



Kultur Anther dalam Produksi Tanaman Haploid: Review

Elisa Apriliani^{1*}

¹Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Riau.

Corresponding Author: elisaapr07@gmail.com

Info Artikel	Abstrak
Kata Kunci: Haploid, Double Haploid, Kultur Anther, Mikrospora	Tanaman haploid adalah tumbuhan dengan jumlah kromosom gametofit dan <i>double</i> haploid adalah tanaman haploid yang telah mengalami penggandaan kromosom. Produksi tanaman haploid dan <i>double</i> haploid dilakukan melalui embriogenesis gamet memungkinkan perkembangan suatu galur homozigot dari tetua heterozigot, sehingga mempersingkat waktu yang diperlukan untuk menghasilkan tanaman homozigot dibandingkan dengan metode pemuliaan konvensional yang menggunakan beberapa generasi. Adanya kemajuan dalam bidang bioteknologi memberikan dampak kemajuan yang signifikan pada sektor pertanian. Termasuk telah ditemukan beberapa metode yang untuk memproduksi tanaman haploid dan <i>double</i> haploid, seperti kultur anther <i>in vitro</i> atau mikrospora yang paling efektif dan banyak digunakan oleh para pemulia tanaman. Kultur anther memiliki potensi yang tinggi, namun perlu adanya persiapan yang matang dalam pelaksanaan terkait dengan protokol, sumber eksplan, <i>pre-treatment</i> , kondisi lingkungan, serta media pertumbuhan.
Diterima: 05 Mei 2024 Disetujui : 10 Juni 2024	

1. PENDAHULUAN

Kultur anther mempunyai banyak keuntungan untuk program pemuliaan dan penelitian tanaman pangan. Salah satu manfaat terpenting adalah produksi galur homozigot dalam satu generasi. Metode produksi tanaman haploid dan *double* haploid menawarkan peluang untuk seleksi cepat alel resesif. Selain itu, kultur anthera *in vitro* dapat dikombinasikan dengan metode nilai tambah lainnya seperti seleksi berbantuan penanda (MAS), analisis QTL, transformasi genetik atau mutasi yang diinduksi untuk mencapai tujuan pemuliaan dan penelitian yang diinginkan (Ren *et al.*, 2017; Shi *et al.*, 2019; Wajdzik *et al.*, 2019; Bilichak *et al.*, 2020)

Penggunaan kultur anther atau androgenesis *in vitro* memberikan peluang unik untuk menghasilkan tanaman haploid dan *double* haploid (DH) pada banyak spesies. Manfaat yang lebih besar dari fenomena biologis ini membuat metode ini menjadi fokus penelitian mendasar dan pemuliaan tanaman selama beberapa dekade. Kemampuan untuk memperoleh haploid dan *double* haploid menjadi salah satu aplikasi bioteknologi dalam pemanfaatan serbuk sari yang paling penting dalam pemuliaan tanaman dan genetika. Prosesnya melibatkan manipulasi dan pemrograman ulang perkembangan dan fungsi serbuk sari (Testillano *et al.*, 2000)

Embriogenesis dalam serbuk sari biasanya diinduksi melalui kultur mikrospora anther. Kultur anther seringkali menjadi metode pilihan untuk produksi haploid dan *double* haploid pada banyak tanaman karena kesederhanaan pendekatannya memungkinkan pembentukan kultur anthera dalam skala besar dan penerapannya pada berbagai genotipe (Sopory & Munshi, 1996). Teknik kultur tanaman haploid yang akan

mewarisi garis genetik murni dari tetuanya yang identik (Shape *et al.*, 1986), memberikan keuntungan seperti adanya pemendekan periode pemuliaan, produksi tanaman dihaploid dalam satu langkah, sifat-sifat terekspresi sepenuhnya, dan sebagai langkah penyediaan bahan tanaman yang unggul.

Produksi haploid melalui embriogenesis gamet untuk tujuan pemuliaan telah dipelajari oleh banyak kelompok penelitian sejak tahun 1970an. Pemahaman dasar terkait tahapan pembentukan tanaman haploid, kultur anther, hambatan, dan peluang dari perkembangan teknik produksi tanaman haploid menjadi penting untuk diulas secara singkat dan lengkap pada suatu tulisan.

2. PEMBAHASAN

Tanaman Haploid dan Double Haploid

Awal mula dari pengembangan usaha pertanian sekitar 10.000 tahun yang lalu, bermula dari penggunaan bahan tanam dari buah dan biji. Selanjutnya pada abad ke-19 mulai berkembang teknologi inseminasi buatan dan penyerbukan. Pada tahun 1900, hukum mendel menjadi batu loncatan bagi perkembangan ilmiah dalam bidang pemuliaan tanaman berdasarkan teori heretabilitasnya, yang membawa hasil luar biasa bagi peningkatan produksi pertanian (Cahyamingrum, 2015).

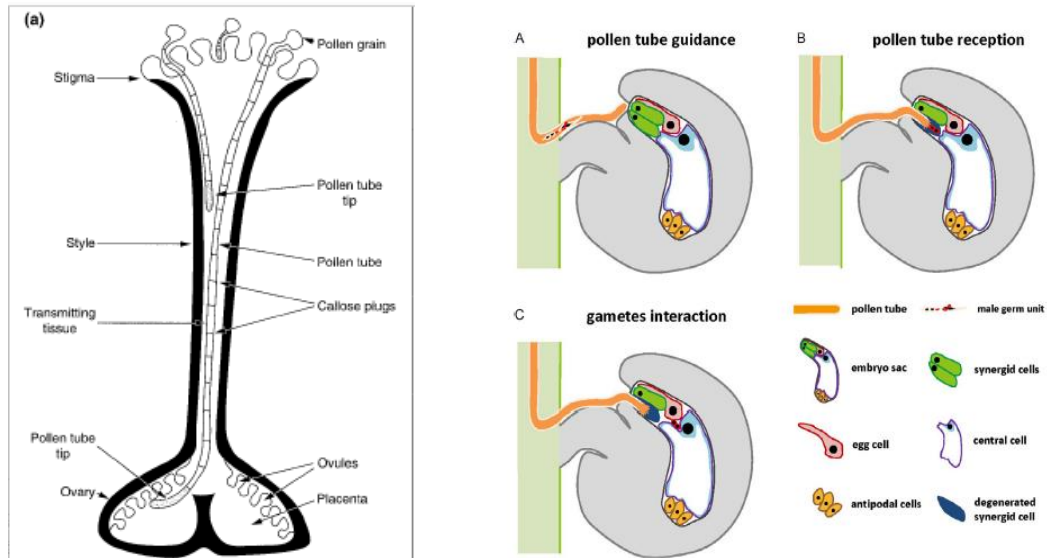
Adanya tuntutan perbaikan genetik tanaman yang harus diperluas secara tepat dan efisien untuk mengimbangi kebutuhan yang terus meningkat, perlu adanya arus perubahan melalui aplikasi yang lebih besar menggunakan alat dan teknologi baru dalam riset genetik tanaman melalui pemuliaan dan bioteknologi. Metode pemuliaan kultur jaringan pertama dikembangkan pada 1930an dalam upaya meningkatkan presentasi kehidupan persilangan kultivar yang ditransfer sifat tahan penyakit dari jenis *wildtype*-nya (Laimer & Waltraud, 2003). Industri pemuliaan secara konvensional menggunakan teknik *selfing* dan *crossing* dalam penyediaan bahan tanam yang seragam dan identik seperti yang diinginkan. Dalam hal tersebut akan memakan waktu lama dan biaya yang mahal, dari hal tersebut teknik kultur jaringan dapat memfasilitasi jalan pintas untuk memperbanyak, persilangan dan seleksi *in vitro* dapat mempersingkat waktu pengembangbiakan.

Tumbuhan haploid adalah sporofit yang membawa nomor kromosom gamet (n , bukan $2n$). Saat spontan atau terjadi duplikasi kromosom yang diinduksi dari suatu haploid, tanaman yang dihasilkan disebut double haploid. Sebagai perbandingan, tanaman dihaploid ($2n = 2x$) merupakan tanaman haploid yang diperoleh dari autotetraploid ($4x$) (Kasha & Maluszynsky 2003).

Embriogenesis gamet adalah salah satu jalur embriogenesis berbeda yang ada di kerajaan tumbuhan, dan terdiri dari kapasitas gametofit jantan (mikspora atau serbuk sari yang belum matang) atau gametofit betina (ginogenesis) untuk beralih secara reversibel dari jalur perkembangan gametofitnya ke arah sporofit. Berbeda dari embriogenesis somatik, yang menyediakan perbanyakan klonal dari genotipe (kecuali variasi so-maklonal), embriogenesis gamet menghasilkan tanaman haploid (kecuali terjadi duplikasi kromosom secara spontan atau terinduksi), karena tanaman tersebut berasal dari regenerasi gamet.

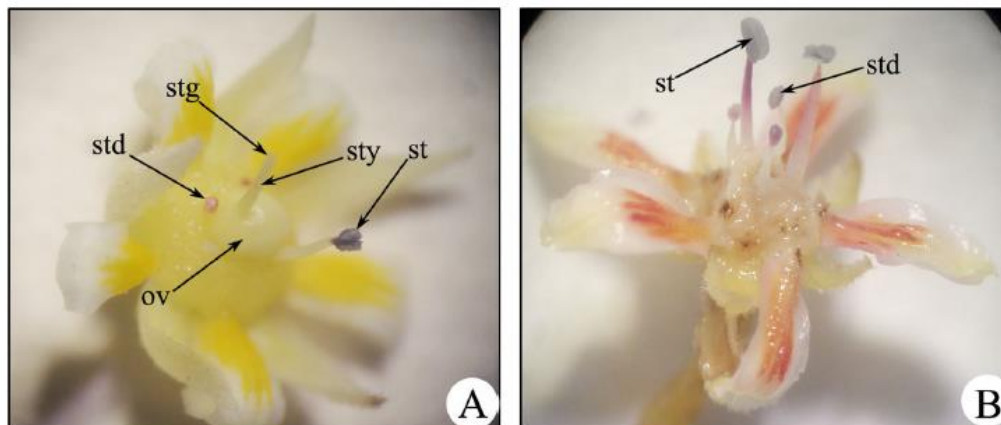
Penggunaan tetua jantan dalam induksi embrio haploid karena sejumlah besar gamet jantan yang terkandung dalam anther merupakan tunggal, dibandingkan dengan gamet betina tunggal per ovul. Selain itu karna gamet tunggal jantan dapat diisolasi. Pembentukan tanaman haploid menggunakan polen tetua jantan melalui kultur anther disebut dengan androgenesis. Menurut defenisi embriogenesis mikrospora atau serbuk sari (androgenesis) adalah transisi dari proses pembentukan gamet pada serbuk sari, berlanjut dengan fertilisasi dalam kandung embrio, hingga pembentukan sporofit yang bersifat haploid (Gambar 1a). Sehingga haploid adalah tanaman sporofit yang membawa kromosom gametofit dari kedua tetua (Maraschin *et al.*, 2005).

Reproduksi seksual pada tanaman dikendalikan oleh sistem genetik kompleks terkait dengan pengaturan biokimia dan lingkungan. Perlu adanya identifikasi antara reaksi yang kompatibel antara serbuk sari dan putik (Gambar 1b).



Gambar 1: (a) Proses pertumbuhan tabung serbuk sari pada putik (Cheung, 1996), (b) Komunikasi jarak pendek antara gametofit jantan dan betina (Zhou *et al.*, 2018)

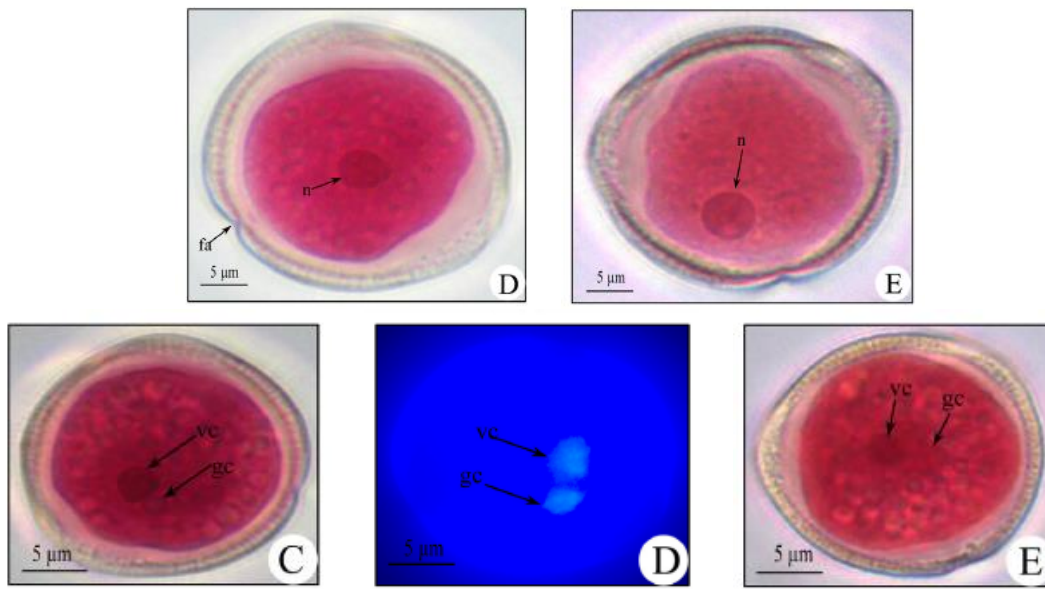
Pada beberapa jenis tanaman, terdapat bunga yang memiliki alat reproduksi jantan (polen) dan betina (ovule) dalam satu kuntum bunga, dinamakan bunga hermaphrodit. Ukuran bunga hermaphrodit cenderung lebih besar dibanding bunga jantan.



Gambar 2: Bunga tanaman mangga (*Mangifera indica* L.). (a) Bunga biseksual: ovarium (ov), style (sty), staminode (std) dan stamen (st). (b) Bunga jantan: stamen (st), staminode pendek (std). (sumber: Muniraja *et al.*, 2018).

Tahapan dari perkembangan benang sari sebagai alat reproduksi sel jantan adalah (1) Sel induk mikrospora, membawa dua *theca* dan empat mikrosporangia. Anther muda dilindungi oleh dinding epidermis dan lapisan archesporium yang berbeda. Bagian dalam mikrosporangium diisi oleh sel sporogen. Jumlah sel sporogen meningkat dengan adanya mitosis. Sel sporogen berkembang menjadi mikro sel induk spora, yang memiliki dinding tipis, sitoplasma padat dan inti menonjol. (2) Tetrads, sebelum permulaan meiosis, sel induk spora berubah bentuk bulat, meningkat volume, dan terbungkus dalam dinding tebal. Pada akhirnya meiosis menjadi empat mikrospora haploid dengan pengaturan tetrahedral dibentuk oleh sitokinesis simultan. (3) Mikrospora, dinding kapur dari tetrad larut dan keempat mikrospora dirilis dilokus anther. Mikrospora yang baru relatif kecil, tidak beraturan membentuk segitiga dengan sitoplasma padat. Pada fase ini, mikrospora

memiliki sitoplasma dengan nukleus menonjol di tengah (Gambar 3d), pada tahap selanjutnya, nukleus berada di pinggir sel (Gambar 3e). Seiring perkembangan, penambahan sporollenin dari tapetum ke primexine dari mikrospora memfasilitasi pembentukan exine tebal. (4) Butir serbuk sari matang, pada tahap ini anther memiliki dua lapisan yaitu epidermis dan endothecium. Inti mikrospora terbagi oleh mitosis asimetris, menjadi serbuk sari biseluler yang memiliki dua sel berbeda, gen kecil adalah sel generatif dan sel yang lebih besar adalah sel vegetatif (Gambar 3cd). Sel generatif berubah dari bentuk lenticular menjadi bulat dan akhirnya berpisah dari sel serbuk sari (Gambar 3e). Sel vegetatif memiliki sitoplasma yang padat oleh plastid, reticulum endoplasma, mitokondria, vesikel kecil, dan badan lipid.



Gambar 3: Anther pada bunga tanaman mangga (*Mangifera indica* L.). Sel diwarnai dengan acetocaramine: (a) Nukleus mikrospora awal tidak berinti (n) yang terletak di tengah, (b) mikrospora dengan nukleus (n) terletak di dekat dinding, (c) Butir polen binukleat asimetris dengan generatif kecil (gt) dan vegetatif besar (vc), (d) Butir serbuk sari binukleat dengan nuclei pada posisi parietal, (e) Mikronukleat dengan inti vegetatif (vc) dan inti generatif (gc) berada di tengah. (sumber: Muniraja, 2018)

Tahap induksi mikrospora untuk androgenesis terjadi pada tahap awal mikrospora. Pada tahap tersebut, mikrospora mengalami pembelahan sel di bawah pengaruh komponen *stress* dari berbagai hal, seperti suhu, perolehan nutrisi, dan tekanan osmotik. Sedangkan pada tahap yang lebih muda (sel induk mikrospora atau tetrad) atau sel yang lebih tua (biseluler atau serbuk sari dewasa), sel tidak lagi dapat mengalami pembelahan (Meriko & Dahlan, 2016).

Kultur Anther

Embrio haploid digunakan sebagai sumber totipotensi sel. Embrio haploid diproduksi melalui embryogenesis mikrospora yang dikecambahkan menjadi tanaman dewasa. Namun tanaman tersebut akan steril karena ketidakmampuan tanaman menghasilkan gamet dengan jumlah kromosom yang seimbang setelah proses meiosis (Arsal, 2018). Langkah penyelesaiannya adalah dengan penggandaan kromosom, dapat terjadi secara spontan dan dengan cara induksi. Penggandaan kromosom pada embrio haploid akan menghasilkan tanaman dengan individu homozigot. Tumbuhan ini disebut *double* haploid (DH) yang banyak digunakan dalam peningkatan genetik hibrida F1.

Potensi yang dimiliki dalam pembentukan embrio haploid perlu adanya perencanaan protokol yang disesuaikan dari kasus per kasus. Pembentukan gamet jantan memiliki jalur yang memungkinkan berbagai tahapan agar dapat digunakan sebagai eksplan. Pada tanaman gandum disarankan menggunakan eksplan dengan pembagian ukuran inti simetris dari gametofit yang belum matang dalam pembentukan embrio (Sangam *et al.*, 2015). Sedangkan pada tahap sporofit yang memiliki kedua inti vegetatif dan generatif akan lebih mudah membentuk kalus (Szakacs & Barnabas, 1988). Namun, kontribusi pada tiap tahap pembentukan gamet berbeda dalam pembentukan embrio.

Pada sebagian spesies, tahapan yang paling responsif dalam menginduksi embrio adalah tahapan dimana mikrospora uniseluler yang akan siap membelah menjadi sel vegetatif dan sel generatif (Gambar 4a) (Bhowmik *et al.*, 2011). Mikrospora yang umum digunakan memiliki inti ditepi. Efek pertama dari tekanan *stress* adalah adanya penataan ulang sitoskeleton dengan Bergeraknya nukleus kepusat sel dan pembentukan pita profase mikrotubulus (yang ada pada serbuk sari normal) menandakan treatment berjalan.

Faktor yang Memengaruhi Kultur Anther

Terdapat beberapa faktor yang memengaruhi efisiensi regenerasi dalam produksi tanaman haploid. Faktor dapat berupa exogenous dan endogenous sebagai berikut:

Genotipe Tanaman

Genotipe tanaman sangat memengaruhi pembentukan kultur anther. Penggunaan genotipe yang berbeda akan memberikan respon yang berbeda pada kondisi penanaman yang sama. Germana (2008) menjelaskan bahwa penggunaan 23 kultivar jeruk nipis yang berbeda, hanya dua genotipe yang merespon dan menghasilkan kalus haploid. Perbedaan respon tiap genotipe dengan penanaman 16 genotipe cabai (*Capsicum annum* L.) (Rodeva *et al.*, 2004). Dua genotipe *T. aestivum* menunjukkan perbedaan respon yang signifikan terhadap embriogenesis dan regenerasi tanaman. Terdapat berbagai hasil penelitian lain yang menunjukkan pengaruh genotipe dalam androgenesis diantaranya *Solanum melongena* L. (Ozdemir celik & Onus, 2020), *O. sativa* (Nurhasanah *et al.*, 2015), *C. annum* L. (Shimira *et al.*, 2019) dan pada kultivar lainnya.

Pertumbuhan Polen

Pertumbuhan polen atau serbuk sari dipengaruhi oleh fase pertumbuhan yang responsif terhadap androgenesis. Fase responsif polen terjadi pada tahap pertama mitosis (Ibrahim *et al.*, 2014), namun tiap genotipe memiliki perbedaan dalam fase pertumbuhan polen yang responsif. Pemberian *pre-treatment* pada polen akan memberikan pengaruh yang signifikan dalam meningkatkan fase responsif polen. Seperti pemberian *pre-treatment* suhu panas pada serbuk sari tahapan akhir biseuler mampu menginduksi regenerasi sel menjadi tanaman haploid (Binarova, 1997). Pada anther yang sama atau anther yang berbeda pada bunga yang sama, memiliki potensi ditemukan serbuk sari dengan fase pertumbuhan yang berbeda (Chen, 1985). Pada tanaman gandum, anakan donor yang dikumpulkan adalah ketika mikrospora berada pada tahap pertengahan hingga akhir unin-nukleat (Castillo *et al.*, 2015) namun peneliti lain menerapkan mikrospora uninukleat awal dan pertengahan untuk induksi androgenesis pada kultur anthera gandum (Kanbar *et al.*, 2020).

Tahap perkembangan polen mempengaruhi ploidi pada planlet yang beregenerasi. Planlet yang beregenerasi dari polen pada tahapan tidak berinti, akan menghasilkan planlet haploid, sedangkan planlet dari polen pada tahap binukleat akan beregenerasi membentuk planlet dengan kromosom lebih banyak (Sopory & Munshi, 1996).

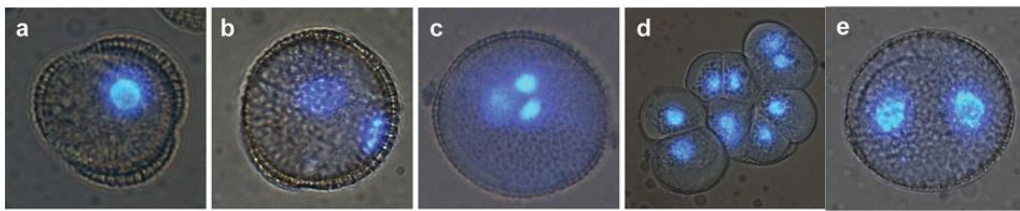
Media Pertumbuhan

Peran penting dalam induksi embriogenesis mikrospora dimainkan oleh komposisi media kultur. Genotipe yang bervariasi membutuhkan media dasar yang sangat berbeda untuk menginduksi pertumbuhan serbuk sari secara *in vitro*. Kebutuhan nutrisi dari kepala sari yang dipotong jauh lebih sederhana dibandingkan dengan mikrospora yang diisolasi (Bajaj, 1990).

Komponen media yang mempengaruhi pertumbuhan mikrospora menjadi sporofit diantaranya adalah komponen zat pengatur tumbuh (zpt), kasein hidrolisat, karbohidrat (terhadap tekanan osmotik dan stres), unsur hara mikro dan makro. Media dasar yang paling umum digunakan untuk kultur anther adalah media N6 (Chu, 1978), media MS dengan berbagai dimodifikasi (Murashige & Skoog, 1962), media Nitsch (Nitsch, 1969), dan media B5 (Gamborg *et al.*, 1968), namun ada juga media dasar yang umum digunakan untuk kultur anthera.

Sukrosa adalah karbohidrat translokasi utama dalam jaringan tanaman, dan merupakan sumber karbon yang paling umum digunakan dalam kultur anthera, biasanya pada tingkat 2–4% (Reinert & Bajaj, 1977). Tingkat sukrosa yang tinggi (6-17%) diperlukan pada spesies tertentu (misalnya Gramineae, Cruciferae) dimana serbuk sari matang dalam kondisi triseluler (Dunwell & Thurling, 1985), sedangkan pada spesies Solanaceae yang serbuk sarinya matang berbentuk biseluler, memerlukan sukrosa pada tingkat yang lebih rendah, seperti 2–5% (Dunwell, 2010).

Kandungan Cu^{2+} dan ion Ag^+ juga tidak kalah penting. Cu^{2+} berperan penting pada fotosintesis, reaksi antioksidan, respirasi metabolik, dan biosintesis hormon. Kelebihan jumlah ion Cu^{2+} akan menjadi racun sehingga harus dipertahankan dibawah kontrol yang tepat. Ion Cu^{2+} pada androgenesis adalah meningkatkan regenerasi hijau yang memiliki kemampuan bertahan lebih baik dibandingkan regenerasi albino (Makowska & Sylwia, 2014).

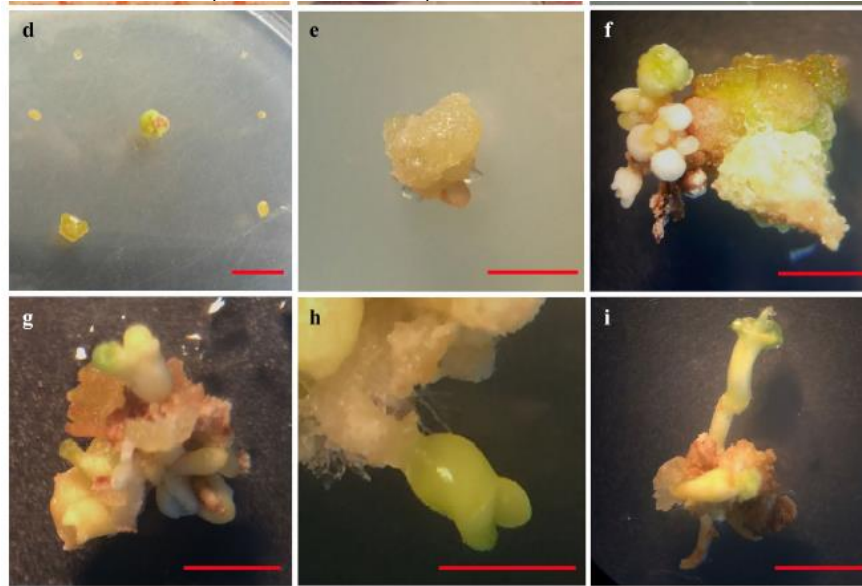


Gambar 4: (a) Mikrospora, (b) Binukleat polen dengan inti vegetatif besar dan generatif kecil, (c) Trinukleat polen dengan inti vegetatif besar dan dua inti sperma kecil, (d) Struktur sporofit *B. napus*, (e) Mikrospora terbagi simetris dengan dua inti (Sumber: Soriano *et al.*, 2013).

Berbeda dengan Ag^+ , ion Cu^{2+} tidak secara langsung memengaruhi jumlah regenerasi hijau pada kultur, tetapi memengaruhi embriogenesis somatik, induksi dan tunas multipikasi, regenerasi dan pengakaran (Orłowska *et al.*, 2019; Wu, 2006; Jha *et al.*, 2007). Dampak positif ion Ag^+ pada produksi regenerasi adalah kemampuan ion Ag^+ untuk menghambat hormon etilen (Efendi, 2005). Konsentrasi ion perak dalam media kultur akan memodulasi organogenesis, meningkatkan frekuensi regenerasi pucuk, regenerasi tanaman hijau, pembentukan embrio, dan mencegah nekrosis kalus, sehingga meningkatkan frekuensi perkembangan dan pertumbuhan kalus embriogenik (Paladi, 2017). Penambahan arang charcoal (AC) juga sering digunakan dalam media kultur. Arang charcoal dapat meningkatkan embriogenesis dari mikrospora jika ditambahkan kedalam media. Efek positif dari penggunaan AC adalah, kemampuan AC dalam menyerap metabolit toksik dari sel non-embriogenik mikrospora (Kott *et al.*, 1988).

Auksin berperan sebagai pemicu peredaan *stress* dalam perkembangan sporofit (Ardebili *et al.*, 2011). Auksin juga terkait dengan siklus seluler seperti pola kelistrikan, pembentukan membran permeabilitas, dan auksin mengikat protein ABPI (Deshpande & Hall, 2000). Penggunaan kombinasi 2,4-D dan perak nitrat

(AgNO₃) pada androgenesis tanaman buncis, menginduksi kalus hingga 30%; penggunaan kombinasi 2,4-D dengan konsentrasi (100 µm) + NAA (100 µm) dalam kultur kelapa dapat meningkatkan produksi kalus dan embrio (Perera *et al.*, 2009). Penggunaan 2,4-D dalam konsentrasi yang berlebihan terutama pada tanaman dikotil akan menghasilkan hormon etilen yang berlebih. Oleh karena itu dengan adanya kombinasi dengan AgNO₃ dapat menghambat produksi hormon etilen sehingga dapat menginduksi embriogenesis pada anther dan memblokir aksi etilen (Grossmann, 2009).



Gambar 5: Embriogenesis mikrospora melalui kultur anther buncis (*Cicer arietinum* L.). (ab) Produksi kalus embriogenik. (cd) Tahap perkembangan embrio yang diinduksi pada permukaan kalus embriogenik. (e) Embrio dewasa turunan dari kotiledon. (f) Perkecambahan embrio dari anther regenerasi.

Kondisi Kultur

Kualitas tanaman donor merupakan salah satu faktor kritis terpenting yang memengaruhi efisiensi androgenesis *in vitro* dalam kultur anthera. Induksi androgenesis memerlukan kondisi kultur yang optimal meliputi lingkungan inkubasi pada suhu 24-27°C dengan paparan intensitas cahaya sekitar 20,001 kali selama 14 jam per hari, namun kondisi kultur dapat bervariasi pada genotipe yang berbeda (Reinert & Bajaj, 1977). Telah ditemukan bahwa cahaya mengatur androgenesis dalam kondisi *in vitro*, Vasil (1973) melaporkan bahwa periode penyinaran pada 12-18 jam; dengan intensitas 5000-10.0001x m²; pada suhu 28°C, dan kultur pada kondisi gelap (12-16 jam) pada suhu 22°C secara bergantian, merupakan kondisi terbaik untuk kultur anther. Contoh lain pada tanaman gandum, umumnya ditanam pada suhu sekitar 18-21 atau 12-15°C (siang/malam) dengan periode penyinaran 12-18 jam dan kelembapan 70-80% (Castillo *et al.*, 2015; Coelho *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019). Cahaya putih berintensitas tinggi memiliki daya penghambatan pada embriogenesis mikrospora, sedangkan kondisi gelap dan intensitas cahaya rendah memiliki efek penghambatan embriogenesis lebih rendah (Reynolds & Crawford, 1997).

Pre-treatment

Kondisi *stress* pada tanaman dibutuhkan untuk regenerasi tanaman hijau melalui androgenesis. *Pre-treatment* yang paling banyak digunakan meliputi suhu, defisiensi sukrosa dan nitrogen, *osmotic stress*, yang dapat memberi pengaruh berbeda antar spesies.

Pre-treatment manitol efektif dalam meningkatkan efisiensi kultur anthera pada gandum (Ayed *et al.*, 2010). Penggunaan suhu dingin (4°C) selama 4 hari, sengatan listrik, sentrifugasi, dan pembiakan anther

pada kondisi tekanan osmotik tinggi (563 mmol) pada media cair, efektif dalam pembentukan akar dan pembentukan *double* haploid pada tanaman buncis (Grewal *et al.*, 2009).

Pemberian perawatan menggunakan suhu dingin dan panas telah banyak dilaporkan dapat meningkatkan pengembangbiakan kultur dalam berbagai spesies. Ma *et al.* (2004) melaporkan dengan penggunaan *pre-treatment* dingin selama 1-4 minggu pada mikrospora gandum dapat meningkatkan induksi kalus yang signifikan. Perlakuan dingin tidak hanya meningkatkan embriogenesis spora, tetapi juga dapat meningkatkan perkecambahan dan pengembangan embrio dari mikrospora *B. napus* dengan tingkat embrio berkecambah (90%) dan perkembangan planlet (58,46%) dari pemaparan suhu 48°C (Gu *et al.*, 2004). Penerapan *pretreat*-dingin pada kultur anther dapat menginduksi sitokeletal dan penataan ulang nuklir di dalam mikrospora. Selain itu juga dapat meningkatkan kadar ABA intraseluler, melindungi mikrospora dari senyawa beracun yang dilepaskan oleh kepala sari yang membusuk, dan meningkatkan porsi ketahanan mikrospora (Shariatpanahi *et al.*, 2006). Kombinasi *stress* panas dan *pratreat*-dingin dapat dikombinasikan dalam penggunaan kultur anther, namun efeknya tidak persis sama pada setiap spesies.

Identifikasi Ploid

Tingkat ploidi dapat lebih mudah dinilai dengan analisis aliran sitometri. Tingkat ploidi juga dapat diperkirakan dengan metode tidak langsung, misalnya berdasarkan jumlah kloroplas dalam sel penjaga stomata dan dimensi plastida (Lee & Hecht, 1975; Qin & Rotino, 1995; Yuan *et al.*, 2009)

Selain haploid dan *double* haploid, keturunan non-haploid yaitu trihaploid, tetraploid, pentaploid, dan heksaploid juga memiliki peluang untuk diregenerasikan (Dunwell, 2010). Nonhaploid muncul karena (1) jaringan somatik dinding anthera, (2) fusi inti, (3) endomitosis dalam butiran serbuk sari, (4) mikrospora tidak teratur yang dibentuk oleh ketidakteraturan meiosis. Oleh karena itu, penting untuk menyelidiki ploidi regeneran untuk pemanfaatan lebih lanjut dalam pemuliaan tanaman.

Karakterisasi regeneran dalam deteksi homozigositas dapat dilakukan dengan analisis isozim, pengujian progeni, dan mikrosatelit (Germana, 2006). Saat ini, telah banyak berkembang penanda DNA polimorfik yang diamplifikasi secara acak (RAPD), polimorfisme panjang fragmen yang diamplifikasi (AFIP), daerah yang diamplifikasi dengan sequens (SCAR), atau pengulangan sequens (SSR).

Teknik isozim memungkinkan jaringan androgenetik dan somatik dibedakan ketika enzim heterozigotik dalam kondisi diploid tanaman donor dan regeneran menunjukkan kekurangan alel. Mikrosatelit juga telah digunakan untuk mengkarakterisasi regeneran yang diperoleh dari kultur anthera jeruk (Germana & Chiancone, 2003)

Keberlanjutan Produksi Tanaman Haploid

Kemajuan teknologi telah dicapai melalui pengujian protokol yang empiris, memakan waktu dan biaya (khususnya media, stres, dan kondisi lingkungan). Kultur anther sudah terbukti sebagai teknik yang baik untuk produksi tanaman haploid dan *double* haploid. Telah diketahui protokol teknik produksi tanaman haploid pada beberapa tanaman, misalnya gandum, padi, jagung, anggur, dan barley.

Para pemulia telah lama menyadari keunggulan teknologi *double* haploid berdasarkan pengetahuan bahwa beberapa aspek teoritis dan praktis dari biologi dan genetika tanaman dapat memanfaatkan teknologi haploidi (Forster & Thomas 2005). Untuk tujuan perbaikan tanaman, galur *double* haploid dikembangkan terutama untuk mencapai homozigositas pada spesies diploid atau allopolyploid, menyelamatkan beberapa generasi dalam program pemuliaan dan menghasilkan kultivar homozigot baru atau galur induk untuk hibrida F1 (Veilleux, 1994).

Double haploid memiliki manfaat dalam perkembangan studi genomik, dalam mengintegrasikan peta genetik dan fisik, sehingga memberikan ketepatan dalam menargetkan gen kandidat (Wang *et al.*, 2001). Selain itu, *double* haploid juga telah menjadi fitur kunci dalam menetapkan peta kromosom pada berbagai spesies, terutama barley, rice rapeseed, dan gandum (Forster & Thomas, 2005).

4. KESIMPULAN

Perkembangan bioteknologi kearah kultur jaringan menjadi jalan pintas dalam perolehan dan peningkatan hasil pertanian yang efisien. Peroleh bahan tanam yang seragam terkait dengan genotip, sifat dan karakter yang diinginkan dapat memanfaatkan teknik kultur tanaman haploid dengan menggunakan bagian mikrospora sebagai gamet jantan yang nantinya akan mengikuti proses meiosis gamet jantan.

Meskipun penerapan embriogenesis serbuk sari tersebar luas dan banyak spesies memberikan respon yang sangat baik terhadap kultur anthera, banyak spesies lain yang masih diamati, dan proses transformasi mikrospora menjadi embrioid serbuk sari masih kurang dipahami. Kultur anther memiliki potensi yang tinggi, namun perlu adanya persiapan dalam pelaksanaan terkait dengan protokol pelaksanaan, sumber eksplan, *pre-treatment*, kondisi lingkungan serta penggunaan media pertumbuhan eksplan.

Dalam beberapa tahun terakhir, penelitian berbasis molekuler embriogenesis mikrospora mendapat manfaat dari pengembangan alat genomik, transkriptomik, proteomik, dan pencitraan yang canggih, dan alat ini kemungkinan besar (dan diharapkan) akan menghasilkan identifikasi banyak gen menarik yang terlibat. Hal ini akan membuka jalan menuju pemahaman yang lebih baik mengenai proses-proses ini dan protokol yang lebih efisien, sehingga memungkinkan penerapan embriogenesis gamet dan teknologi haploid secara efektif dalam pengembangan semua spesies tanaman.

DAFTAR PUSTAKA

- Ardebili, S.H., Shariatpanahi, M.E., Amiri, R., Emamifar, M., Nematzadeh, G., Noori, S.A.S., Oroojloo, M., Heberle-Bors, E. (2011). Effect of 2,4-D as a Novel Inducer of Embryogenesis in Microspores of *Brassica napus* L. *Czech. Journal of Genetics Plant Breeding*. 4(7): 114–122.
- Arsal, A.F. (2018). *Genetika I Arif Memahami Kehidupan*. Badan Penerbit Universitas Negeri Makassar. Makassar-Indonesia.
- Ayed, O.S., de Buyser, J., Picard, E., Trifa, Y., Amara, H.S., (2010). Effect of Pre-treatment on Isolated Microspores Culture Ability in Durum Wheat (*Triticum turgidum subsp. durum* Desf.). *Journal of Plant Breeding Crop Science*. 2: 30–38.
- Bajaj, Y.P.S. (1990). In Vitro Production of Haploids and their use in Cell Genetics and Plant Breeding, Haploids in Crop Improvement I. Chapter, pp 3-44.
- Bhowmik, P., Dirpaul, J., Polowick, P., Ferrie, A.M.R. (2011). A Highthroughput Brassica napus Microspore Culture System: Influence of Percoll Gradient Separation and Bud Selection on Embryogenesis. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 106: 359–362.
- Bilichak, A., Sastry-Dent, L., Sriram, S., Simpson, M., Samuel, P., Webb, S., Jiang, F., & Eudes, F. (2020). Genome Editing in Wheat Microspores and Haploid Embryos Mediated by Delivery of ZFN Proteins and Cell-penetrating Peptide Complexes. *Plant Biotechnology Journal*. 18: 1307-1316.
- Binarova, P., Hause, G., Cenklová, V., Cordewener, J. H., & Campagne, M. L. (1997). A Short Severe Heat Shock is Required to Induce Embryogenesis in Late Bicellular Pollen of *Brassica napus* L. *Sexual Plant Reproduction*, 10: 200-208.
- Cahyamingrum, P. (2015). Mendellion Genetics 2015 Diakses dari <http://staff.uny.ac.id/sites/default/files/pendidikan/paramita-cahyaningrum-kuswandi-msc/2agenetika-mendel.pdf> (diakses tanggal 14 Mei 2024).

- Castillo, A.M., Sanchez-Diaz, R.A., & Valles, M.P. (2015). Effect of Ovary Induction on Bread Wheat Anther Culture: Ovary Genotype and Developmental Stage, and Candidate Gene Association. *Frontiers in Plant Science*, 6: 402.
- Chen, Z. (1985). A Study on Induction of Plants from Citrus Pollen. *Fruit Varieties Journal*. 39 (2): 44-50.
- Cheung, Y.A. (1996). Polen-Pistil Interaction During Polen-Tube Growth. [Review]. *Trends in Plant Science*, 42 (2): 45-50.
- Chu, C. (1978). *The N6 Medium and its Applications to Anther Culture of Cereal Crops*. Proceeding of Symposium Plant Tissue Culture. Science Press, Peking. pp 43–50.
- Coelho, M., Scagliusi, S.M.M., Lima, M., Consoli, L., & Grando, M. (2018). Androgenic Response of Wheat Genotypes Resistant to Fusariosis. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. 53: 575-582.
- Deshpande, S., Hall, J.C. (2000). Auxinic Herbicide Resistance May be Modulated at The Auxin-binding Site in Wild Mustard (*Sinapis arvensis* L.): a Light Scattering Study. *Pestic Biochem Physiol*, 66: 41–48.
- Dunwell, J.M., Thurling, N. (1985). Role of Sucrose in Microspore Embryo Production in *Brassica napus* ssp. *oleifera*. *Journal of Experimental Botany*, 36 (9) :1478–1491.
- Dunwell, J.M. (2010). Haploids in Flowering Plants: Origins and Exploitation. *Plant Biotechnol Journal*, 8:377–424.
- Efendi, D. (2005). Genetic Engineering to Control Postharvest Problems: Review. *Bulletin Agrohorti*, 33 (2): 49 – 56.
- Forster, B.P., Thomas, W.T.B. (2005). Doubled Haploids in Genetics and Plant Breeding. *Plant Breeding Reviews*. 25 : 57–88.
- Gamborg, O. L., Miller, R. A., Ojima, K. (1968). Nutrient Requirement Suspension Cultures of Soybean Root Cells. *Exp Cell Res*. 50 (1): 151–158
- Germana, M.A. (2008). Haploids and Doubled Haploids in Fruit Trees. *Advances in Haploid Production in Higher Plants*. Chapter. pp 241-263.
- Germana, M. A, Chiancone, B. (2003). Improvement of the Anther Culture Protocol in Citrus Clementina Hort. ex Tan. *Plant Cell Report*. 22 (3) :181–187
- Germana, M.A. (2006). Doubled Haploid Production in Fruit Crops. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 86: 131–146.
- Grewal, R.K., Lulsdorf, M., Croser, J., Ochatt, S., Vandenberg, A., Warkentin, T.D., (2009). Doubled-haploid Production in Chickpea (*Cicer arietinum* L.): Role of Stress Treatments. *Plant Cell Report*. 28: 1289–1299.
- Grossmann, K. (2009). Auxin Herbicides: Current Status of Mechanism and Mode of Action. *Pest Management Science*. 66 (2):13–120.
- Gu, H.H., Hagberg, P., Zhou, W.J. (2004). Cold Pretreatment Enhances Microspore Embryogenesis in Oilseed Rape. *Plant Growth Regulation*, 42:137–143.
- Jha, A.K., Dahleen, L.S., Suttle, J.C. (2007). Ethylene Affects the Regeneration of Green Plants from Barley Callus. *Plant Cell Report*, 26 (3): 285-90.

- Kanbar, L.J., Shalish, W., Latremouille, S., Rao, S., Brown, K.A., Kearney, R.E., & Sant'Anna, G.M. (2020). Cardiorespiratory Behavior of Preterm Infants Receiving Continuous Positive Airway Pressure and High Flow Nasal Cannula Post Extubation: Randomized Crossover Study. *Pediatric Research*, 87(1): 62-68.
- Kasha, K.J., Maluszynsky, M. (2003). Production of Doubled Haploids in Crop Plants. An introduction. In: Maluszynsky, M., Kasha, K.J., Forster, B.P., Szaejko, I (eds). *Doubled Haploid Production in Crop Plants A manual*. Kluwer/FAO-IAEA, Dordrecht/Vienna, pp 1–4
- Kott, L.S., Polsoni, L. & Beversdorf, W.D. (1988). Cytological Aspects of isolated Microspore Culture of *Brassica napus*. *Canadian Journal of Botany*, 66: 1658–1664.
- Laimer, M., & Waltraud, R. (2003). *Plant Tissue Culture: 100 years since Gottlieb Haberlandt*. Springer-Verlag Wien. Austria
- Lee, L.P., Hecht, A. (1975). Chloroplasts of Monoploid and Diploid *Oenothera hookeri*. *American Journal of Botany*, 62 (3): 268–272.
- Zhou ,Lz., Thomas, D. (2018). Friend or foe: Signaling Mechanisms During Double Fertilization in Flowering Seed Plants. *Current Topics in Developmental Biology*, 131: 453-496.
- Ma, R., Guo, Y.D., & Pulli, S. (2004). Comparison of Anther and Microspore Culture in The Embryogenesis and Regeneration of Rye (*Secale cereale*). *Plant Cell Tissue Organ Culture* 76: 147–157.
- Ibrahim, M.A., Koorbanally, N.A., & Islam, M.S. (2014). Anti-Oxidative Activity and Inhibition of Key Enzymes Linked to Type 2 Diabetes (α -glucosidase and α -amylase) by *Khaya senegalensis*. *Acta Pharmaceutica*, 64(3): 311-324.
- Makowska, K., & Sylwia, O. (2014). Albinism in barley androgenesis. *Plant Cell Report*, 33(3): 385–392.
- Maraschin S.F., W. de Priester, H. P. Spaink, M. Wang. (2005). Androgenic Switch: An Example of Plant Embryogenesis from The Male Gametophyte Perspective. *Journal of Experimental Botany*, Volume 56 (417): 1711–1726.
- Meriko, L., & Dahlan, S. (2016). Perkembangan Androecium *Nepenthes Gracilis* Korth. *Jurnal Bioconcetta*, 2(1): 60-68.
- Muniraja, M., Gujjula, V., Mude, L.N., Vadlamudi, V.B., Patan, S.S.V.K. (2018). A Developmental Study on Anther Wall and Polen in *Mangifera indica* L. var. Beneshan (Anacardiaceae). *South African Journal of Botany*, 119: 142–153.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plantarum*. 15:473–497.
- Nitsch, J.P., Nitsch, C. (1969). Haploid Plants From Pollen Grains. *Science*, 163:85–87
- Nurhasanah, N., Sunaryo, W., & Pratama, A.N. (2015). Effect of Genotype and Developmental Stage of Pollen on The Success Anther Culture of Upland Rice Varieties from East Kalimantan. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology., Environmental, Sciences*, 17: 329-340.
- Ozdemir, C.B., Onus, A.N. (2020). Effect of Genotype on Microspore Culture of Eggplant (*Solanum melongena* L.). *Acta Horticulturae*.

- Orłowska, R., Katarzyna, A., Pachota, J.M., Agnieszka, N., Katarzyna, M., Janusz, Z., Piotr, T. B. (2019). Improvement of Anther Cultures Conditions using the Taguchi Method in Three Cereal Crops. *Journal Electronic of Biotechnology*, 43 (1): 8-15.
- Paladi, R.K., Rai, A.N., Penna, S. (2017). Silver Nitrate Modulates Organogenesis in *Brassica juncea* (L.) Through Differential Antioxidant Defenses and Hormone Gene Expression. *Science Horticulturae*; 226: 261-7.
- Perera, P.I.P., Yakandawala, D.M.D., Hocher, V., Verdeil, J.L., Weerakoon, L.K. (2009). Effect of Growth Regulators on Microspore Embryogenesis in Coconut Anthers. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 96 (2) :171–180.
- Qin, X., Rotino, G.L. (1995). Chloroplast Number in Guard Cells as Ploidy Indicator of in Vitro-grown Androgenic Pepper Plantlets. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 41:145–149
- Reinert, J., Bajaj, Y.P.S. (1977). *Anther Culture: Haploid Production and its Significance*. In: Reinert J, Bajaj YPS (eds) *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Springer, Berlin, pp 251–267.
- Ren, J., Wu, P., Trampe, B., Tian, X., Lübberstedt, T., Chen, S. (2017). Novel Technologies in Doubled Haploid Line Development. *Plant Biotechnology Journal*, 15: 1361-1370.
- Reynolds, T.L., Crawford, R.L. (1997). Effects of Light on the Accumulation of Abscisic Acid and Expression of an Early Cysteinelabeled Metallothionein Gene in Microspores of *Triticum Aestivum* During Induced Embryogenic Development. *Plant Cell Report*. 16(7): 458–463.
- Rodeva, V.N., Irikova, T.P., Todorova, V. (2004). Anther Culture of Pepper (*Capsicum annuum* L.): Comparative Study on Effect of The Genotype. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 18 (3): 34-38.
- Sangam, L.D., Anne, B.B., Leena, T., Shivali, S., Hari, D., Upadhyaya, R.O. (2015). Haploids: Constraints and Opportunities in Plant Breeding. *Biotechnology Advances*. 33 (6): 812-829.
- Shape, J.W., Simpson, E. & Parker, B.B. (1986). *Criteria for The Selection and use of Doubled Haploid Systems in Cereal Breeding Programmes*. In Horn, W., Jensen, C.J., Odenbach, W., and Schieder, O. (eds), *Genetic Manipulation in Plant Breeding*. Berlin, de Gruyter, pp. 217-229.
- Shariatpanahi, M.E., Bal, U., Heberle-Bors, E., Touraev, A. (2006). Stresses Applied for The Re-Programming of Plant Microspores Towards in Vitro Embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, 127(4): 519–534.
- Shi, Y.G., Lian, Y., Shi, H.W., Wang, S.G., Fan, H., Sun, D.Z., & Jing, R.I. (2019). Dynamic Analysis of QTLs for Green Leaf Area Duration and Green Leaf Number of Main Stem in Wheat. *Cereal Research Communications*, 47: 250-263.
- Shimira, F., Keles, D., Taskin, H., Abak, K. (2019). The Assessment of Androgenic Response of Two Nematode Resistant Pepper (*Capsicum announ* L.) Genotypes. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science Technology*. 7 (12).
- Sopory, S., Munshi, M. (1996). *Anther Culture*. In: Mohan JM *et al* (eds) *In vitro Haploid Production in Higher Plants*. 1. Kluwer, Dordrecht, pp 145–176

-
- Soriano, M., Li, H., & Boutilier, K. (2013). Microspore Embryogenesis: Establishment of Embryo Identity and Pattern in Culture. *Plant Reproduction*, 26 :181–196.
- Szakacs, E., Barnabás, B. (1988). Cytological Aspects of in Vitro Androgenesis in Wheat (*Triticum aestivum* L.) using Fluorescent Microscopy. *Sexual Plant Reproduction*, 1: 217–222.
- Testillano, P.S., Coronado, M.J., Seguí-Simarro, J.M., Domenech, J., Gonzalez-Melendi, P., Raska, I., Risueno, M.C. (2000). Defined nuclear Changes Accompany The Reprogramming of The Microspore to Embryogenesis. *Journal of Structural Biology*, 129: 223–232.
- Vasil, I.K. (1973). *Plants: Haploid Tissue Cultures*. In: Kruse, P.F., Jr, Patterson, M.K. Jr (eds) *Tissue Cultures Methods and Application*. Academic Press, New York, pp 157–161.
- Veilleux, R.E. (1994). Development of New Cultivars Via Anther Culture. *Hortscience*, 29 (11): 1238–1241.
- Wajdzik, K., Golebiowska, G., Dyda, M., Gawronska, K., Rapacz, M., & Wedzony, M. (2019). The Qtl Mapping of The Important Breeding Traits in Winter Triticale (*X Triticosecale wittm.*). *Cereal Research Communications*, 47: 395-408.
- Wang, H.M, Enns, J.L., Brost, J.M., Orr, T.D., & Ferrie, A.M.R. (2019). Improving The Efficiency of Wheat Microspore Culture Evaluation of Pretreatments, Gradients, and Epigenetic Chemicals. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 139: 589-599.
- Wang, Z., Taramino, G., Yong, D., Liu, G., Tingey, S.V., Miao, G-L., Wang, G-L. (2001). Rice ESTs with Disease-Resistance Gene or Defense-response Gene-Like Sequences Mapped to Regions Containing Major Resistance Genes or QTLs. *Molecular Genetics Genomics*, 265:302–310
- Wu, L.M., Wei, Y.M., Zheng, Y.L. (2006). Effects of Silver Nitrate on Tissue Culture of Wheat Embryos are Not Yet Ripe. *Russian Journal of Plant Physiology*, 53 (4): 530-4.
- Yuan, S., Liu, Y., Fang, Z., Yang, L, Zhuang, M., Zhang, Y., Sun, P. (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*. *Agriculture Sciences in China*, 8: 939–946.