. 2005. M. Reed, "Haploid Cultures," in: *Plant Development and Biotechnology*, R.N. Trigiano, & D.J. Gray, Eds. 225-234.
- ⁶⁾Sunderland, N. & Roberts M. (1979). Cold pretreatment of excised flower buds in float culture of tobacco anthers. *Oxford Journals*, 43, 405 – 414.
- ⁷⁾Keller, W.A. & K.C. Armstrong (1979). Stimulation of embryogenesis and haploid production in *Brassica campestris* anther cultures by elevated temperature treatments. *Theor. Appl. Genet.*, 55, 65–67.
- ⁸⁾Gunawan, L.W. (1988). *Teknik Kultur Jaringan*. Bogor: Laboratorium Kultur Jaringan, PAU Bioteknologi, IPB.
- ⁹⁾Nitsch, C. (1977). Culture of isolated microspores, in *Applied and Fundamental Aspects of Plants, Cell, Tissue and Organ Culture*, eds Reinert J., Bajaj Y. P. S., editors. (Berlin: Springer;), 268–278.
- ¹⁰⁾Heberle, B.E. (1999). Isolated pollen culture in Tobacco. *Plant Reprod*, 2, 1-10.
- ¹¹⁾Kasha, K.J. & M, Malunzyski (2003). Production of doubled haploids in crop plants. An introduction, In: *Doubled haploid production in crop plants, A manual*. Kluwer Academic Publisher. 1-19.
- ¹²⁾Zhang, L.; Y. Zhang; Y. Gao; X. Jiang; M. Zhang; H. Wu; Z. Liu & H. Feng (2016). Effect of Histone Deacetylase Inhibitors on Microspore Embryogenesis and Plant Regeneration in Pakchoi (*Brassica rapa* ssp. *chinensis* L.). *Scientia Horticulturae*. 209, 61-66.
- ¹³⁾Zeng, A., L. Song; Y. Cui & J. Yan (2017). Reduced Ascorbate and Reduced Glutathione Improve Embryogenesis in Broccoli Microspore Culture. *South African Journal of Botany*. 109(2017): 275-280.
- ¹⁴⁾Yang, S.; X. Liu, Y. Fu; X. Zhang; Y. Li, Z. Liu & H. Feng (2013). The Effect of Culture Shaking on Microspore Embryogenesis and Embryonic Development in Pakchoi (*Brassica rapa* L. ssp. *chinensis*). *Scientia Horticulturae*, 15, 70-73.