

MK. Kultur Jaringan
(Biologi Sem 6)

Induksi Tanaman Haploid dan Tanaman Bebas Penyakit



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

FMIPA UNY

2014

TEKNIK KULTUR JARINGAN...

- Dapat menghasilkan :
 - Tanaman haploid, triploid
 - Tanaman bebas penyakit





I. TANAMAN HAPLOID

PRODUKSI TANAMAN HAPLOID

- Pada reproduksi secara seksual, jumlah kromosom akan menjadi $\frac{1}{2}$ saat pembentukan gamet (meiosis)
- Jika meiosis terjadi pada tanaman diploid, maka menghasilkan gamet dengan 1 set kromosom ($n = x$).
- Jika sel tersebut tumbuh menjadi suatu tanaman tanpa fertilisasi maka dinamakan tanaman **monoploid**

- Jika terjadi pada tanaman tetraploid, maka menghasilkan gamet dengan $2n = 2x$
- Jika sel tersebut tumbuh menjadi suatu tanaman tanpa fertilisasi, dinamakan **dihaploid**

Manfaat tanaman haploid

1. Homosigositas dicapai dalam waktu yang lebih singkat. Menguntungkan bagi plant breeder karena mempersingkat waktu untuk mendapat varietas baru

- Pola segregasi gen lebih mudah diamati
- Menghasilkan homosigot untuk tanaman yg self-inkompatibel
- Memperpendek generasi selfing untuk mencapai homosigot

2. Memperpendek pencapaian tingkat homosigot pada tanaman dengan fase juvenil yang panjang
3. Menghasilkan hibrid F1 yang murni / homogen
4. Untuk studi tanaman poliploid pada level ploidi yang lebih rendah
5. Tanaman haploid akan menguntungkan bagi mutation breeder yang ingin menghasilkan recessive mutation (A menjadi a)

6. Menghasilkan tanaman jantan. Misal pada *Asparagus officinalis*, tanaman betina XX, tanaman jantan XY. Jika haploid dihasilkan dari anther tanaman jantan dengan gen Y kemudian digandakan maka menghasilkan YY (*super male plants*).
7. Aplikasi kolkisin secara *in vitro* lebih mudah dan menghasilkan direct homosigot
8. Haploid protoplast lebih mudah digunakan untuk somatic hybridization daripada diploid protoplasts

Produksi haploid in vivo

- Secara umum sangat sedikit jumlahnya
- Biasanya pada tanaman dengan biji yang mengandung 2 embrio
- Karena pembentukan embrio bisa dengan kromosom $n-n$ atau $2n-n$

Induksi haploid in vivo

1. Gynogenesis
2. Androgenesis
3. Genome elimination
4. Semigamy
5. Chemical treatment
6. Temperature shock
7. Irradiation

1. Gynogenesis

- Perkembangan sel telur yang tidak dibuahi karena polinasi tidak terjadi akibat :
 - Polen abortive (akibat radiasi)
 - Alien pollen (dari spesies atau genus lain)
- Endosperm harus terbentuk supaya embrio tidak aborsi

2. Androgenesis

- Nukleus sel telur tereliminasi atau inactivated sebelum pembuahan
- Sehingga individu haploid muncul karena sel telur hanya akan mengandung nukleus jantan dari hasil pembuahan

3. Genome elimination

- Biasanya terjadi karena persilangan interspecific atau intergeneric
- Pembuahan terjadi tapi salah satu genome dieliminasi/dihilangkan
- Sehingga menghasilkan embrio hanya dengan 1 set genom – menjadi haploid

4. Semigamy

- Nukleus sel telur dan nukleus polen melakukan pembelahan secara independen
- Menghasilkan haploid chimera



5. Chemical treatment

- Dengan toluene blue, maleic hydrazide, nitrous oxide, atau colchicine
- Chloramphenicol dan para-fluor-phenylalanine, kromosom dapat dihilangkan

6. Temperature shocks

- Suhu yang tinggi atau rendah
-

7. Irradiation

- X – rays
- UV light

Eksplan

- Anther
- Pollen grains
- Inflorescences
- Embryo culture
- Pseudo fertilization (pollination in vitro with alien pollen)
- Unfertilized ovules

Advantage of pollen grain culture

- 1) Tanpa adanya jaringan diploid (septum, anther wall, tapetum), maka mengurangi munculnya individu diploid
- 2) Tanpa anther tidak ada yang menghalangi dalam penyerapan nutrisi
- 3) Tanpa anther tidak ada senyawa penghambat seperti ABA dan senyawa toksik

- 4) Tanpa pembentukan kalus di anther, tidak akan terbentuk chimer
- 5) Dari satu polen bisa terbentuk embrio
- 6) Pollen grains lebih cocok untuk mutation research dan genetic manipulation
- 7) Pembentukan embrio dapat dilihat lebih jelas dengan pollen grain daripada anther

Pertumbuhan pollen memerlukan teknik khusus

- Pertumbuhan awal anther
- Ekstraksi pollen
- Perawatan

2 metode induksi tanaman haploid dari anther

- Direct : embrio muncul secara langsung dari pollen grain (microspores)
- Indirectly : kalus berkembang dari pollen grain kemudian tumbuh embrio dan tunas adventif

Pemilihan anther

- Tergantung fase perkembangannya
- Menurut Heberle-Bors (1985), waktu untuk isolasi anther (dan pollen) tergantung pada fase perkembangan yang dipengaruhi oleh banyak faktor
- 3 fase : P-grain (embryonic pollen grains) maturation, normal pollen grain maturation, and anther wall maturation

- Ciri morfologis tanaman / bunga untuk pengambilan anther tergantung pada spesies yang akan diteliti
- Dunwell (1985) mengatakan bahwa isolasi anther akan efektif saat mengandung microspores pada fase antara pelepasan dari tetrad dan mitosis pollen yang pertama

Kultur anther : haploid, chimera, ploidy

- Terjadi abnormalitas saat pembentukan gamet/meiosis
- Regenerasi septum dan dinding anther sehingga muncul individu $2n$
- Terjadi spontaneous doubling

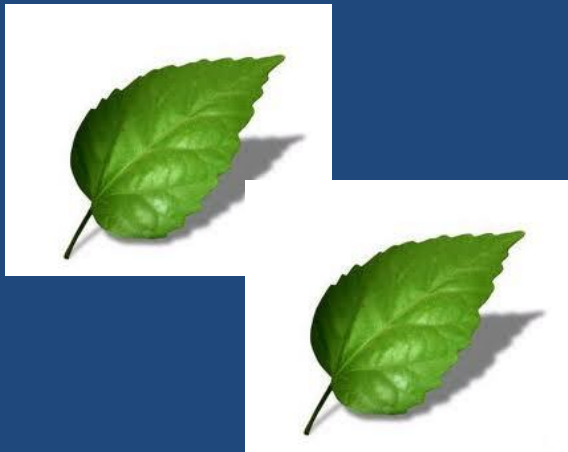
Faktor-faktor yang berpengaruh

- Pre-treatment : suhu, cutting of anther wall
- Genotype and age of donor plant
- Komposisi nutrisi pada media
- Physical factors (cahaya, suhu, CO₂)

Kesulitan dalam induksi haploid secara in vitro

1. Kadang tidak terjadi pertumbuhan dan perkembangan embrio
2. Kadang muncul diploid dan tetraploid
3. Munculnya diploid dapat dikurangi dengan kultur polen tapi teknik sulit dilakukan
4. Pengambilan fase perkembangan anther harus pada fase mikrospora haploid
5. Adanya peluang muncul albino

6. Secara ekonomis tidak menguntungkan karena teknik sulit dan keberhasilan rendah
7. Jika haploid tercampur dengan diploid atau poliploid maka haploid akan kalah bersaing
8. Pembentukan kalus yang tidak diinginkan
9. Seleksi haploid kadang lama. Tapi sekarang ada marker DNA
10. Penggandaan haploid kadang memunculkan homosigot yang tidak diinginkan



II. PRODUCTION OF DISEASE-FREE PLANTS

History

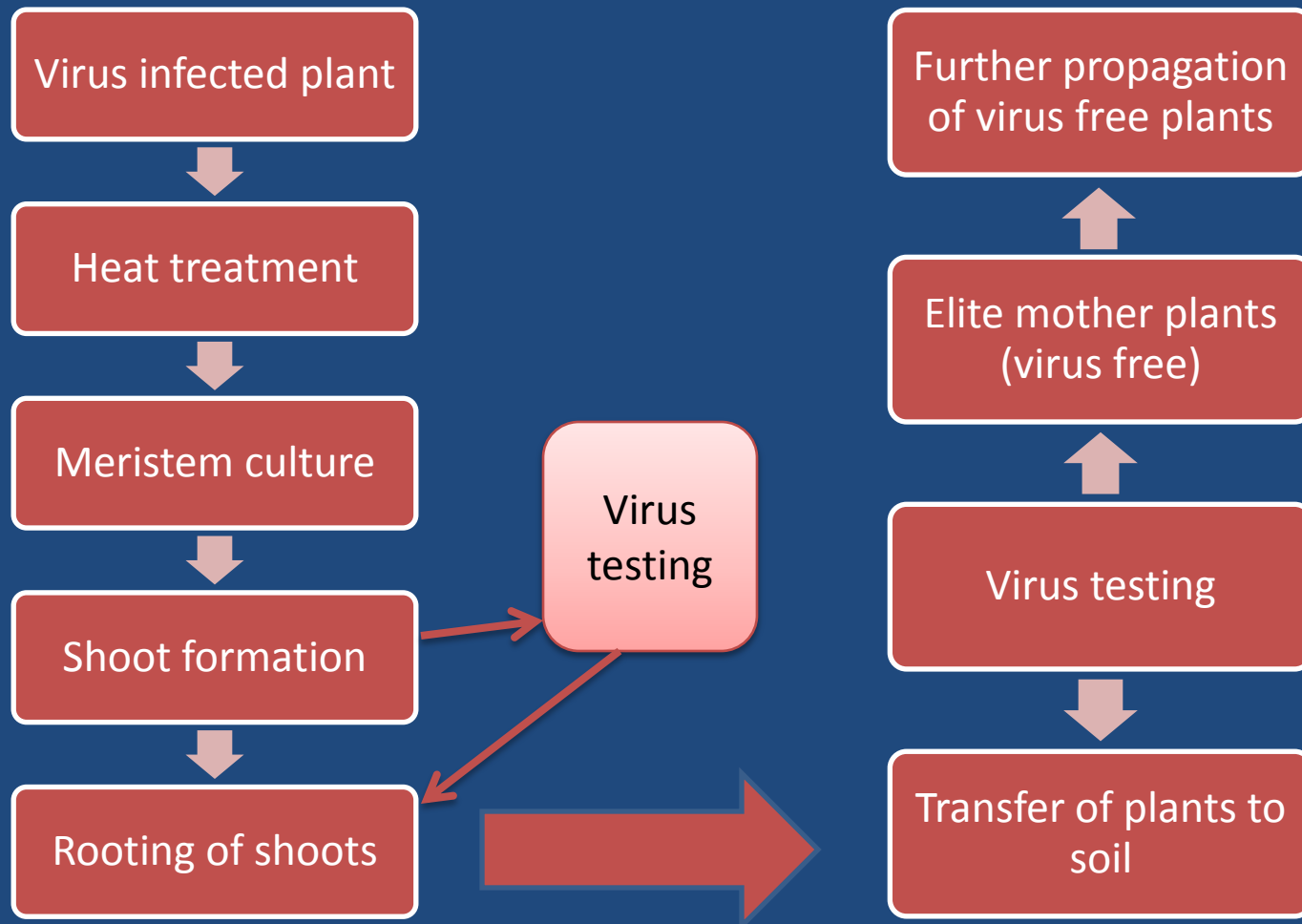
- 1934 : White menunjukkan bahwa tobacco mosaic virus (TMV) tersebar secara tidak merata di akar tembakau
- 1949 : Limasset dan Cornuet menunjukkan distribusi yang tidak merata di tunas tembakau.
- Tapi kemudian dibuktikan bahwa ujung akar atau tunas masih mengandung virus

- 1952 : Morel dan Martin mengisolasi secara in vitro meristem apikal dahlia yang terinfeksi dengan virus untuk menghasilkan tanaman bebas virus
- Muncul beberapa penelitian dan teori untuk menjelaskan adanya perbedaan antara meristem dan bagian lain yang menyebabkan serangan virus yang tidak merata pada tanaman

Why virus is unevenly distributed in plants

- Sel meristem lebih aktif membelah, memerlukan lebih banyak protein sintesis
- Di meristem tidak ada vascular elements dan plasmodesmata
- Kemungkinan pengaruh hormon auksin dan sitokinin
- Adanya inhibitor

Production of virus free plants



Metode yang digunakan

1. Heat treatment and meristem culture
2. Adventitious shoot formation followed by meristem culture
3. Virus free plants produced from callus and protoplasts
4. Micrografting

1. Heat treatment and meristem culture

- Perlakuan suhu selama beberapa hari untuk mengurangi jumlah virus sebelum dilakukan kultur meristem

2. Adventitious shoot formation

- Induksi pembentukan tunas dari bagian tanaman yang tidak terinfeksi
- Dari tunas tersebut kultur meristem dilakukan untuk produksi tanaman bebas virus

3. Induction from callus and protoplast

- Kalus yang disub kultur beberapa kali akan menjadi bebas virus (Cooper, 1962)
- Kalus diberi perlakuan suhu
- Isolasi protoplast dari bagian daun / tanaman yang tidak terinfeksi
- Tidak dianjurkan karena kemungkinan besar terjadi mutasi

4. Micrografting

- Biasanya untuk tanaman berkayu
- Jika sulit dilakukan kultur meristem atau induksi tunas maka meristem langsung disambung pada batang bawah (rootstock) yang sehat / tidak terinfeksi virus

Virus identification

- **Test plants** : cairan dari tanaman yang diuji dioleskan pada tanaman uji (test plants). Memerlukan waktu yang lama dan jumlah tanaman yang banyak
- **Mikroskop elektron** : mahal karena perlu alat spesifik dan personnel yang sudah terlatih
- **Serology** : uji dengan melihat antibodi yang terbentuk. Pada tanaman biasanya dengan uji ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Produksi tanaman bebas bakteri dan fungi

- Juga menggunakan kultur meristem
- Media dengan nutrisi tinggi digunakan untuk melihat tanaman terinfeksi atau tidak
- Metode sama dengan produksi tanaman bebas virus

Next week

Kultur dan fusi protoplast : manfaat dan contoh aplikasi pada tanaman