

# Induksi Tanaman Haploid *Dianthus* sp. melalui Pseudofertilisasi Menggunakan Polen yang Diiradiasi dengan Sinar Gamma

## *Induction of Haploid Dianthus sp. through Pseudofertilization with Gamma Ray Irradiated Pollen*

S. Kartikaningrum<sup>1\*</sup>, A. Purwito<sup>2</sup>, G. A. Wattimena<sup>2</sup>, B. Marwoto<sup>1</sup>, dan D. Sukma<sup>2</sup>

Diterima 12 November 2011/Disetujui 24 November 2012

### ABSTRACT

*Haploid plants of Dianthus sp. were obtained by pseudofertilization using irradiated pollen. Gamma ray of 100 gray was used to inactivate pollen. Crossing were made using 131 female of Dianthus chinensis Dchi-11 as pod parents. After pollination 59% fruits were harvested, 41% were dropped and only 51 ovaries were cultured on the medium. Ovaries were explanted 1 – 2 weeks after pollination and cultured on solid MS medium containing 400 mg L<sup>-1</sup> glutamine + 103.77 mg L<sup>-1</sup> proline and growth regulator including 1-Naphthalene acetic acid (NAA) and 6-Benzylaminopurine (BAP). The first ploidy seedling observation was made by number of chloroplast in each side of guard cells of stomata. Four haploid plants were obtained from this screening, but based on chromosome counting and DNA analysis using flow cytometry only three haploid plants and two haploid plants revealed respectively.*

*Key words: BAP, medium, pollination, proline, stomata*

### ABSTRAK

Tanaman haploid *Dianthus* sp diperoleh melalui pseudofertilisasi menggunakan serbuk sari yang diiradiasi. Sinar gamma dari senyawa cobalt <sup>60</sup>Co pada dosis 100 Gy digunakan untuk menonaktifkan serbuk sari. Persilangan semu dilakukan menggunakan 131 bunga betina dari *Dianthus chinensis* Dchi-11 sebagai donor ovul. Setelah penyerbukan 41% buah gugur dan hanya 51 ovari dapat dikulturkan pada medium. Ovari ditanam pada umur 1 – 2 minggu setelah penyerbukan dan dikulturkan pada dua media MS yang mengandung 400 mg L<sup>-1</sup> glutamin + 103.77 mg L<sup>-1</sup> prolin dan dengan penambahan 1-Naphthaleneacetic acid (NAA) dan 6-Benzylaminopurine (BAP). Observasi ploidi awal dilakukan dengan melihat jumlah kloroplas pada sel penjaga stomata pada daun. Berdasarkan pengamatan ini empat tanaman haploid diperoleh, namun berdasarkan penghitungan jumlah kromosom hanya tiga tanaman yang haploid, dan berdasarkan analisis DNA dengan flowcytometer diperoleh dua tanaman haploid

Kata Kunci: BAP, media, penyerbukan, prolin, stomata

### PENDAHULUAN

Sejak A D Bergner menemukan tanaman haploid pada *Datura stramonium* pada tahun 1922, pemulia tanaman mulai bekerja ekstensif untuk mendapatkan tanaman haploid baik secara *in vivo* maupun *in vitro*. Penemuan embrio dan tanaman haploid yang dihasilkan melalui kultur antera *Datura* oleh Guha dan Maheswari pada tahun 1966 membawa ke kemajuan perkembangan teknologi haploid (Forster *et al.*, 2007; Wedzony *et al.*, 2009). Teknologi ini kemudian diterapkan pada beberapa spesies tanaman lain, namun frekuensi keberhasilannya masih rendah. Secara alami haploid muncul sebagai hasil dari partenogenesis. Teknik untuk menginduksi haploid diantaranya adalah: androgenesis, gynogenesis, eliminasi kromosom

melalui persilangan kerabat jauh, semigami, perlakuan kimia, cekaman suhu, dan efek iradiasi (Kielkowska dan Adamus, 2010).

Pada tanaman anyelir penelitian androgenesis dengan menggunakan antera pernah dilakukan oleh Fu *et al.* (2008), namun hasilnya tidak memuaskan. Metode tersebut dikembangkan oleh Kartikaningrum *et al.* (2011) dengan metode kultur antera sebar (*shed microspore*), juga tidak menunjukkan respon yang baik. Pendekatan metode lain untuk mendapatkan tanaman haploid perlu dicoba. Salah satu metode yang dilakukan adalah pseudofertilisasi.

Pseudofertilisasi dengan memanfaatkan serbuk sari yang diradiasi diikuti dengan penyelamatan embrio telah banyak diterapkan pada beberapa tanaman buah-buahan yaitu plum (Peixe *et al.*, 2000), kiwi (Chalak dan Legave, 1997; Musial

<sup>1</sup> Balai Penelitian Tanaman Hias, Segunung, Jl. Raya Pacet, Ciherang, Cianjur 43253, Telp. /Fax. (+62263514138),

E-mail : suskandari@yahoo.com (\*penulis korespondensi)

<sup>2</sup> Institut Pertanian Bogor, Jl. Raya Darmaga, Bogor

dan Przywara, 1998), melon (Kato *et al.*, 1993), jeruk (Bermejo *et al.*, 2011). Pada tanaman hias telah dilakukan pada *Primula* (Carraro *et al.*, 1990), bunga matahari (Todorova *et al.*, 2004), mawar (Meynet *et al.*, 1994), anyelir (*Dianthus caryophyllus*) (Sato *et al.*, 2000) dan tanaman lain pada kapas (Aslam, 2000; Savaskan, 2002). Pada tanaman buah-buahan banyak menghasilkan buah tanpa biji yang disebabkan oleh embrio yang mengalami degenerasi (Sugiyama *et al.*, 2002). Pada tanaman apel tanaman haploid berhasil diregenerasi setelah disilang dengan polen yang diiradiasi sinar gamma pada level dosis 200 – 500 Gy diikuti dengan penyelamatan embrio pada umur 2-3 bulan setelah polinasi dengan media MS (Zhang dan Lespinasse, 1991). Sementara pada tanaman mawar dosis 500 Gy merupakan dosis yang minimum untuk menginduksi partenogenesis (Meynet *et al.*, 1994). Pada tanaman melon dosis yang diperlukan adalah 300 Gy sinar Gamma. Produksi tanaman haploid pada anyelir (*Dianthus caryophyllus*) melalui pseudofertilisasi pernah dilakukan oleh Sato *et al.* (2000) menggunakan sinar X dengan dosis 100 dan 200 kRad, namun frekuensi kejadiannya masih sangat kecil. Tujuan penelitian ialah untuk mendapatkan tanaman haploid melalui pseudofertilisasi dengan serbuk sari yang diiradiasi dengan sinar gamma diikuti dengan penyelamatan embrio muda secara *in vitro*.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan Tanaman

Bahan tanaman menggunakan spesies *Dianthus caryophyllus* (cv 'Laura', cv 'Pradoravit', cv 'Rondesvous' dan cv 'Alifia') dan *Dianthus chinensis* (Dchi-11, Dchi-13 dan Dchi-15) koleksi Balai Penelitian Tanaman Hias. *Dianthus caryophyllus* ditanam di dalam rumah plastik, sedang *Dianthus chinensis* ditanam di pot ukuran 17 cm di Kebun Percobaan Tanaman Hias Cipanas, pada ketinggian tempat 1100 m dpl. Serbuk sari diambil dari tanaman *Dianthus chinensis* warna ungu (Dchi-13) dan kombinasi merah ungu (Dchi-14) yang telah berumur 4 bulan dari bahan stek pucuk.

### Koleksi Serbuk Sari, Iradiasi dan Penyerbukan

Serbuk sari diambil dari tanaman pada fase T8 (11 hari setelah inisiasi bunga) (Kartikaningrum *et al.*, 2011), dikumpulkan dalam *Petridish* dan diiradiasi menggunakan sinar gamma yang berasal dari senyawa Cobalt <sup>60</sup>Co pada alat *Gamma chamber 4000 A* (CAIRT-BATAN, Indonesia) dengan laju dosis 1 kRad/48 detik pada tanggal 6 April 2011.

Donor serbuk sari yang digunakan diambil dari dua genotipe *Dianthus chinensis* (Dchi-13 dan Dchi-14). Setiap genotipe masing-masing diambil 15 kuncup bunga yang berisi 10 antera. Dosis yang digunakan adalah dosis tunggal 100 Gy (LD<sub>100</sub>). Setelah diradiasi serbuk sari diambil sampelnya untuk diperiksa dengan menumbuhkannya pada larutan sukrosa 15% pada suhu inkubasi 25 °C, selama 24 jam. Pemeriksaan lain dengan pewarnaan aceto-orcein, kemudian diperiksa di bawah mikroskop untuk memastikan bahwa serbuk sari tidak aktif. Serbuk sari tanpa diiradiasi digunakan sebagai kontrol.

Satu hari sebelum dilakukan persilangan, bunga betina diinokulasi kemudian ditutup dengan kertas untuk menghindari penyerbukan dari serbuk sari yang tidak diinginkan. Sebanyak 131 donor betina dari genotipe *Dianthus caryophyllus* (cv "Laura", cv "Pradoravit", cv "Rondesvous" dan cv "Alifia") dan *Dianthus chinensis* (Dchi-11, Dchi-13, Dchi-15). Pseudofertilisasi hanya dilakukan pada tanaman betina yang telah reseptif, yang ditandai dengan keluarnya bulu-bulu halus pada ujung putik. Penyerbukan dilakukan dengan menempelkan serbuk sari yang telah diradiasi pada kepala putik dan ditutup kembali dengan kantong kertas. Sebagai kontrol penyerbukan pada enam putik juga dilakukan dengan serbuk sari tanpa iradiasi.

### Penyelamatan Embrio

Buah dari semua persilangan dipetik pada umur 10 hari sampai 14 hari setelah penyerbukan. Buah control persilangan dipanen pada umur 7 dan 14 hari setelah penyerbukan. Buah dibersihkan dengan akuades steril, kemudian diikuti sterilisasi alkohol 96% selama 10 detik kemudian dilewatkan di atas api sekilas. Buah yang telah steril dibelah dan embrio muda yang membengkak ditanam pada media. Media yang diuji ialah media M8 = MS + 1.9 µM NAA + 4.44 µM BAP + 60 g L<sup>-1</sup> sukrosa (Sato *et al.*, 2000), dan M10 = MS + 4.52 µM 2,4-D + 4.44 µM BAP + 20 g L<sup>-1</sup> sukrosa (Mosquera *et al.*, 1999). Dua media tersebut dimodifikasi dengan penambahan 2.7 mM L-glutamin + 0.9 mM L-prolin. Kultur embrio muda diinkubasi dalam ruang dengan suhu 25 °C dengan penyinaran 16 jam tiap hari dengan intensitas cahaya 1000 – 1700 lux. Embrio yang tumbuh menjadi tanaman kemudian disubkultur pada media MS tanpa zat pengatur tumbuh. Pengamatan dilakukan terhadap jumlah persilangan, jumlah ovarium yang dipanen, jumlah ovarium gugur, jumlah ovarium yang diselamatkan, jumlah kloroplas pada sel penjaga stomata, dan jumlah kromosom yang diambil pada meristem pucuk.

**Evaluasi Ploidi**

Evaluasi tingkat ploidi awal tanaman dilakukan dengan menghitung jumlah kloroplas dalam sel penjaga stomata pada daun yang telah membuka sempurna (daun ke 3 – 5). Lapisan daun bagian bawah dikupas dan ditempatkan pada gelas preparat, ditambah beberapa tetes aquades, dan ditutup dengan gelas penutup, kemudian diperiksa di bawah mikroskop pada perbesaran 10 x 10 dan 10 x 40.

Penghitungan jumlah kromosom dilakukan di Puslitbang Biologi LIPI menggunakan potongan meristem. Potongan tersebut direndam dalam larutan 0.002 M 8-Hydroxyquinolin selama 3-5 jam pada suhu 4 °C, kemudian dibilas dengan akuades, dan difiksasi dalam 45% asam asetat selama 10 menit. Potongan pucuk (meristem) dimasukkan pada campuran larutan b 1 N HCl dan 45% asam asetat dengan perbandingan 1:3 (v/v) pada air dengan suhu 60 °C selama 1-5 menit, dan diwarnai dengan aceto-orcein 2%, dilakukan *squashing* kemudian diamati di bawah mikroskop.

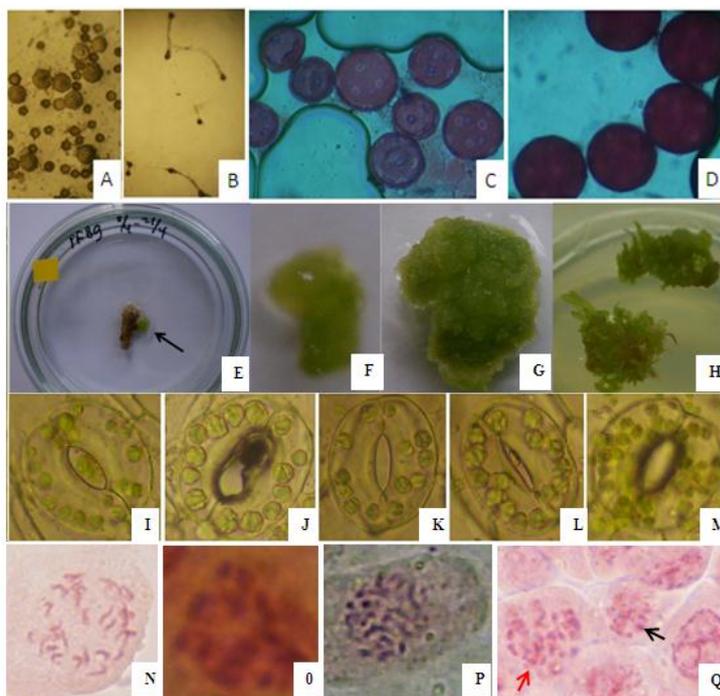
Penentuan ploidi dilakukan dengan alat flow cytometer CyFlow® space di Pusat Penelitian

Biologi LIPI, menggunakan buffer PI, untuk PF35.1 dan PF89. Penentuan plodi PF69.1 dan PF69.2 dilakukan di East West Seed Indonesia menggunakan buffer Ewindo.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Pengaruh Iradiasi Sinar Gamma**

Efek iradiasi pada perkecambahan serbuk sari terlihat bahwa pada dosis iradiasi 100 Gy perkecambahan polen setelah 24 jam ditumbuhkan pada larutan sukrosa 15% terhambat (Gambar 1A) dibandingkan dengan serbuk sari yang tidak diiradiasi yang mampu berkecambah sempurna (Gambar 1B). Selain itu pada dosis 100 Gy kemampuan menyerap pewarna aceto-orcein berkurang (Gambar 1C) dibandingkan dengan kontrol yang mampu menyerap pewarna aceto-orcein secara intensif (Gambar 1D). Hasil ini menunjukkan bahwa serbuk sari non aktif pada dosis iradiasi 100 Gy.



Gambar 1. (A-B) Perkecambahan serbuk sari dan penyerapan pewarna aceto-orcein kontrol pada sukrosa 15%, (C-D) Perkecambahan dan penyerapan warna aceto-orcein pada serbuk sari yang diiradiasi pada dosis 100 Gy. (E-H) Eksplan Dchi-11 x Dchi-14 (PF89) yang terinduksi menjadi kalus. (I-M) Kloroplas dalam sel penjaga stomata *Dianthus chinensis* : haploid : (I) PF035-1, (J) PF042, (K) PF069-1, (L) PF079, dan diploid : (M) kontrol. (N-Q) Jumlah kromosom : (N) Kontrol ( $2n=2x=30$ ) PF35.1 ( $2n=x=15$ ), (O) PF79 ( $2n=x=15$  dan 30), (P) PF42 ( $2n=2x=15$ ) dan (Q) Kontrol ( $2n=2x=30$ )

**Penyelamatan Embrio**

Buah hasil penyerbukan yang dapat dipanen adalah buah dengan umur 10, 13 dan 14 hari setelah penyerbukan, sedang pada tanaman kontrol dipanen pada umur 7 dan 14 hari. Buah yang dipanen adalah buah yang berwarna hijau, sedangkan buah berwarna coklat menandakan buah tersebut telah gugur. Dari hasil observasi diperoleh bahwa umur 14 hari setelah penyerbukan merupakan umur maksimal buah dapat dipanen, selebihnya buah akan gugur. Dari 131 persilangan yang telah dilakukan 77 buah (59%) dapat dipanen, 54 buah (41%) buah gugur. Dari 77 buah yang dipanen hanya 51 buah dan 2 buah kontrol diteruskan untuk di kultur. Hasil penyelamatan embrio ini 7 kultur berhasil tumbuh,

sementara dua persilangan kontrol tumbuh semua (Tabel 1).

Perlakuan iradiasi pada serbuk sari untuk penyerbukan mampu menginduksi partenogenesis dan diperoleh tujuh buah yang mengandung poros bunga (karpel) yang membawa biji belum masak, yang selanjutnya ditanam di media penyelamatan embrio. Biji *Dianthus chinensis* dalam kondisi masak berwarna hitam. Jumlah poros bunga yang membawa biji yang ditanam di media M8 sebanyak 21 dan di media M10 sebanyak 20. Hasil penyelamatan embrio ini diperoleh 10 biji belum masak dan berhasil ditanam (Tabel 2 dan 3).

Tabel 1. Pengaruh iradiasi sinar gamma Cobalt <sup>60</sup>Co 100 Gy pada serbuk sari terhadap keberhasilan pertumbuhan embrio

Umur buah (HSP)	Jumlah karpel yang ditanam	Jumlah karpel berhasil tumbuh				Jumlah Karpel total
		Dchi-11 x Dchi-14	Dchi-15 x Dchi-14	<i>D. caryophyllus</i> x Dchi-14	Kontrol #	
7	1	0	0	-	1	1
10	8	1	0	-	-	1
13	19	2	1*	-	-	3
14	23	3	0	0	3	6

Keterangan: \*) kontaminasi, HSP: hari setelah penyerbukan, # control = *D. chinensis* Dchi-11 x Dchi-14 (tanpa iradiasi)

Tabel 2. Pengaruh media terhadap jumlah buah yang berhasil tumbuh hasil pseudofertilisasi

Media	Jumlah karpel yang ditanam	Jumlah ovary atau karpel yang tumbuh pada berbagai pseudofertilisasi			
		♂Serbuk sari Dchi-14		♂Serbuk sari Dchi-13	
		♀Dchi-11	♀Dchi-15	♀Dchi-15	♀Dchi-14
M8	21	16 (7)*	1	1	3
M10	20	17 (1)*	3(1)*	0	0

Keterangan : \*) angka di dalam kurung adalah embrio yang berhasil tumbuh; M8 = MS + 0.35 mg L<sup>-1</sup> NAA + 1 mg L<sup>-1</sup> BAP + 60 g L<sup>-1</sup> sukrosa (Sato *et al.*, 2000), M10 = MS + 1 mg L<sup>-1</sup> 2,4D + 1 mg L<sup>-1</sup> BAP + 20 g L<sup>-1</sup> sukrosa (Mosquera *et al.*, 1999)

Tabel 3. Jumlah embrio yang tumbuh dari setiap ovary atau karpel hasil pseudofertilisasi

Kode ovary	Betina	Donor polen	Media	Jumlah embrio ditanam	Jumlah embrio tumbuh
PF03	Dchi-11	Dchi-14	M8	1	1 <sup>+</sup>
PF35	Dchi-11	Dchi-14	M8	2	1
PF42	Dchi-11	Dchi-14	M8	1	1
PF69	Dchi-11	Dchi-14	M8	2	2
PF74	Dchi-11	Dchi-14	M8	2*	2*
PF79	Dchi-11	Dchi-14	M10	1	1
PF89	Dchi-15	Dchi-14	M10	1	1

Keterangan: \*) terkontaminasi; +) planlet mati; #) 1 embrio mati; M8 = MS + 0.35 mg L<sup>-1</sup> NAA + 1 mg L<sup>-1</sup> BAP + 60 g L<sup>-1</sup> sukrosa (Sato *et al.*, 2000); M10 = MS + 1 mg L<sup>-1</sup> 2,4D + 1 mg L<sup>-1</sup> BAP + 20 g L<sup>-1</sup> sukrosa (Mosquera *et al.*, 1999).

Embrio mulai tumbuh menjadi tunas pada minggu ke 4 setelah kultur. Selanjutnya ovarium yang ditanam diberi kode PF03, PF35, PF42, PF69, PF74, PF79, dan PF89. PF 35, PF69 dan PF74 menghasilkan dua embrio, sedangkan yang lain hanya satu embrio. Pada pertumbuhan selanjutnya PF03 mati dan PF74 terkontaminasi. Enam embrio yang tersisa dapat tumbuh langsung menjadi tunas, sedangkan embrio dari PF89 yang dipanen umur 10 hari terinduksi menjadi kalus (Gambar 1E-H). Hasil ini menunjukkan bahwa kedua media perkecambahan dapat digunakan. Namun M8 menghasilkan persentase tumbuh embrio yang lebih tinggi dibanding M10. Jumlah sukrosa M8 lebih tinggi dan menggunakan auksin NAA sedang media M10 menggunakan auksin 2,4-D. Hal yang sama juga terjadi pada mawar (Meynet *et al.*, 1994) bahwa embrio dapat berkecambah di semua media uji dan tidak ada pengaruh penggunaan hormon yang berbeda-beda. Namun sebagian besar regenerasi mengalami vitrifikasi. Embrio yang berhasil tumbuh pada media M8 dan M10 pada umumnya berasal dari pseudofertilisasi menggunakan serbuk sari Dchi-14 (Tabel 3). Tidak ada satupun donor serbuk sari berasal dari Dchi-13 yang berhasil menyerbuk.

**Evaluasi Tingkat Ploidi**

Dari total 10 embrio yang telah tumbuh terdapat 4 embrio terkontaminasi dan mati yaitu 1 embrio dari PF03, 1 embrio dari PF35 dan 2 embrio dari PF74. Genotipe PF35-1, PF42, PF69-1, PF69-2, PF79 dan PF89 dilanjutkan untuk evaluasi ploidi. Berdasarkan analisis jumlah kandungan kloroplas pada sel penjaga stomata diperoleh 4 genotipe yang diduga haploid yaitu PF035-1, PF42, PF 69-1 dan PF79, sedang dua genotipe yaitu PF69-2 dan PF89 belum dapat dianalisis, karena belum membentuk daun (Tabel 4). Hasil penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian Yuan *et al.* (2009) bahwa jumlah kloroplas bervariasi pada genotipe yang sama dengan kisaran jumlah kloroplas antara 9-24 pada genotipe yang diduga haploid (Gambar 1I-L) dan 19-

36 pada genotipe diploid (kontrol) (Gambar 1M). Empat genotipe yang diduga haploid dilanjutkan dengan analisis jumlah kromosom.

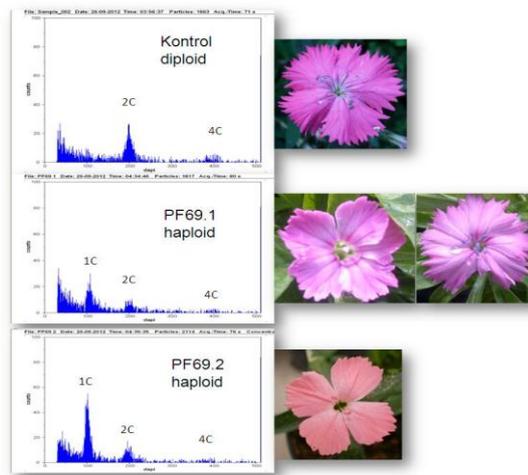
Analisis kromosom sangat sulit dilakukan pada akar yang berasal dari planlet *in vitro*, sehingga analisis jumlah kromosom menggunakan jaringan meristem pada planlet. Berdasarkan analisis jumlah kromosom menggunakan meristem pucuk planlet diketahui bahwa empat genotipe memiliki jumlah kromosom 15 (PF35.1, PF69.1, PF69.2 dan PF79) dan jumlah kromosom 30 (PF42 dan kontrol) (Gambar 1 N dan P). Pada PF79 terdapat kemungkinan telah terjadi penggandaan kromosom secara spontan. (Gambar 1Q). Namun hasil analisis kromosom ini juga masih meragukan. Untuk memperjelas analisis ploidi ini dilakukan analisis flow cytometri.

Analisis dengan Flow cytometer diperoleh bahwa PF69.1 dan PF69.2 adalah haploid (Gambar 2). Pada histogram itu pula dapat dibuktikan adanya kemungkinan penggandaan spontan, terlihat adanya *peak* (puncak) 4C. Analisis dengan flow cytometer pada PF 35.1, PF42, PF79 dan PF89 menunjukkan bahwa tanaman-tanaman tersebut memiliki ploidi sama dengan tanaman kontrol (Gambar 3 dan 4). Analisis flow cytometri tidak dapat membedakan antara diploid dengan haploid ganda, sehingga konfirmasinya menggunakan *selfing*.

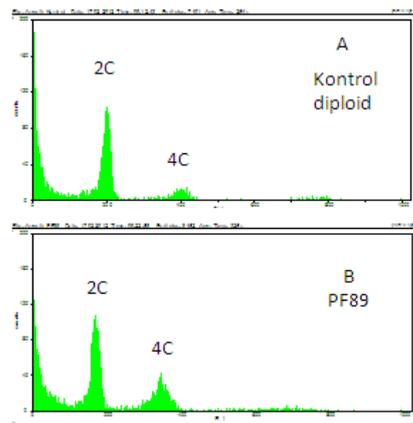
Setelah aklimatisasi, dari enam genotipe hasil pseudofertilisasi hanya 3 genotipe (PF42, PF69.1 dan PF69.2) yang berbunga. Genotipe PF42 morfologi daun dan bunga yang sangat berbeda dengan donor ovul dan serbuk sarinya. PF42 memiliki corak berbintik putih yang merata pada petal dengan warna petal sama dengan donor ovul. Perbedaan juga terjadi pada bentuk dan ukuran daun, tipe batang yang lebih roset dibanding dua sumber atau donor ovul dan serbuk sari. PF42 kemungkinan mengalami mutasi selama proses penyelamatan embrio secara *in vitro*. Hasil *selfing* PF42 diperoleh progeni yang bersegregasi yang menunjukkan bahwa PF42 adalah diploid.

Tabel 4. Rataan dan kisaran jumlah kloroplas pada sel penjaga stomata enam genotipe *Dianthus cinensis*

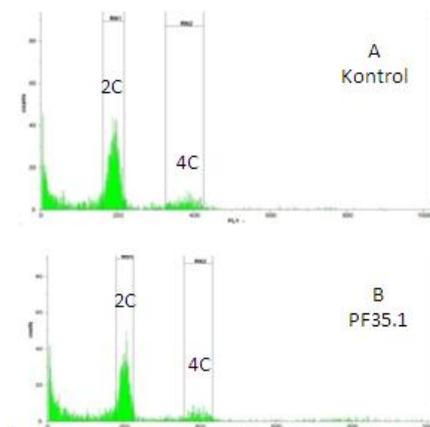
Genotipe	Jumlah stomata yang diamati	Rata-rata jumlah kloroplas	Kisaran	Ploidi
PF035-1	77	15.88 ± 2.5	12 - 24	diploid
PF042	144	14.42 ± 1.8	9 - 18	haploid
PF069-1	47	13.51 ± 2.5	9 - 18	haploid
PF079	21	15.57 ± 2.2	10 - 18	haploid
Kontrol 1	116	26.00 ± 3.1	19 - 36	diploid
Kontrol 2	34	25.00 ± 2.2	21 - 31	diploid



Gambar 2. Histogram DNA hasil analisis flow cytometer PF69.1 dan PF69.2: (A) Kontrol diploid, (B) PF69-1 dan (C) PF69-2



Gambar 3. Histogram DNA hasil analisis flow cytometry PF89: (A) kontrol diploid, (B) PF89 diploid



Gambar 4. Histogram DNA hasil analisis flow cytometry PF35.1: (A) kontrol; (B) PF 35.1

PF69.1 memiliki warna daun kekuningan, kemungkinan karena terjadi gangguan pada klorofil. Waktu berbunga tanaman ini sangat lama (11 bulan), dan bunga tidak memiliki antera. PF69.2 memiliki pertumbuhan vegetatif normal, tetapi bunga tidak

memiliki antera. Dari hasil ini terlihat bahwa perbedaan antara diploid dengan haploid yang utama adalah bagian bunga. Tanaman diploid memiliki antera, sedangkan tanaman haploid tidak memiliki antera (Gambar 5L, M).



Gambar 5. Pertumbuhan planlet *in vitro* dan tanaman hasil pseudofertilisasi. (A) kontrol, (B) PF35-1, (C) PF42, (D) PF69-1 (E) PF69-2, (F) PF79 (G) Tanaman hasil pseudofertilisasi umur 3 bulan setelah aklimatisasi, (H) tanaman PF42, (I) tanaman PF69.1, (J) tanaman PF69.2, (K) bunga PF42, (L) bunga PF69.1, (M) bunga PF69.2

Hasil penelitian pseudofertilisasi *Dianthus chinensis* menggunakan sinar gamma pada dosis 100 Gy dapat menonaktifkan serbuk sari. Akibat dari serbuk sari yang non aktif menyebabkan buah gugur setelah 2 minggu, ditandai dengan berubahnya warna ovary dari warna hijau menjadi coklat. Buah harus dipanen sebelum umur 2 minggu. Hasil penelitian Sato *et al.* (2000), menggunakan donor betina *Dianthus caryophyllus* yang diiradiasi dengan sinar X pada level dosis 100 kRad, serbuk sari mampu berkecambah di dalam tabung polen dan dapat mencapai stilus. Pembengkakan buah terjadi satu minggu setelah penyerbukan, tetapi ovary akan mengalami aborsi pada umur 4 minggu, sehingga harus dikultur pada umur 2- 3 minggu setelah penyerbukan.

Pada percobaan ini dari 131 persilangan semu (pseudofertilisasi) yang dilakukan diperoleh dua tanaman haploid yaitu PF69.1 dan PF69.2. Pseudofertilisasi PF 69.1 memiliki daun berwarna kekuningan, dengan umur berbunga yang lambat. Persentase tanaman haploid yang diperoleh pada penelitian ini lebih banyak jika dibandingkan dengan yang diperoleh Sato *et al* (2000) dengan hasil 1

tanaman haploid ganda dari 300 pseudofertilisasi dan Dolcet-Sanjuan *et al.* (2001) dengan hasil 3 tanaman haploid dari 1650 pseudofertilisasi. Tanaman yang dihasilkan dari biji hasil penyerbukan dengan serbuk sari yang diiradiasi merupakan hasil dari tidak lengkapnya transmisi genom jantan (Peixe *et al.* 2000). Menurut Sestili dan Ficcadenti (1996), iradiasi pada tingkat yang rendah hanya merusak sebagian inti sel generatif serbuk sari saja, sehingga masih mampu berfusi dengan sel telur.

Pada tanaman apel setelah penyerbukan dengan serbuk sari yang diiradiasi menghasilkan biji yang mengandung endosperm saja atau endosperm dan embrio. Pada dosis tertentu ada kemungkinan inti sperma tunggal masih ada dalam tabung sari sehingga mampu membuahi sel telur atau berfusi dengan inti polar (Nicoll *et al.*, 1987). Jika hanya menghasilkan endosperm saja dipastikan tanaman adalah triploid, sedang jika menghasilkan embrio dan endosperm dipastikan diploid, tetapi dapat memunculkan mutan karena adanya transmisi gen dari tetua paternal. Hal ini terjadi pada hasil penelitian ini (PF42 dan PF89) yang level ploidinya adalah diploid.

Persentase terbentuknya embrio tertinggi menjadi tanaman adalah pada umur embrio 14 HSP (24%). Hasil penelitian Sato *et al.* (2000) umur 3 minggu merupakan umur maksimal ovary yang dapat dipanen, selebihnya buah akan gugur. Pada penelitian ini hasil yang diperoleh berbeda. Pada persilangan normal, 3 minggu setelah penyerbukan buah telah masak ditandai dengan berubahnya warna embrio dari putih menjadi hitam, sehingga panen buah dilakukan maksimal umur dua minggu untuk menghindari kehilangan materi. Perbedaan ini disebabkan oleh penggunaan materi induk betina yang digunakan. Pada penelitian Sato *et al.* (2000) yang menggunakan *Dianthus caryophyllus* sebagai penerima serbuk sari, memiliki umur berbunga yang lebih lama. Tanaman kontrol yang dipanen satu minggu HSP hanya satu ovul yang mampu tumbuh. Hasil ini menunjukkan bahwa umur satu minggu buah masih terlalu muda untuk berkembang menjadi tanaman. Buah umur satu minggu biji belum masak dan berwarna putih, pada akhirnya embrio berubah menjadi coklat seperti biji masak. Sejalan dengan pendapat Musial *et al.* (2005) dan Bohanec (2009) bahwa proses pemasakan kantong embrio berlanjut selama kultur *in vitro*.

Dalam satu ovary pada umumnya *Dianthus chinensis* memiliki 80-100 ovul. Pada persilangan yang normal biasanya didapatkan biji hanya berkisar antara 10 - 20 saja. Hal ini terjadi karena viabilitas polen *D. chinensis* sangat rendah (40 - 60%) (Kartikaningrum *et al.*, 2011). Perlakuan iradiasi pada serbuk sari untuk penyerbukan menyebabkan pertumbuhan embrio menjadi terhambat. Hal ini ditunjukkan dari hasil persilangannya yang hanya tumbuh 5 karpel dari 21 karpel yang ditanam di media M8 dan 2 karpel dari 20 karpel yang ditanam di media M10 (Tabel 3). Pada kontrol semua eksplan berhasil tumbuh. Hasil ini menunjukkan bahwa kedua media perkecambah semuanya dapat digunakan. Tetapi M8 memiliki persentase yang lebih tinggi dibanding M10, karena jumlah sukrosanya yang lebih tinggi. Hal yang sama juga terjadi pada mawar (Meynet *et al.*, 1994) bahwa embrio dapat berkecambah di semua media uji dan tidak ada pengaruh penggunaan hormon yang berbeda-beda. Hasil penelitian Katoh *et al.* (1993) penggunaan media E20A, MS dan N6 pada hasil penyelamatan embrio melon juga tidak berbeda nyata.

Perlakuan iradiasi pada serbuk sari menyebabkan DNA kromosom rusak, sehingga embrio yang dihasilkan dari pseudofertilisasi ini hanya mengandung kromosom dari sel telur. Pada saat terbentuk embrio, kromosom dari serbuk sari yang diiradiasi ada kemungkinan dapat bergabung

dengan kromosom dari sel telur, tetapi pada perkembangan embrio selanjutnya, kromosom ini dapat hilang selama proses mitosis (Suharsono *et al.*, 2009).

## KESIMPULAN

1. Analisis tingkat ploidi awal tanaman dapat dilakukan dengan menghitung jumlah kloroplas pada sel penjaga stomata.
2. Medium dengan kandungan sukrosa yang lebih tinggi jumlah embrio yang tumbuh lebih tinggi
3. Penyerbukan menggunakan serbuk sari yang diradiasi 100 Gy dapat menginduksi ginogenesis *Dianthus sp.* menghasilkan dua tanaman haploid berdasarkan jumlah kloroplas pada sel penjaga stomata, dan analisis kandungan DNA dengan flow cytometer.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aslam, M. 2000. Utilization of pollen irradiation technique for the improvement of *G. hirsutum* L. Pak J. Biol. Sci. 3(11): 1814-1816.
- Bermejo, A.J. Pardo, A. Cano. 2011. Influence of gamma irradiation on seedless citrus production: pollen germination and fruit quality. Food Nutrition Sci. 2: 169-180.
- Bohanec, B. 2009. Doubled haploid *via* gynogenesis. p 35-46. In A. Touraev, BP Forster, SM Jain (Eds). *Advances in Haploid Production in Higher Plants*. Springer Science + Business Media B.V.
- Carraro L.P., D. Gerola, G. Lombardo, F.M. Gerola. 1990. Pseudo-self-compatibility in ultraviolet irradiated plants of *Primula acaulis* ('pin' morph). J. Cell Sci. 95: 659-665.
- Chalak, L., J.M. Legave. 1997. Effect of pollination by irradiated pollen in Hayward Kiwifruit and spontaneous doubling of induced parthenogenetic trihaploids. Sci. Hort. 68: 83-97.
- Dolcet-Sanjuan R., E. Clavería Llauradó, A. Ortigosa, P. Arús. 2001. Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) dihaploid lines resistant to *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. Acta Hort. 560:141-144.

- Forster, B.P., E. Heberle-Bors, K.J. Kasha, A. Touraev. 2007. The resurgence of haploids in higher plants. *Trends in Plant Sci.* 12(8): 368-375.
- Fu, X.P., SH Yang, M.Z. Bao. 2008. Factors affecting somatic embryogenesis in anther cultures of Chinese pink (*Dianthus chinensis* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 44:194-202.
- Kartikaningrum, S, A. Purwito, G. A. Wattimena, B. Marwoto, D. Sukma. 2011. Teknologi haploid anyelir: studi tahap perkembangan mikrospora dan seleksi tanaman donor anyelir. *J. Hort.* 21(2): 101-112.
- Katoh, N., M. Hagimori, S. Iwai. 1993. Production of haploid plants of melon by pseudofertilization ovule culture. *Plant Tiss Cult Letters* 10(1): 60-66.
- Kielkowska, A., A. Adamus. 2010. In vitro culture of unfertilized ovules in carrot (*Daucus carota* L.). *Plant. Cell. Tiss. Organ Cult.* 102: 309-319
- Meynet J, R Barrade, A Duclos, R Siadous. 1994. Dihaploid plants of roses (*Rosa x hybrid*, cv "Sonia) obtained by parthenogenesis induced using irradiated pollen and in vitro culture of immature seeds. *Agronomie* 2: 169-175.
- Mosquera, T., L.E. Rodríguez, A. Parra, M. Rodríguez. 1999. In vitro adventive regeneration from Carnation (*Dianthus caryophyllus*) anther. *International Symposium on Cut Flowers in the Tropics.* ISHS Acta Hortica 482.
- Musial, K., L. Przywara. 1998. Influence of irradiated pollen on embryo and endosperm development in kiwi fruit. *Ann. Bot.* 82: 747-756.
- Musial, K., B. Bohanec, M. Jakse, L. Przywara. 2005. The development of onion (*Allium cepa* L.) embryo sac in vitro and gynogenesis induction in relation to flower size. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 41: 446-452.
- Nicoll, M.F., G.P. Chapman, D.J. James. 1987. Endosperm responses to irradiated pollen in apples. *Theor. Appl. Genet* 74: 508-515.
- Peixe, A., M.D. Campos, C. Cavaleiro, J. Barroso, M.S. Pais. 2000. Gamma-irradiated pollen induce the formation of 2n endosperm and abnormal embryo development in European plum (*Prunus domestica* L., cv "Rainha Claudia Verde"). *Scientia Hortica.* 86: 267-278.
- Sato, S., N. Katoh, H. Yoshida, S. Iwai, M. Hagimori. 2000. Production of doubled haploid plants of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) by pseudofertilized ovule culture. *Scientia Hortica* 83: 301-310.
- Savaskan, C. 2002. The effect of gamma irradiation on the pollen size of *Gossypium hirsutum* L. *Turk. J. Bot.* 26 : 477-480.
- Sestili, S.N. Ficcadenti. 1996. Irradiated pollen for haploid production. p. 263-274. *In: Jain S et al. (Eds). In Vitro Haploid Production in Higher Plants.* Vol. I. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.
- Sugiyama, K., M. Morishita, E. Nishino. 2002. Seedless watermelon produced via soft X-irradiated pollen. *Hort. Sci.* 37: 251-419.
- Suharsono, M. Alwi, A. Purwito. 2009. Pembentukan tanaman cabai haploid melalui induksi ginogenesis dengan menggunakan serbuk sari yang diradiasi sinar gamma. *J. Agron. Indonesia* 37(2): 123-129.
- Todorova, M., P. Ivanov, N. Nenova, J. Encheva. 2004. Effect of female genotype on the efficiency of  $\gamma$ -induced parthenogenesis in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Helia* 27 (41): 67-74.
- Wedzony, M., B.P. Forster, I. Zur, E. Golemic, M. Szechynska-Hebda, E. Dubas, G. Gotebiowska. 2009. Progress in doubled haploid technology in higher plants. *In A. Touraev, BP Forster, SM Jain (Eds). Advances in Haploid Production in Higher Plants.* Springer Science + Business Media B.V. pp 1-33.

Yuan, S.X., L.Y. Mei, F.Z. Yuan, Y.L. Mei, Z. Mu, Z.Y. Yong, S.P. Tian. 2009. Study on the relationship between the ploidy level of microspore-derived plants and the number of chloroplast in stomatal guard cells in *Brassica oleracea*. *Agricultural Science China* 8 (8): 939-946.

Zhang, Y.X., Y. Lespinasse. 1991. Pollination with gamma-irradiated pollen and development of fruits, seeds and parthenogenic plants in apple. *Euphytica* 54: 101-109.