

Perbaikan Galur Mandul Jantan melalui Kultur Anter

Ida H. Somantri, Iswari S. Dewi, A. Dinar Ambarwati, Aniversari Apriana, Suwarno, dan Minantyorini

Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian

ABSTRAK

Galur yang potensial untuk dibuat mandul jantan mempunyai gen yang mengendalikan sterilitas jantan tetapi sitoplasmanya normal sehingga tanaman menjadi fertil. Galur seperti itu disebut sebagai galur pelestari (*maintainer line*). Kultur anter merupakan suatu teknik *in vitro* yang dapat menghasilkan tanaman haploid ganda homozigot (galur murni) langsung dari tanaman F1 atau generasi bersegregasi lainnya yang telah diseleksi, sehingga dapat mempercepat siklus pemuliaan. Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan (1) benih dari hasil persilangan galur pelestari dengan varietas unggul yang mempunyai sifat yang diinginkan, yaitu berdaya hasil tinggi, tahan cekaman lingkungan (biotik dan abiotik), serta mutu beras baik dan (2) galur pelestari yang mempunyai sifat yang diinginkan melalui kultur anter. Sampai saat ini, telah diperoleh benih dari 8 persilangan galur pelestari dengan varietas unggul, yaitu IR62829B x Sintanur (218 butir), IR58025B x Sintanur (66 butir), IR62829B x Ciherang (643 butir), IR58025B x Ciherang (165 butir), IR62829B x IR64 (528 butir), IR58025B x IR64 (64 butir), IR62829B x Memberamo (360 butir), dan IR58025B x Memberamo (74 butir). Selanjutnya kultur anter dilakukan pada 2 persilangan, yaitu IR58025B x Sintanur dan IR62829B x Ciherang. Inokulasi anter dilakukan pada media induksi kalus N6 + 2,0 mg/l NAA + 0,5 mg/l kinetin + 10^{-3} M putresin dan N6 + 2,0 mg/l 2,4-D. Penelitian untuk mendapatkan regenerasi tanaman hijau masih terus dilakukan.

Kata kunci: Padi hibrida, mandul jantan, kultur anter

ABSTRACT

Potential lines for producing male sterile had gene that control male sterility but their cytoplasm were normal to make them fertile. Those lines were called maintainer lines. Anther culture technique was conducted *in vitro* to regenerate doubled haploid plants directly from F1 plants or other selected segregate plant materials. Therefore, this technique can be used to accelerate breeding cycle. The purpose of this research was (1) to obtain seeds from crossing of maintainer lines with released varieties having interest good traits, such as high yield, tolerance to biotic stresses and good eating quality and (2) to obtain maintainer lines having the interest traits through anther culture. At present, we already obtained seeds from 8 crosses. They were IR62829B x Sintanur (218 seeds), IR58025B x Sintanur (66 seeds), IR62829B x Ciherang (643 seeds), IR58025B x Ciherang (165 seeds), IR62829B x IR64 (528 seeds), IR58025B x IR64 (64 seeds), IR62829B x Memberamo (360 seeds), and IR58025B x Memberamo (74 seeds). Anther culture was conducted on 2 crosses, i.e. IR58025B x Sintanur and IR62829B x Ciherang. Anther inoculation was conducted on callus induction media N6 + 2.0 mg/l NAA + 0.5 mg/l kinetin + 10^{-3} M putresin and N6 + 2.0 mg/l 2,4-D. The research to obtain green plantlets was still on going.

Key words: Hybrid rice, male sterile, anther culture

PENDAHULUAN

Indonesia, yang mempunyai lahan sawah irigasi sekitar 5 juta hektar, sangat potensial untuk penerapan teknologi padi hibrida. Potensi hasil padi hibrida yang lebih besar dibandingkan padi nonhibrida (>15-20%) akan membantu di dalam memecahkan permasalahan dalam peningkatan produksi padi (Suprihatno *et al.*, 1994). Saat ini, melalui kerja sama internasional telah diperoleh beberapa galur mandul jantan, yaitu IR58025A, IR62829A, IR68885A, dan IR68889A, serta 3 hibrida harapan, yaitu IR56025A/BR827-35, IR58025A/IR53942, dan IR62829A/BR827-35. Kelemahan dari ketiga hibrida harapan tersebut adalah daya hasil kurang stabil, yaitu tidak selalu memberikan hasil yang lebih tinggi dibandingkan dengan varietas pembanding, selain itu juga peka terhadap penyakit hawar daun bakteri yang merupakan salah satu penyakit utama padi di Indonesia (Suprihatno *et al.*, 1998).

Untuk mendapatkan varietas padi hibrida yang baik, yaitu sesuai dengan kondisi agroekologi Indonesia dan mempunyai sifat yang diinginkan, seperti ber-daya hasil tinggi dan stabil serta tahan terhadap hama dan penyakit utama, perlu dilakukan perbaikan terhadap galur tetuanya. Beberapa varietas unggul dan galur harapan padi, yang merupakan plasma nutfah sumber ketahanan terhadap hama dan penyakit utama, misalnya tahan terhadap wereng coklat dan bakteri hawar daun selain mempunyai daya hasil tinggi dengan mutu beras baik, antara lain Memberamo, Sintanur, Ciherang, dan IR62. Varietas unggul tersebut dapat di-gunakan dalam merakit varietas hibrida yang berdaya hasil tinggi dan tahan hama penyakit utama.

Galur yang potensial untuk dibuat mandul jantan mempunyai gen yang mengendalikan sterilitas jantan tetapi sitoplasmanya normal sehingga tanaman menjadi fertil. Galur seperti itu disebut sebagai galur pelestari (*maintainer line*). Persilangan galur pelestari dengan galur/varietas unggul yang mempunyai sifat yang diinginkan merupakan tahap pertama yang harus dilakukan untuk memperoleh galur pelestari yang mempunyai sifat yang diinginkan tersebut. Selanjutnya galur pelestari terpilih disilangkan dengan galur mandul jantan yang sudah tersedia (misalnya IR58025A, IR62829A, IR68885A, dan IR68889A) untuk mendapatkan galur mandul jantan baru dengan kemandulan stabil, yang potensial untuk pembuatan padi hibrida.

Kultur anter dapat mempercepat perolehan tanaman homozigot dari materi tanaman heterozigot tanpa dipersulit oleh hubungan dominan-resesif, sehingga siklus pemuliaan dapat lebih singkat karena dapat menghilangkan sebagian besar dari kegiatan seleksi pada setiap generasi yang umum dilakukan pada pemuliaan konvensional (Fehr, 1987; Dewi *et al.*, 1996).

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di rumah kaca dan laboratorium kultur jaringan Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor mulai Januari 2002. Bahan tanam-an yang digunakan adalah galur pelestari dan varietas unggul sebagai donor untuk ketahanan terhadap bakteri hawar daun, wereng coklat, dan mutu beras baik (rasa nasi pulen). Galur pelestari yang digunakan adalah IR62629B (T1), IR58025B (T2), sedangkan varietas unggul yang digunakan sebagai donor adalah Memberamo (D1), Sintanur (D2), Ciherang (D3), dan IR64 (D4).

Pelaksanaan Penelitian

- a. Persilangan dibuat antara galur pelestari dengan varietas unggul yang dipilih (yang mempunyai sifat yang diinginkan) untuk menghasilkan F1. Biji F1 disemai dan ditanam dalam ember plastik di rumah kaca untuk mendapatkan anter.
- b. Kultur anter dilakukan dengan menggunakan 2 macam media induksi kalus dan 2 macam media regenerasi, yaitu
 1. Media induksi N6 (Chu, 1978) yang diberi tambahan zat pengatur tumbuh auksin (2,0 mg/l NAA), sitokinin (0,5 mg/l kinetin), poliamin (10^{-3} M putresin), dan 60,0 g/l sukrosa dengan media regenerasi MS (Murashige dan Skoog, 1962) yang diberi tambahan zat pengatur tumbuh auksin (0,5 mg/l NAA), sitokinin (2,0 mg/l kinetin), poliamin (10^{-3} M putresin), dan 40,0 g/l sukrosa (Dewi *et al.*, 2001).
 2. Media induksi N6 yang diberi tambahan zat pengatur tumbuh auksin (2,0 mg/l 2,4-D) dan 50,0 g/l sukrosa dengan media regenerasi MS yang diberi tambahan zat pengatur tumbuh auksin (1,0 mg/l NAA), sitokinin (2,0 mg/l kinetin), dan 30,0 g/l sukrosa (Yan *et al.*, 1996).
- c. Tanaman haploid ganda hasil kultur anter kemudian diseleksi secara individu berdasarkan sifat agronominya dan setiap tanaman yang terpilih dipanen menjadi satu galur. Tahun selanjutnya diteruskan dengan cara (d) dan seterusnya.
- d. Selanjutnya dilakukan seleksi terhadap galur tersebut (c) berdasarkan sifat-sifat agronomi dan ketahanannya terhadap hama dan penyakit, terutama wereng coklat dan bakteri hawar daun, selain mutu beras.
- e. Uji persilangan untuk memilih galur yang potensial untuk dibuat mandul jantan dilakukan terhadap galur tersebut (d). Semua galur terpilih disilangkan dengan mandul jantan IR58025A atau IR62829A. Tanaman F1 yang diperoleh kemudian ditanam dan diamati sterilitas polennya dengan menggunakan mikroskop. Persilangan yang menghasilkan tanaman F1 dengan polen steril sempurna (100%) menunjukkan bahwa galur tua jantannya merupakan galur *maintainer* baru yang potensial untuk dibuat menjadi galur mandul jantan.

- f. Pembuatan galur mandul jantan selanjutnya dilakukan melalui silang balik dengan galur yang terpilih (e) sebagai tetua berulang (*recurrent parent*) dan galur mandul jantan sebagai tetua donor (*donor parent*).
- g. Setelah silang balik ketujuh akan diperoleh galur mandul jantan baru dengan sifat seperti galur yang terpilih, sedangkan galur yang terpilih (e) akan menjadi galur pelestari.

Pengamatan

Pada setiap tahap persilangan dilakukan pengamatan terhadap sterilitas polen. Hanya persilangan yang menghasilkan keturunan yang mempunyai polen steril sempurna saja yang dilanjutkan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Persilangan Galur Pelestari dengan Varietas Unggul

Persilangan galur pelestari dengan varietas unggul dapat menghasilkan benih, walaupun keberhasilannya tidak sama (Tabel 1). Dari 8 persilangan, hasil benih terendah, yaitu kurang dari 100 butir dicapai oleh persilangan IR58025B x Sintanur (48 butir), IR58025B x IR64 (64 butir), IR58025B x Memberamo (74 butir). Kelima persilangan lainnya menghasilkan benih antara 165-643 butir, dengan jumlah benih terbanyak dicapai oleh IR62829B x Ciherang (643 butir). Menurut Watanabe (1997), derajat fertilitas hibrida yang berlainan ditentukan oleh kesesuaian genetik antar kedua tetuanya. Selanjutnya dipilih 2 persilangan untuk ditanam dan anternya digunakan sebagai eksplan dalam penelitian kultur anter, yaitu persilangan IR58025B x Sintanur dan IR62829B x Ciherang.

Kultur Anter F1 Hasil Silangan Galur Pelestari dengan Varietas Unggul

Pada penelitian kultur anter terdapat 5 tahap yang dilakukan, yaitu

Tabel 1. Hasil benih pada persilangan galur pelestari dengan varietas unggul

Persilangan	Kode silangan	Jumlah benih (butir)
IR58025B x Memberamo	-	74
IR58025B x Sintanur	M1	48
IR58025B x Ciherang	-	165
IR58025B x IR64	-	64
IR62829B x Memberamo	-	613
IR62829B x Sintanur	-	218
IR62829B x Ciherang	M2	643
IR62829B x IR64	-	528

- = belum diberi kode silangan karena belum digunakan untuk kultur anter

Tabel 2. Tanaman donor yang diperoleh dari persilangan galur pelestari dengan varietas unggul

Kode persilangan	Persilangan	Jumlah benih (butir)	Viabilitas benih (%)	Tanaman selamat
M1	IR58025B x Sintanur	45	100	42 (93,3%)
M2	IR62829B x Ciherang	60	100	18 (30,0%)

1. Penanaman tanaman penghasil anter (tanaman donor)
2. Pengkoleksian dan inkubasi malai berisi anter yang akan digunakan sebagai eksplan dalam kultur anter
3. Seleksi dan inokulasi anter pada media induksi kalus
4. Pemindahan/subkultur kalus ke media regenerasi
5. Aklimatisasi (planlet) tanaman hijau

Benih tanaman donor, yaitu persilangan IR58025B x Sintanur dan IR62829B x Ciherang ternyata berbeda dalam keberhasilannya menghasilkan tanaman yang dapat terus tumbuh, walaupun viabilitas benihnya 100% (Tabel 2).

Benih yang berasal dari persilangan IR62829B x Ciherang, menghasilkan tanaman donor lebih sedikit (30%) dibandingkan dengan IR58025B x Sintanur (93,3%). Diduga terjadinya perbedaan tanaman selamat disebabkan oleh perbedaan kepekaan kedua genotipe dalam beradaptasi dengan lingkungan, karena viabilitas benih kedua tetua pada saat disemaikan di cawan petri berisi air sama, yaitu 100%. Tanaman F1 hasil silangan IR62829B x Ciherang tidak dapat segera beradaptasi pada tanah dengan dosis pemupukan anjuran untuk tanaman padi (100 kg N, 100 kg P₂O₅, dan 100 kg KCl/ha). Tanaman donor yang dihasilkan selanjutnya di-tanam di rumah kaca.

Tanaman donor harus ditanam dalam lingkungan yang optimum untuk pertumbuhan. Menurut Zhang (1992) penanaman di rumah kaca dimaksudkan agar tanaman dapat menghindarkan cekaman selama perkembangan tepung sari (polen), walaupun dari segi penampakan mungkin tampak kurang vigor.

Tahap perkembangan polen pada saat pengkoleksian malai serta saat dikulturkan merupakan saat paling kritis di dalam menentukan keberhasilan kultur anter. Tahap perkembangan polen yang optimum untuk kultur anter adalah pada tahap pertengahan sampai akhir uninukleat atau awal binukleat (Chung, 1992; Zhang, 1992; Li, 1992; Sun dan Zhao, 1992; Zapata *et al.*, 1983). Kemampuan untuk meregenerasikan tanaman berkurang pada kultur anter yang mengandung polen pada tahap yang lebih lanjut akibat akumulasi pati yang menghambat pembelahan sel (Zapata *et al.*, 1983). Pada penelitian ini malai dikoleksi ketika jarak antara daun bendera (*flag leaf*) dengan daun terakhir (*penultimate leaf*) berkisar antara 14-16 cm atau ketika digenggam terasa bunting penuh tidak ada bagian selubung malai yang kosong.

Praperlakuan pada malai dilakukan sebelum anter dikulturkan. Metode yang biasa dilakukan di antaranya adalah inkubasi malai dengan cekaman

dingin pada padi (Zapata *et al.*, 1983), cekaman panas pada oat (Kiviharju dan Pehu, 1998), cekaman osmotik dengan manitol pada barley (Cistue *et al.*, 1999).

Pada penelitian ini malai yang masih berada dalam selubungnya dicuci bersih kemudian dibungkus dengan aluminium yang dilapisi kertas tisu penyerap kelebihan air. Selanjutnya malai disimpan selama 8-10 hari dalam ruang bersuhu 5°C seperti yang dilakukan oleh Dewi *et al.* (1994). Perlakuan dingin dapat membantu menyeragamkan stadia polen, sehingga lebih banyak polen pada stadia uninukleat yang dapat digunakan sebagai eksplan (Nitsch, 1983; Zapata *et al.*, 1983).

Seleksi pada anter dilakukan untuk mendapatkan anter yang berada pada tahap pertengahan uninukleat sampai awal binukleat. Menurut Sun dan Zhao (1992) malai dengan spikelet yang panjang anter dan filamennya tidak melebihi 1/2 panjang bulir (*spikelet*) pada japonica atau $\leq 2/3$ panjang spikelet pada indica dan javanica, dapat dipilih untuk mendapatkan anter pada tahap mikrspora yang diinginkan, yaitu yang berwarna kuning cerah kehijauan. Pada penelitian ini karena digunakan padi indica sebagai tetua persilangan, maka seleksi dilakukan pada spikelet yang panjang anter dan filamennya berada pada 1/2-2/3 panjang spikelet. Malai yang telah terpilih setelah disterilisasi dengan 20% Bayclin (*Commercial Bleach* yang mengandung 5,24% NaOCl) kemudian spikeletnya dipotong pada 1/3 bagian dari pangkalnya dan dikumpulkan pada cawan petri.

Pada tahap inokulasi anter, masing-masing spikelet dijepit dengan pinset dan diletakkan pada tepi cawan petri yang sudah berisi 25 ml media induksi kalus, sampai anter keluar dan jatuh ke atas media. Inokulasi/penanaman eksplan ini dilakukan di dalam lemari steril laminar air flow.

Cawan petri yang telah berisi anter kemudian diinkubasi di ruang gelap ber-suhu 25±2°C. Inkubasi di ruangan dengan kondisi tersebut penting untuk meng-induksi keluarnya kalus yang berasal dari polen yang berada di dalam anter (Li, 1992; Zhang, 1992). Dalam 3-4 minggu setelah inokulasi kalus akan mulai ter-bentuk.

KESIMPULAN

1. Telah diperoleh benih dari 8 persilangan galur pelestari dengan varietas unggul, yaitu IR62829B x Sintanur (218 butir), IR58025B x Sintanur (66 butir), IR62829B x Ciherang (643 butir), IR58025B x Ciherang (165 butir), IR62829B x IR64 (528 butir), IR58025B x IR64 (64 butir), IR62829B x Memberamo (360 butir), dan IR58025B x Memberamo (74 butir).
2. Selanjutnya kultur anter dilakukan pada 2 persilangan, yaitu IR58025B x Sintanur dan IR62829B x Ciherang. Inokulasi anter dilakukan pada media

induksi kalus N6 + 2,0 mg/l NAA + 0,5 mg/l kinetin + 10^{-3} M putresin. Kalus mulai terbentuk, namun hasil regenerasi tanaman belum dapat dilaporkan.

DAFTAR PUSTAKA

- Chu, C.C. 1978.** The N6 media and its application to anther culture of cereal crops. Proc. Symp. Plant Tissue Culture. Peking, May 25-30. Science Press. Peking. p. 43-50.
- Chung, G.S. 1992.** Anther culture for rice improvement in Korea. *In* Zheng, K. and T. Murashige (*Eds.*). Anther Culture for Rice Breeders. Seminar and Training for Rice Anther Culture at Hangzhou, China. October 1992. p. 8-37.
- Cistue, L., A. Ramos, and A.M. Castillo. 1999.** Influence of anther pretreatment and culture medium composition on the production of barley doubled haploids from model and low responding cultivars. Plant Cell, Tissue, and Organ Culture 55:159-166.
- Dewi, I.S., A.D. Ambarwati, M.F. Masyhudi, T. Soewito, dan Suwarno. 1994.** Induksi kalus dan regenerasi kultur antera padi (*Oryza sativa* L.). Risalah Hasil Penelitian Tanaman Pangan 2:136-143.
- Dewi, I.S., I. Hanarida, and S. Rianawati. 1996.** Anther culture and its application for rice improvement program in Indonesia. Indon. Agric. Res. and Dev. J. 18 (3):51-56.
- Dewi, I.S., B.S. Purwoko, H. Aswidinnoor, dan I. Hanarida. 2001.** Peningkatan regenerasi tanaman hijau pada kultur antera padi Taipei-309 dan persilangan Taipei-309 x Asemandi dengan poliamin. Prosiding Kongres IV dan Simposium Nasional Perhimpunan Ilmu Pemuliaan Indonesia, 23-24 Oktober 2001. PERIPI Komda Yogyakarta dan Faperta UGM Yogyakarta.
- Fehr, W.R. 1987.** Principles of cultivar development. Vol. I. McGraw-Hill, inc, NY. 536 p.
- Kiviharju, E. and E. Pehu. 1998.** The effect of cold and heat pretreatments on anther culture response of *Avena sativa* and *A. sterilis*. Plant Cell, Tissue, and Organ Culture 54:97-104.
- Li, M.F. 1992.** Anther culture breeding of rice at the CAAS. *In* Zheng, K. and T. Murashige (*Eds.*). Anther Culture for Rice Breeders. Proceedings of Seminar and Training for Rice Anther Culture at Hangzhou, China. October 1992. p. 75-86.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiol. 15:473-493.

- Nitsch, C. 1983.** Progress in anther and pollen culture techniques. *In* Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement. Proceedings of a Workshop Cosponsored by The Institute of Genetics, Academia Sinica and The International Rice Research Institute. Science Press, Beijing, China. p. 1-10.
- Sun, Z. and C. Zhao. 1992.** Anther culture for enhancing rice breeding. The CNNRI Program. *In* Zheng, K. and T. Murashige (*Eds.*). Anther Culture for Rice Breeders. Proceedings of Seminar and Training for Rice Anther Culture at Hangzhou, China. October 1992. p. 112-131.
- Suprihatno, B., B. Sutaryo, and T.S. Silitonga. 1994.** Hybrid rice research in Indonesia. *In* Hybrid Rice Technology: New Development and Future Prospect. Selected papers from the International Rice Research Conference. International Rice Research Institute. Los Banos, Philippines. p. 195-205.
- Suprihatno, B., B. Sutaryo, Satoto, P.M. Yuniati, dan S.T.W. Utomo. 1998.** Hasil-hasil penelitian padi hibrida di Indonesia. Makalah disampaikan pada Seminar Program Produksi Benih Padi Hibrida. Jakarta, 29 Desember 1998. 20 hlm.
- Watanabe, K. 1997.** Phylogeny and geographical distribution of genus *Oryza*. *In* Matsuo, T., Y. Futsuhara, F. Kikuchi, and H. Yamaguchi (*Eds.*). Chapt. I. Genomic Constitution of Genus *Oryza* in Div. I. Origin and Differentiation of Rice. Science of The Rice Plant 3:29-39.
- Yan, J.G., Q.Z. Xue, and Y.X. Wang. 1996.** Use of androgenesis in intersubspecific hybrid rice breeding. *Plant Breeding* 115:301-304.
- Zapata, F.J., G.S. Khush, J.P. Crill, M.H. Neu, R.O. Romero, L.B. Torrizo, and M. Alejar. 1983.** Rice anther culture at IRRI. *In* Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement. Proceedings of a Workshop Cosponsored by The Institute of Genetics, Academia Sinica and The International Rice Research Institute. Science Press, Beijing, China. p. 27-46.
- Zhang, Z.H. 1992.** Anther culture for rice breeding at SAAS. *In* Zheng, K. and T. Murashige (*Eds.*). Anther Culture for Rice Breeders. Proceedings of Seminar and Training for Rice Anther Culture at Hangzhou, China. October 1992. p. 38-74.