

**Induksi Ginogenesis melalui Kultur Multi Ovule Slice dan Kultur Ovary Slice *Dianthus chinensis***

***Gynogenesis Induction through Multi Ovule Slice Culture and Ovary Slice Culture on Dianthus chinensis***

Suskandari Kartikaningrum<sup>1\*</sup>, Agus Purwito<sup>2</sup>, Gustaaf Adolf Wattimena<sup>2</sup>, Budi Marwoto<sup>1</sup>, dan Dewi Sukma<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Balai Penelitian Tanaman Hias, Segunung, Jl. Raya Pacet, Ciherang, Cianjur 43253, Indonesia

<sup>2</sup>Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor (Bogor Agricultural University), Jl. Meranti, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680, Indonesia

Diterima 5 Juni 2012/Disetujui 28 Februari 2013

**ABSTRACT**

*Callus induction was studied in five genotypes of Dianthus chinensis using 2.4 D and NAA. Calluses can be obtained from unfertilized ovule culture and ovary culture. The aim of the research was to study gynogenic potential and response of Dianthus chinensis through ovule slice and ovary slice culture for obtaining haploid plants. Five genotypes of Dianthus chinensis and five media were used in ovule slice culture and two genotypes and three medium were used in ovary culture. Flower buds in the 7<sup>th</sup> stage were incubated for the purpose of dark pre-treatment at 4 °C for one day. Ovules and ovaries were isolated and cultured in induction medium. Cultures were incubated for the purpose of dark pre-treatment at 4 °C for seven days, followed by 25 °C light incubation. The result showed that 2.4D was better than NAA in inducing callus. Percentage of regenerated calluses were produced in V11, V13 and V15 genotypes in M7 medium (MS + 2 mg L<sup>-1</sup> 2.4D + 1 mg L<sup>-1</sup> BAP + 30 g L<sup>-1</sup> sucrose and M10 medium (MS + 1 mg L<sup>-1</sup> 2.4D + 1 mg L<sup>-1</sup> BAP + 20 g L<sup>-1</sup> sucrose). All calluses originated from ovule and ovary cultures flowered prematurely. Double haploid (V11-34) were obtained from ovule slice culture based on PER (peroksidase) and EST (esterase) isoenzym marker.*

*Keywords: ovule slice culture, ovary slice culture, callus, Dianthus sp., haploid*

**ABSTRAK**

*Studi induksi kalus dilakukan pada lima genotype Dianthus chinensis menggunakan 2.4D dan NAA. Kalus dapat diperoleh dari kultur ovary dan ovul yang tidak dibuahi. Tujuan penelitian adalah untuk mempelajari potensi ginogenik dan respon tanaman Dianthus chinensis melalui kultur ovule slice dan kultur ovary slice. Penelitian kultur ovule slice menggunakan lima genotype Dianthus chinensis yang ditanam dalam lima macam media induksi, sedangkan pada penelitian kultur ovary slice menggunakan dua macam genotype yang ditanam dalam tiga macam media induksi. Kuncup bunga setiap genotype pada fase T7 diberi pra perlakuan penyimpanan pada 4 °C selama satu hari. Ovul dan ovary di potong-potong kemudian ditanam dalam media induksi dan diinkubasi dalam kondisi gelap pada suhu 4 °C selama minggu, dilanjutkan inkubasi pada suhu 25 °C terang. Hasil studi menunjukkan bahwa persentase terbentuknya kalus, penggunaan auksin dalam bentuk 2.4D lebih baik dibandingkan NAA. Kalus yang dapat diregenerasi diperoleh dari genotype V11, V13 dan V15 yang ditanam pada media M7 (MS + 2 mg L<sup>-1</sup> 2.4D + 1 mg L<sup>-1</sup> BAP + 30 g L<sup>-1</sup> sukrosa) dan M10 (MS + 1 mg L<sup>-1</sup> 2.4D + 1 mg L<sup>-1</sup> BAP + 20 g L<sup>-1</sup> sukrosa). Semua regenerasi menghasilkan pembungaan in vitro premature. Penelitian ini menghasilkan satu tanaman haploid ganda (V11-34) yang berasal dari kultur ovul slice berdasarkan analisis marka isoenzym PER (peroksidase) dan EST (esterase).*

*Kata kunci: Dianthus sp., haploid, kalus, kultur ovul slice, ovary slice*

**PENDAHULUAN**

Tanaman *Dianthus* sp terdiri atas dua kelompok yaitu *Carnation* dan *Pinks*. *Carnation* dikenal dengan nama anyelir, sedangkan *Pinks* ialah nama lain dari species *chinensis*. Anyelir komersial yang ada sekarang merupakan turunan dari species *Dianthus caryophyllus*, yang berasal

dari Eropa bagian Selatan dan Asia bagian Barat (Mii *et al.*, 1990), dan sekarang sudah tersebar luas di daerah subtropik seperti Belanda, Inggris, Italia dan daerah California di Amerika Serikat.

Sebagian besar tanaman *Dianthus* sp. komersial merupakan F1 heterozigot. Pengembangan *inbreed* untuk pembentukan tanaman hibrida memerlukan generasi *selfing* lebih dari enam generasi, tergantung kompleksitas karakter. Periode ini menjadi lebih lama jika karakter yang dituju berasal dari persilangan interspesifik. Melalui teknologi

\* Penulis untuk korespondensi. e-mail: suskandari@yahoo.com

haploid ganda waktu yang diperlukan untuk pengembangan *inbreed* dapat diperpendek. Produksi tanaman haploid memerlukan pendekatan teknologi haploid dengan metode yang sederhana agar dapat digunakan secara efektif.

Ginogenesis merupakan produksi tanaman haploid yang berasal dari gamet betina tanpa fertilisasi. Produksi tanaman haploid pada *Dianthus* melalui ginogenesis telah dilakukan oleh Kartikaningrum *et al.* (2011) melalui pseudofertilisasi, sedangkan penelitian ginogenesis melalui kultur ovul dan atau kultur ovarium belum pernah dilakukan. Produksi tanaman haploid melalui ginogenesis banyak dilakukan pada tanaman bawang (Alan *et al.*, 2003; Musial *et al.*, 2005), labu (*Cucurbita pepo*) (Shalaby, 2007) dan pada tomat (Bal dan Abak, 2003). Produksi tanaman haploid melalui ginogenesis dilakukan hanya pada tanaman yang sulit diperoleh melalui androgenesis dan tidak dapat diperoleh regenerasi yang viabel (Obert *et al.*, 2009). Haploid ginogenik dapat diinduksi dari hasil isolasi ovul, ovarium atau bahkan kuncup bunga tanpa fertilisasi (Bohanec, 2009). Kultur ovarium, *ovary slice* dan ovul banyak diterapkan pada beberapa tanaman hias seperti lilium, tulip, alstroemeria dan cyclamen (Kanoh *et al.*, 1988; Straahof *et al.*, 1987; Rai dan Rai, 2006).

Pengembangan teknologi haploid memiliki beberapa keuntungan dan sangat bermanfaat dalam memfasilitasi program pemuliaan dan penelitian dasar pada tanaman. Tanaman haploid ganda sebagian besar digunakan dalam pembentukan varietas hibrida F1 dalam program pemuliaan. Haploid ganda juga bermanfaat dalam proses seleksi terutama untuk karakter-karakter poligenik, karena rasio genetiknya menjadi lebih sederhana dan untuk mendapatkan genotipe tertentu, jumlah tanaman yang diseleksi lebih sedikit. Selain itu tanaman haploid ganda berguna untuk studi yang terkait dengan karakter resesif, karena efek dominan tidak

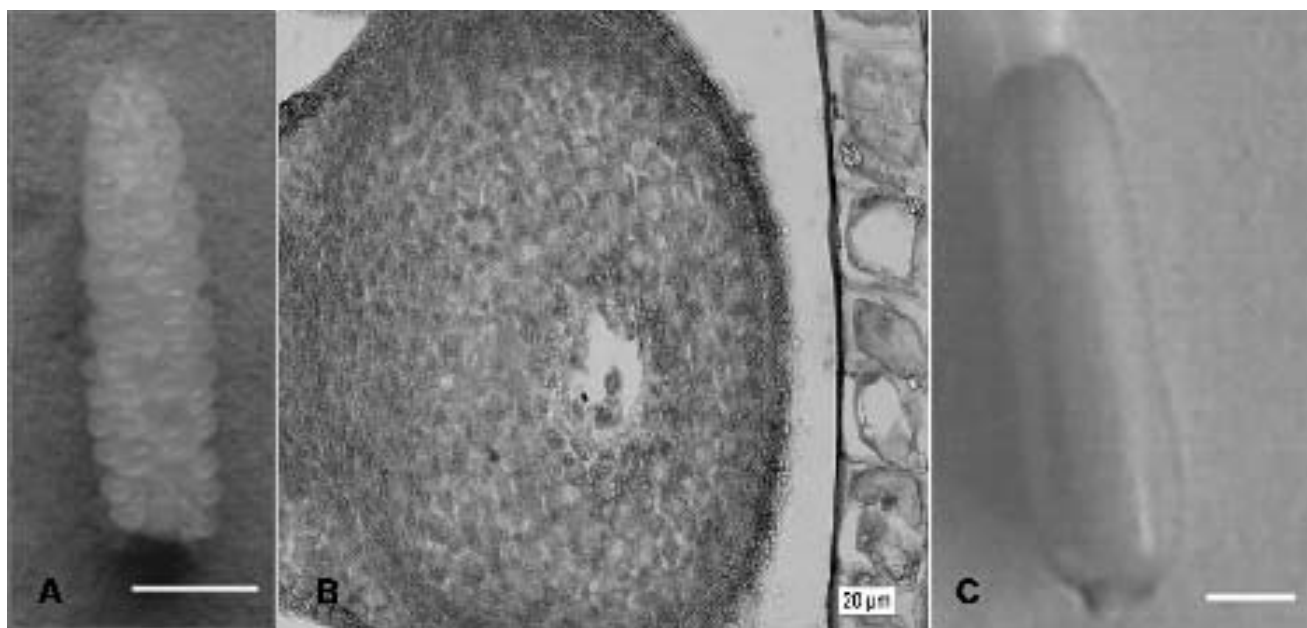
menutupi fenotipe resesif dari tanaman. Menurut Datta (2005) tanaman haploid yang memiliki jumlah kromosom gametofitik menyediakan sistem yang penting untuk studi mutasi dan seleksi. Tujuan penelitian ini ialah mengetahui potensi dan respon ginogenik tanaman *Dianthus chinensis* melalui kultur ovul dan kultur ovarium untuk mendapatkan tanaman haploid.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan dan Rumah Naungan Balai Penelitian Tanaman Hias, Segunung dari Januari sampai dengan Desember 2011. Bahan tanaman yang digunakan adalah spesies *Dianthus chinensis* koleksi Balai Penelitian Tanaman Hias dengan warna bunga berbeda, yaitu merah muda (V11), ungu (V13), merah-ungu (V14), dan merah tua (v16), serta varietas 'Telstar' (V15) dengan warna bunga merah dengan tepi petal putih. Tanaman *Dianthus chinensis* berasal dari setek pucuk berumur 6 bulan yang ditanam di pot diameter 17 cm di Kebun Percobaan Cipanas, pada ketinggian tempat 1,100 m dpl. Eksplan ovul atau ovarium yang belum mengalami fertilisasi diisolasi dari bunga. Umumnya dalam satu ovarium terdapat 40-80 ovul yang tersusun di sepanjang *carpel*.

### Induksi Ginogenesis melalui Kultur Multi Ovule Slice

Kultur multi *ovule slice* berasal dari *carpel* dengan multi ovul yang dipotong menjadi empat bagian. Percobaan menggunakan lima genotipe, yaitu V11, V13, V14, V15, dan V16. Eksplan yang digunakan adalah ovul pada kuncup bunga fase T7 (Gambar 1A) yang telah terbentuk kantung embrio (Gambar 1B). Kuncup bunga diberi praperlakuan penyimpanan pada suhu 4 °C selama 1 hari, kemudian ovarium



Gambar 1. Eksplan *Dianthus chinensis*. (A) multi ovul pada fase T7 (garis = 1 mm); (B) kantung embrio pada fase T7 (10 hari setelah munculnya primordia bunga); dan (C) ovarium (garis = 1 mm)

dibuka, multi ovul dipotong menjadi empat bagian dan disterilisasi. Selanjutnya, ovarium ditanam pada lima macam media induksi, yaitu

- M6 = WT + 0.25 mg L<sup>-1</sup> 2.4D + 0.01 mg L<sup>-1</sup> NAA + 0.5 mg L<sup>-1</sup> TDZ + 30 g L<sup>-1</sup> sukrosa (Winarto *et al.*, 2011)
- M7 = MS + 2 mg L<sup>-1</sup> 2.4D + 1 mg L<sup>-1</sup> BAP + 30 g L<sup>-1</sup> sukrosa (Fu *et al.*, 2008)
- 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)
- M9 = MS + 0.1 mg L<sup>-1</sup> NAA + 1 mg L<sup>-1</sup> TDZ + 20 g L<sup>-1</sup> sukrosa (Nontaswatsri *et al.*, 2007)
- 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)

Komposisi media dasar WT dan MS disajikan pada Tabel 1. Kultur diinkubasi dalam kondisi gelap pada suhu 4 °C selama 1 minggu kemudian dilanjutkan pada suhu inkubasi 25 °C pada kondisi terang.

*Induksi Ginogenesis melalui Kultur Ovary Slice*

Kultur *ovary slice* diaplikasikan pada dua genotipe yaitu V11 dan V13 pada fase T7 (Gambar 1C). Kuncup bunga diberi perlakuan penyimpanan pada suhu 4 °C selama 1 hari, kemudian ovarium dipotong menjadi 4 empat bagian dan di tanam pada 3 macam media induksi:

- M6 = WT + 0.25 mg L<sup>-1</sup> 2,4D + 0.01 mg L<sup>-1</sup> NAA + 0.5 mg L<sup>-1</sup> TDZ + 30 g L<sup>-1</sup> sukrosa (Winarto *et al.*, 2011)
- M7 = MS + 2 mg L<sup>-1</sup> 2,4D + 1 mg L<sup>-1</sup> BAP + 30 g L<sup>-1</sup> sukrosa (Fu *et al.*, 2008)
- 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)

Setiap unit percobaan terdiri atas satu petri dish berisi 4 potongan ovarium. Kultur diinkubasi dalam kondisi gelap pada suhu 4 °C selama 1 minggu kemudian dilanjutkan dengan inkubasi terang pada suhu 25 °C. Regenerasi eksplan yang membentuk kalus diseleksi kemudian disubkultur pada media WT + 0.01 mg L<sup>-1</sup> NAA + 0.50 mg L<sup>-1</sup> BAP + 30 g L<sup>-1</sup> sukrosa. Media WT (Winarto *et al.*, 2011) merupakan modifikasi media MMS (Murashige dan Miller Syngonium) hasil penelitian Winarto dan Mattjik (2009). Setelah planlet terbentuk, planlet dipindahkan ke media MS tanpa zat pengatur tumbuh (ZPT).

Percobaan faktorial disusun dalam rancangan kelompok lengkap teracak dengan 3 ulangan pada percobaan kultur multi *ovule slice* dan dengan 4 ulangan pada percobaan kultur *ovary slice*. Faktor pertama adalah genotipe dan faktor ke dua adalah media induksi. Setiap unit percobaan terdiri atas satu petri dish berisi 4 potongan eksplan. Pengamatan kalus dilakukan pada 1 bulan setelah tanam. Setiap faktor yang memberikan pengaruh nyata dilanjutkan dengan DMRT pada taraf  $\alpha = 5\%$ . Pengamatan dilakukan pada persentase terbentuknya kalus. Data yang diperoleh dalam bentuk persen ditransformasi ke dalam Arcsin. Sebelum ditransformasi, nilai 0% diganti dengan 1/4n, dimana n adalah jumlah satuan percobaan dari data persentase diperoleh.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

Ginogenesis merupakan upaya lain pembentukan kalus atau embrio yang sulit dilakukan menggunakan antera (androgenesis). Perkembangan serbuk sari pada androgenesis merupakan faktor yang penting, biasanya tahap mikrospora *late-uninucleate* merupakan target yang responsif untuk mengubah gametofitik menjadi sporofitik. Sebaliknya pada ginogenesis kisaran tahap perkembangan

Tabel 1. Komposisi media dasar yang digunakan

Komposisi bahan kimia	WT*	MS	Komposisi bahan kimia	WT*	MS
	..... mg L <sup>-1</sup> .....			..... mg L <sup>-1</sup> .....	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	550	1650	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	5.7	6.2
KNO <sub>3</sub>	1250	1900	KI	0.65	0.83
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	250	-	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	15.5	22.3
MgSO <sub>4</sub>	180	370	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	7.5	8.6
CaCl <sub>2</sub>	300	440	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.2	0.25
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	200	-	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.02	0.025
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	150	170	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.02	0.025
Myo-inositol	110	100	Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	37.3	37.3
Thiamin-HCl	0.5	0.1	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.5	27.8
Piridoxin		0.5	Phytigel	2.8	2.8
Niacin		0.5	pH	5.8	5.8
Glisin		200			

Keterangan: \*Medium WT (Winarto *et al.*, 2011)

ovul sangat lebar. Gametofit jantan dan betina tanaman *Dianthus chinensis* tidak masak bersamaan. Hasil terbaik untuk isolasi ovul ialah 4 hari sebelum antesis (data tidak ditampilkan).

*Kultur Multi Ovule Slice*

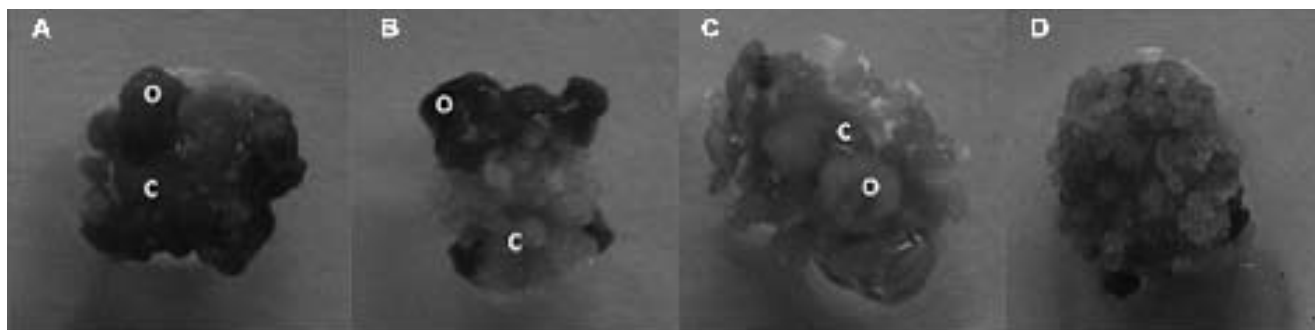
Persentase kalus dihitung pada jaringan ovul dan *carpel* (Gambar 2). Hasil penelitian pada kultur multi *ovule slice* menunjukkan bahwa setiap genotipe memberikan respon yang berbeda. Persentase rata-rata terbentuknya kalus pada multi *ovule slice* berkisar antara 0-29.17%. Hasil analisis ragam menunjukkan adanya interaksi antara media induksi dengan genotipe. Pengaruh interaksi media dengan genotipe ini menunjukkan bahwa genotipe berespon spesifik terhadap media tertentu (Tabel 2). Genotipe V11 dapat membentuk kalus pada *carpel* dan ovul pada media M6 (WT + 0.25 mg L<sup>-1</sup> 2,4D + 0.01 mg L<sup>-1</sup> NAA + 0.5 mg L<sup>-1</sup> TDZ + 30 g L<sup>-1</sup> sukrosa), V13 dan V16 pada media M10 (MS + 1 mg L<sup>-1</sup> 2,4D + 1 mg L<sup>-1</sup> BAP + 20 g L<sup>-1</sup> sukrosa), serta V14 dan V15 pada M7 (Gambar 2D). Pembentukan kalus pada ovul dan *carpel* semua genotipe cenderung rendah pada media M8 (MS + 0.35 mg L<sup>-1</sup> NAA + 1 mg L<sup>-1</sup> BAP + 60 g L<sup>-1</sup> sukrosa) dan M9 (MS + 0.1 mg L<sup>-1</sup> NAA + 1 mg L<sup>-1</sup> TDZ + 20 g L<sup>-1</sup> sukrosa) kecuali genotipe V15 (Tabel 2). Kedua media tersebut mengandung auksin dalam bentuk NAA dan media M6, M7 dan M10 mengandung auksin dalam bentuk 2.4D. Jenis auksin yang berbeda ini yang menyebabkan

perbedaan pembentukan kalus. 2,4D merupakan auksin yang lebih baik dari pada NAA untuk menginduksi kalus *Dianthus chinensis*. Media M8 merupakan media yang digunakan oleh Sato *et al.* (2000) untuk menumbuhkan ovul hasil pseudofertilisasi, sedangkan media M9 digunakan Nontawatsri *et al.* (2007) untuk kultur antera *Dianthus chinensis*. Hasil ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan antara respon kultur ovul dan antera pada spesies yang sama. Hal yang sama juga terjadi pada *Cucurbita* sp. (Shalaby, 2007) dan pada bawang (Alan *et al.*, 2004).

*Kultur Ovary Slice*

Hasil penelitian pada kultur *ovary slice* menunjukkan persentase terbentuknya kalus pada kultur *ovary slice* berkisar antara 0% sampai 68.75% (Tabel 3). Media untuk kultur *ovary slice* yang diteliti merupakan hasil terbaik yang diperoleh pada kultur multi *ovule slice*. Terhadap tiga media yang dicobakan, dua genotipe memberi respon terbaik pada media M10 dan genotipe V13 lebih responsif dibandingkan genotipe V11 (Tabel 3). Kultur *ovary slice* berisi eksplan ovul masih terbungkus oleh dinding ovarium, sehingga tingkat kematian ovul dapat dikurangi (Gambar 3). Dinding ovarium akan mensuplai nutrisi ke ovul muda yang belum mampu melakukan aktivitas metabolisme.

Berbagai penelitian ginogenesis, formula media banyak digunakan untuk mendukung pertumbuhan embrio haploid dari pada untuk pengubahan lintasan gametofitik



Gambar 2. Pembentukan kalus eksplan multi *ovule slice*. (A) ovul dan *carpel* tidak membentuk kalus, *carpel* dan ovul mati; (B) kalus terbentuk pada *carpel*, ovul mati; (C) kalus terbentuk pada ovul; (D) kalus menutupi *carpel* dan ovul. O = ovul, C= *carpel*

Tabel 2. Interaksi media dengan genotipe terhadap persen terbentuknya kalus pada kultur multi ovul slice 4 minggu setelah inisiasi (MSI)

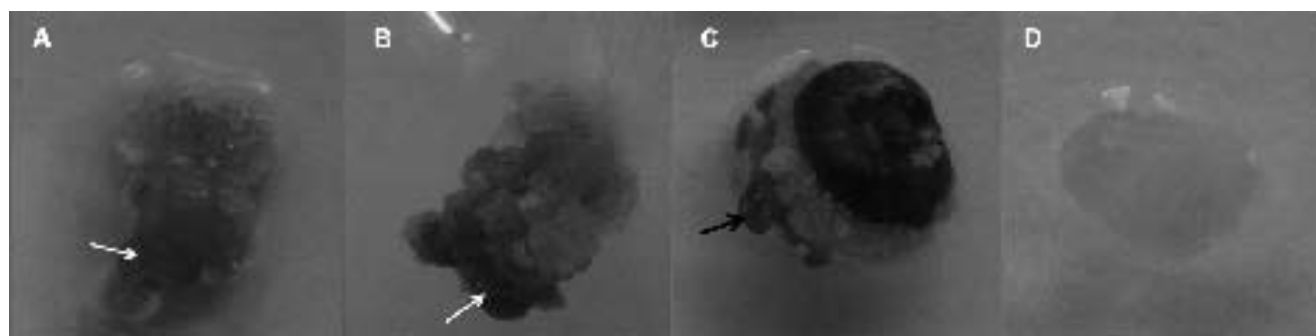
Media	Persen terbentuknya kalus pada berbagai genotipe				
	V11	V13	V14	V15	V16
M6	29.17aA	16.67bB	4.17cdC	4.17cD	0.0dC
M7	14.58cB	12.5dB	27.08aA	25.69abA	12.5dB
M8	0.00bC	0.00bC	10.42aBC	4.17abD	2.08bC
M9	2.08bBC	6.25abB	4.17bC	12.5aBC	2.08bC
M10	8.33cAB	25.00abA	12.5cB	18.75bcB	27.08aA

Keterangan: Angka-angka yang diikuti oleh huruf kecil yang sama pada baris yang sama, atau diikuti huruf kapital yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT pada taraf  $\alpha = 5\%$

Tabel 3. Persen terbentuknya kalus pada kultur *ovary slice* pada jaringan ovul dan karpel 4 MSI

Genotipe	Media	Jumlah eksplan	Persentase kalus pada karpel	Persentase kalus pada ovul
V11	M6	12	0.00	0.00
	M7	12	25.00	12.50
	M10	12	18.75	18.75
V13	M6	12	0.00	0.00
	M7	12	0.00	0.00
	M10	12	68.75	68.75

Keterangan: Persentase terbentuknya kalus dihitung dari jumlah kalus yang terbentuk setiap eksplan dibagi dengan jumlah eksplan; M6 = WT + 0.25 mg L<sup>-1</sup> 2,4D + 0.01 mg L<sup>-1</sup> NAA + 0.5 mg L<sup>-1</sup> TDZ + 30 g L<sup>-1</sup> sukrosa; M7 = MS + 2 mg L<sup>-1</sup> 2,4D + 1 mg L<sup>-1</sup> BAP + 30 g L<sup>-1</sup> sukrosa; M10 = MS + 1 mg L<sup>-1</sup> 2,4D + 1 mg L<sup>-1</sup> BAP + 20 g L<sup>-1</sup> sukrosa



Gambar 3. Pembentukan kalus eksplan ovarium slice setiap genotipe pada dua media. (A) kalus pada V13 pada media M10; (B) kalus V11 pada media M19; (C) kalus V11 pada media M; (D) kalus pada V11 yang tidak respon pada media M6. Anak panah putih menunjukkan dinding ovarium atau ovarium; anak panah hitam menunjukkan ovul tidak berkalus

ke sporofitik. Komposisi medium bervariasi sangat luas di antara spesies-spesies tanaman, meskipun fitohormon digolongkan sebagai faktor induksi tetapi pada kebanyakan *in vitro* jumlah fitohormon yang digunakan (auksin dan sitokinin) untuk embriogenesis ginogenik juga bervariasi. Hal yang sama juga berlaku untuk penggunaan karbohidrat. Konsentrasi karbohidrat yang tinggi (biasanya sukrosa) menguntungkan ginogenesis terutama spesies monokotil, sedangkan spesies lain (misal garbera) memiliki kebutuhan karbohidrat yang lebih rendah (Bohanec, 2009).

Regenerasi kalus yang diperoleh pada percobaan 1 dan 2 disubkultur ke media induksi tunas yaitu media WT + 0.01 mg L<sup>-1</sup> NAA + 0.50 mg L<sup>-1</sup> BAP + 30 g L<sup>-1</sup> sukrosa. Tahap ini hanya kalus yang dominan berasal dari ovul saja yang dilanjutkan untuk disubkultur pada media tersebut. Organogenesis dari kalus asal kedua percobaan mencapai 31.43%. Kalus pada genotipe V11, V13 dan V15 yang berasal dari media M7 (MS + 2 mg L<sup>-1</sup> 2,4D + 1 mg L<sup>-1</sup> BAP + 30 g L<sup>-1</sup> sukrosa) dan M10 (MS + 1 mg L<sup>-1</sup> 2,4D + 1 mg L<sup>-1</sup> BAP + 20 g L<sup>-1</sup> sukrosa) ketika dipindah ke media regenerasi tidak membentuk tunas melainkan langsung membentuk kuncup bunga dan organ-organ lain yang tidak bersamaan. Terdapat variasi waktu organogenesis dari eksplan yang berasal dari multi *ovule slice* (Tabel 4). Apabila tunas vegetatif terbentuk lebih dahulu, bunga yang muncul tumbuh normal (Gambar 4A), namun apabila bunga muncul langsung dari kalus menghasilkan bunga yang abnormal yang memiliki variasi susunan bagian-bagian bunga yaitu

mahkota bunga + kelopak (Gambar 4B); kelopak + antera (Gambar 4C); kelopak saja (Gambar 4D) dan kelopak + putik (Gambar 4E).

Secara teori terbentuknya bunga lebih awal melalui 4 lintasan utama yaitu jalur fotoperiodisitas, jalur autonomus, jalur vernalisasi dan jalur giberelin. Secara normal selama transisi pembungaan terjadi perubahan dalam *shoot apical meristem* (SAM) dari fase vegetatif tanaman yang berubah menjadi fase reproduktif. Florigen merupakan hormon yang berada dalam tanaman dimana sinyalnya berasal dari daun yang ditranslokasikan melalui floem ke SAM (Laurent dan Coupland, 2006; Amasino dan Michaels, 2010). Studi pembungaan yang dilakukan pada *Arabidopsis* menunjukkan bahwa aplikasi fotoperiodisitas tergantung pada fotoreseptor, fitokrom dan kriptokrom tanaman yang mendeteksi sinar merah (*far red*) dan biru (UV-A). Fitokrom PHYA dan PHYB memainkan peranan mengatur waktu pembungaan, dan kriptokrom CRY2 berperan sebagai penerima fotoperiodisitas dan menginduksi pembungaan. Fotoreseptor mengatur ekspresi gen waktu pembungaan, seperti gen *CO* (*constant*) yang menginduksi pembungaan, hanya di bawah kondisi hari panjang. Ekspresi dari gen *CO* mengatur fotoperiodisitas. Gen *CO* yang berada di dalam daun mengaktifkan ekspresi gen *LEAFY* dan *APETALAI* pada meristem reproduktif yang langsung mengontrol inisiasi pembungaan. Jalur autonomus meliputi kombinasi faktor yang terlibat dalam proses RNA dan regulasi epigenetik yang menyebabkan *downregulation* penekanan gen

Tabel 4. Organogenesis kalus pada genotipe dari berbagai media asal

Jenis eksplan	Genotipe	Media asal (awal induksi kalus)	Jumlah eksplan berkalus	Saat muncul tunas (MSI)	Saat muncul akar (MSI)	Saat muncul bunga (MSI)	Jumlah kalus yang berorganogenesis
<i>multi ovul slice</i>	V11	M10	13	12-32	30-32	15	7
	V13	M10	6	11	-	11	1
	V14	M10	1	-	-	-	-
	V14	M7	1	-	-	-	-
	V15	M7	3	28	-	28	1
	V15	M10	7	14-28	17-31	20-28	3
<i>ovary slice</i>	V11	M7	1	18	18	20	1
	V13	M10	3	-	-	-	-

Keterangan: MSI = minggu setelah inisiasi; M7 = MS + 2 mg L<sup>-1</sup> 2,4D + 1 mg L<sup>-1</sup> BAP + 30 g L<sup>-1</sup> sukrosa; M10 = MS + 1 mg L<sup>-1</sup> 2,4D + 1 mg L<sup>-1</sup> BAP + 20 g L<sup>-1</sup> sukrosa



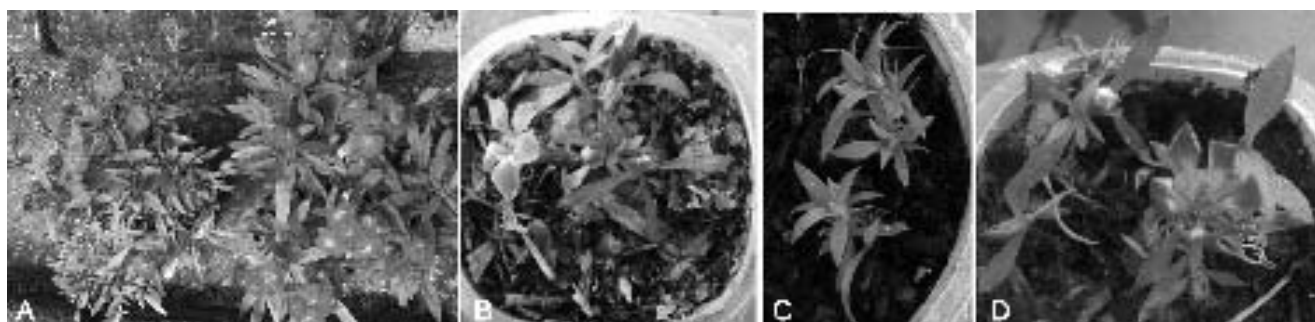
Gambar 4. Bunga prematur yang terinduksi pada hasil regenerasi kalus. (A) bunga normal (V15-224); (B) petal dan kelopak saja (V11-42); (C) anter dan kelopak saja (V11-42); (D) kelopak saja; (E) kelopak dan putik saja (V11-42)

pembungaan *FLOWERING LOCUS C (FLC)* (Simpson, 2004).

Studi pembungaan pada *Arabidopsis* melalui jalur vernalisasi melibatkan metilasi DNA yang mempengaruhi ekspresi gen. Gen *FLC* yang mengkode protein MADS-box adalah gen yang berperan sebagai repressor pembungaan. Gen tersebut ekspresinya sangat rendah dan kemungkinan dapat terjadi demetilasi pada suhu dingin, sehingga proses pembungaan dapat berlangsung (Finnegan *et al.*, 1998). Sementara abnormalitas bunga yang terbentuk karena ketidakseimbangan dari kelompok gen identitas organ pembungaan yang terkait dengan model “ABC” dalam perkembangan bunga (Soltis *et al.*, 2007). Tanaman *Dianthus* sp. merupakan tanaman hari panjang yang akan berbunga

pada kondisi penyinaran hari panjang. Adanya cekaman (terjadinya periode gelap) sesaat pada periode penyinaran hari panjang akan memicu pembungaan *premature*. Hasil penelitian ini membuktikan bahwa tanaman haploid akan mengekspresikan mutan-mutan karakter resesif.

Regenerasi yang terinduksi bunga prematur sebagian besar tidak mampu untuk tumbuh lebih lanjut, karena tidak mampu membentuk bagian vegetatif yang dominan. Dari kultur *ovule slice* hanya ada tiga nomor (V11-42, V11-34 dan V13-134), sedangkan dari kultur *ovary slice* hanya ada 1 nomor yaitu V11-125 yang mampu diaklimatisasi (Gambar 5). Hasil analisis kromosom dan *flow cytometer Dianthus chinensis* pada penelitian terpisah, memiliki kemampuan penggandaan kromosom secara spontan. Apabila dari hasil



Gambar 5. Tanaman donor dan hasil kultur *multi ovul slice* serta *ovary slice*. (A) Tanaman donor V11 (kiri) haploid ganda V11-34 (kanan); (B) Hasil kultur *multi ovul slice* V11-42; (C) Hasil kultur *ovary slice* V11-125; (D) Hasil kultur *multi ovul slice* V13-134

kultur diperoleh diploid, maka untuk mendeteksi apakah tanaman tersebut diploid atau haploid ganda maka pengujian dilakukan dengan analisis isoenzym. Berdasarkan 4 tanaman yang telah diaklimatisasi tersebut, analisis isoenzym baru dilakukan pada V11-34 dan hasil pengujian membuktikan bahwa V11-34 adalah tanaman haploid ganda karena memiliki pola pita isoenzim yang berbeda dengan tanaman donor (tanaman uji memiliki pita lebih sedikit dibandingkan dengan tanaman donor). Tanaman diploid akan memiliki pola pita yang sama dengan tanaman donor, sedang tanaman haploid ganda karena berasal dari setengah genom tanaman donor, maka terjadi pengurangan kandungan DNA. Tiga tanaman hasil kultur *ovule slice* dan *ovary slice* yang lain belum dapat dianalisis mengingat kondisi tanaman yang sangat kecil, tumbuh lambat walaupun sudah berbunga.

### KESIMPULAN

Auksin dalam bentuk 2,4D lebih baik dalam menginduksi kalus dibandingkan NAA. Kalus genotipe V12, V13 dan V15 yang terbentuk, mampu diregenerasi pada media WT + 0.01 mg L<sup>-1</sup> NAA + 0.50 mg L<sup>-1</sup> BAP + 30 g L<sup>-1</sup> sukrosa. Satu tanaman haploid ganda (V11-34) yang berasal dari kultur *ovule slice* telah berhasil diperoleh dari penelitian ini.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Kementerian Pertanian yang telah membiayai penelitian ini.

### DAFTAR PUSTAKA

- Alan, A.R., M.A. Mutschler, A. Brants, E. Cobb, E.D. Erle. 2003. Production of gynogenic plants from hybrids of *Allium cepa* L and *A. roylei* Stern. *Plant Sci.* 165:1201-1211.
- Alan, A.R., A. Brants, E. Cobb, P.A. Goldschmied, M.A. Mutschler, E.D. Erle. 2004. Fecund gynogenic lines from onion (*Allium cepa* L.) breeding materials. *Plant. Sci.* 167:1055-1066.
- Amasino, R.M., S.D. Michaels. 2010. The timing of flowering. *Plant Physiol.* 154:516-520.
- Bal, U., K. Abak. 2003. Attempts of haploidy induction in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) via gynogenesis I. pollination with *Solanum sisymbriifolium* Lam. pollen. *Pak. J. Biol. Sci.* 6:745-749.
- Bohanec, B. 2009. Double haploids via gynogenesis. p. 35-46. In A. Touraev, B.P. Forster, S.M. Jain (Eds.). *Advances in Haploid Production in Higher Plants.* Springer, Berlin.
- Datta, S.K. 2005. Androgenic haploids: factors controlling development and its application in crop improvement. *Current Sci.* 89:1870-1878.
- Finnegan, E.J., R.K. Genger, K.K. Ovac, W.J. Peacock, E.S. Dennis. 1998. DNA methylation and the promotion of flowering by vernalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:5824-5829.
- Fu, X.P., S.H. 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.
- Kanoh, K., M. Hayashi, Y. Serizawa, T. Konishi. 1988. Production of interspecific hybrids between *Lilium longiflorum* and *L. x elegance* by ovary slice culture. *Jpn. J. Breed.* 38:278-282.
- Kartikaningrum, S., A. Purwito, G.A. Wattimena, B. Marwoto, D. Sukma. 2011. Induksi tanaman haploid *Dianthus* sp. melalui pseudofertilisasi menggunakan polen yang diiradiasi dengan sinar gamma. hal. 1195-1204. *Dalam* R. Purwanto, S. Susanto, A.D. Susila, N. Khumaida, D. Sukma, K. Suketi, S.W. Ardie (Eds.). *Prosiding Seminar Nasional Hortikultura 2011.* Lembang 23-24 November 2011.
- Laurent, C., G. Coupland. 2006. The quest for florigen: a review of recent progress. *J. Exp. Bot.* 57:3395-3403.
- Mii, M., M. Buiatti, F. Gimelli. 1990. Carnation. p. 284-318. In P.V. Ammirato, D.A. Evans, W.R. Sharp, Y.P.S. Bajaj (Eds.). *Handbook of Plant Cell Culture. V.5. Ornamental Species.* McGraw-Hill Publishing Company, New York.
- Mosquera, T., L.E. Rodríguez, A. Parra, M. Rodríguez. 1999. *In vitro* adventive regeneration from Carnation (*Dianthus caryophyllus*) anther. *Acta Hort.* 482:305-308.
- 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.

- Nontaswatsri, C., K. Uchiyama, S. Fukai. 2007. Shoot regeneration and genetic transformation of regenerative callus culture in *Dianthus* hybrid 'Telstar Scarlet'. *Acta Hort.* 764:165-168.
- Obert, B., Z. Žáčková, J. Šamaj, A. Pret'ová. 2009. Doubled haploid production in Flax (*Linum usitatissimum* L.). *Biotechnol. Adv.* 27:371-375.
- Rai, N., M. Rai. 2006. Heterosis Breeding in Vegetables Crops. Jai Bharat Printing Press, New Delhi.
- 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. *Sci. Hort.* 83:301-310.
- Shalaby, T.A. 2007. Factors affecting haploid induction through *in vitro* gynogenesis in summer squash (*Cucurbita pepo* L.). *Sci. Hort.* 115:1-6.
- Simpson, G.G. 2004. The autonomous pathway: epigenetic and post-transcriptional gene regulation in the control of *Arabidopsis* flowering time. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7:1-5.
- Soltis, D.G., A.S. Chanderbali, S. Kim, M. Buzgo, P.S. Soltis. 2007. The ABC model and its applicability to basal angiosperm. *Ann. Bot.* 100:155-163.
- Straathof, T.P., J.M. Van Tuyl, C.J. Keijzer, H.J. Wilms, A.A.M. Kwakkenbos, M.P. Van Diën. 1987. Overcoming post-fertilization barriers in *Lilium* by ovary- and ovule culture. *Plant Cell Incomp. Newsl.* 19:69-72.
- Winarto, B., N.A. Mattjik. 2009. Respon antera *Anthurium andreanum* Linden ex André cv. Carnaval pada medium dengan kombinasi konsentrasi zat pengatur tumbuh yang berbeda. *J. Agron. Indonesia* 37:138-144.
- Winarto, B., F. Rachmawati, J.A. Teixeira da Silva. 2011. New basal media for half-anther culture of *Anthurium andreanum* Linden ex André cv. *Tropical. Plant Growth Regul.* 65:513-529.