

INDUKSI HAPLOID GANDA PADA PADI JAPONICA (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*), INDICA (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*), DAN HIBRIDA JAPONICA X INDICA

Dian Catur Prayantini¹, Panjisakti Basunanda², dan Rudi Hari Murti²

INTISARI

Kultur anter digunakan untuk mendapatkan galur homozigot secara cepat dan meningkatkan efisiensi seleksi. Japonica secara umum relatif mudah dikulturanterkan, berkebalikan dengan indica yang bersifat rekalsitran. Penelitian ditujukan untuk mendapatkan komposisi media dan praperlakuan yang sesuai untuk kultur anter japonica dan indica, mengetahui pengaruh latar belakang kelompok genetik padi terhadap induksi haploid, dan mengintroduksi sifat responsif terhadap kultur anter dari japonica melalui persilangan ke dalam indica yang rekalsitran. Penelitian dilakukan mulai bulan Januari 2009 sampai dengan Desember 2012 di Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman PT BISI International Tbk, Kediri, Jawa Timur. Sembilan genotipe digunakan sebagai sumber anter pada penelitian yang mewakili japonica, indica dan F₁ hasil japonica dengan indica.

Praperlakuan malai pada suhu 4⁰C selama 8 hari, menggunakan modifikasi N6 + NAA 2 ppm + kinetin 0,5 ppm + sukrosa 54 g/L + putrescin 0,1644 g/L + Phytigel 2,5 g/L dapat digunakan pada hibrida hasil persilangan japonica dengan indica. Praperlakuan malai pada suhu 4⁰C selama 9 hari menggunakan media modifikasi N6 + 2,4-D 2,5 ppm + kinetin 0,5 ppm + AgNO₃ 10 ppm + maltosa 40 g/L + Phytigel 2,5 g/L dan modifikasi N6+ 2,4-D 2,5 ppm + kinetin 0,5 ppm + maltosa 50 g/L + AgNO₃ 10 ppm + Phytigel 2,5 g/L dapat digunakan untuk meningkatkan pembentukan kalus pada japonica dan beberapa genotipe indica. Lima galur haploid ganda berhasil diperoleh dari hasil persilangan 'Ciuhao' dan 'Basmati'. Persilangan antara japonica dan indica efektif untuk meningkatkan respon hibrida terhadap media kultur anter dan memiliki peluang lebih tinggi untuk mendapatkan tanaman haploid ganda dibandingkan dengan tetua indica-nya.

Kata kunci : *Oryza sativa* L., kultur anter, haploid ganda

ABSTRACT

Anther culture can be used to obtain homozygous lines and accelerate the efficiency of selection. Japonica is subspecies with high

¹ Mahasiswa S2 Pemuliaan Tanaman UGM

² Staf Pengajar Fakultas Pertanian UGM

anther culturability, while indica is recalcitrance. The research was intended to obtain information of medium composition and pre-treatment that suitable for anther culture in japonica and indica, and to develop the anther culturability using introgression anther culturability from japonica to the indica. The research was conducted from January 2009 until December 2012 in Plant Tissue Culture Laboratory, PT BISI International Tbk, Kediri, East Java. Nine genotypes were used as a source of anthers, represent japonica, indica, and F1 represent japonica x indica.

The results showed that genotype affect double haploid induction through anther culture. Crossing between the two genotypes can give positive results in increasing response in anther culture of F1. Panicle pre-treatment in 4°C for 8 days, using medium consist from modified N6 basal salt + NAA 2 mg/L + kinetin 0,5 mg/L + sucrose 54 g/L + putrescin 0,1644 g/L + Phytigel 2,5 g/L are suitable for japonica and hybrid derived from japonica x indica. Panicle pre-treatment in 4°C for 9 days, using medium consist of modified N6 basal salt + 2,4-D 2,5 mg/L + kinetin 0,5 mg/L + AgNO₃ 10 mg/L + maltose 40 g/L + Phytigel 2,5 g/L and modified N6 basal salt + 2,4-D 2,5 mg/L + kinetin 0,5 mg/L + maltose 50 g/L + AgNO₃ 10 mg/L + Phytigel 2,5 g/L can enhance callus induction in 'Ciuhao' and several genotype of indica. Five doubled haploid lines successfully obtained, crossing between japonica and indica can be effectively conducted to enhance response of hybrid to medium and increase the possibility to obtain doubled haploid line better than its indica parental line.

Key words : *Oryza sativa L., anther culture, doubled haploid*

PENDAHULUAN

Padi merupakan tanaman pangan utama yang menyediakan kebutuhan karbohidrat, energi, protein dan vitamin dari setengah populasi dunia. Kebutuhan akan padi sebagai penghasil beras terus mengalami kenaikan seiring dengan laju pertumbuhan penduduk dunia, pada tahun 2050 diprkirakan kebutuhan akan beras meningkat menjadi 781 juta ton seiring dengan penambahan penduduk dunia sebesar 9.3 miliar (Nguyen, 2009). Peningkatan konsumsi penduduk dunia akan beras harus diikuti dengan kegiatan pengembangan dan pemuliaan tanaman yang terpadu baik secara konvensional maupun inkonvensional melalui pemanfaatan bioteknologi tanaman.

Bioteknologi tanaman dapat membantu mempercepat program pengembangan tanaman, salah satunya melalui teknik kultur anter. Kultur anter merupakan salah satu teknik yang dapat digunakan pada program pemuliaan tanaman dengan tujuan untuk mendapatkan galur homozigot dan meningkatkan efisiensi seleksi secara cepat. Regenerasi tanaman haploid dari anter yang dikulturkan diikuti dengan penggandaan kromosom, dapat menghasilkan galur murni atau tanaman haploid ganda, selain juga memberikan peluang untuk mempercepat waktu bagi perakitan galur *inbreed* yang biasanya diperoleh melalui beberapa siklus inbreeding (Silva, 2010).

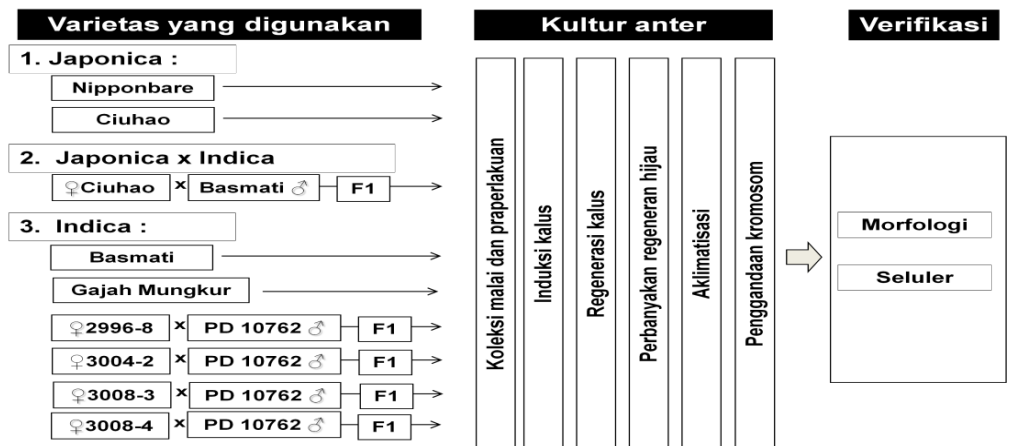
'Nipponbare' dan 'Gajah Mungkur' merupakan tanaman model untuk japonica dan indica yang memiliki kemampuan mudah untuk dikultur anter (Sasmita, 2008). 'Ciuhao' termasuk padi tipe japonica yang memiliki karakter daun bendera tegak, bulir banyak, dan bentuk bulir bulat sedangkan Basmati yang termasuk dalam tipe indica memiliki karakter daun bendera terkulai, panjang, dan tidak seragam dengan bentuk bulir pipih panjang. Persilangan antara kedua kultivar dilakukan untuk tujuan mendapatkan keturunan yang memiliki gabungan sifat kedua tetua. Persilangan antara japonica dengan indica menggunakan empat somaklon hasil penelitian induksi keragaman somaklonal yang memiliki keunggulan umur genjah, produksi tinggi, dan tahan hawar daun bakteri, dan galur PD 10762 yang bersifat tahan terhadap wereng batang coklat. Kultur anter pada keturunan pertama hasil persilangan ditujukan untuk mempercepat tahap seleksi untuk mendapatkan galur haploid ganda.

Penelitian ini ditujukan untuk mendapatkan informasi mengenai komposisi media dan praperlakuan yang sesuai untuk kultur anter padi japonica dan indica, mengetahui pengaruh genetik padi pada keberhasilan induksi haploid, dan mengintroduksi sifat padi japonica yang responsif terhadap kultur anter melalui persilangan ke dalam padi indica

yang rekalsitrasi sehingga dapat meningkatkan keberhasilan mendapatkan individu haploid ganda dengan latar belakang indica.

METODE PENELITIAN

Alat yang digunakan untuk kegiatan kultur jaringan adalah *laminar air flow* (ESCO, Singapore), pinset dan scalpel, cawan petri, botol dan tabung kultur, dan rak kultur. Kegiatan pembuatan media kultur jaringan menggunakan alat autoklaf, timbangan analitik, dan pH meter (CyberScan pH 1100, Eutech, Singapore). Pengamatan selular menggunakan mikroskop inversi (Olympus IX51, Japan) untuk mengamati perkembangan mikrospora dan *flowcytometer* (Attune Acoustic Focusing Cytometer, Applied Biosystem, USA) untuk menganalisa ploidi. Sedangkan bahan yang digunakan yaitu anter dari Ciuhao, Basmati, dan anter dari F1 hasil persilangan antara Ciuhao dan Basmati. Alkohol 70% dan larutan pemutih komersial (BayclinTM) digunakan sebagai bahan sterilisasi benih. Kegiatan kultur jaringan menggunakan media dasar N6 (Chu *et al.*, 1975) dan MS (Murashige dan Skoog, 1962). Modifikasi dilakukan dengan penambahan hormon 2,4-D, kinetin, BAP, NAA, dan IAA. Bahan kimia dan hormon yang digunakan pada kegiatan kultur jaringan adalah dari Sigma (St. Louis, Missouri, USA).



Gambar 1. Tahapan penelitian

Kegiatan penelitian induksi haploid ganda pada padi japonica (*Oryza sativa* L.ssp.japonica), indica (*Oryza sativa* L.ssp.indica) dan hibrida japonica-indica terdiri dari tiga kegiatan utama yaitu penanaman, tahapan *in vitro*, dan verifikasi (Gambar 1).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan japonica memiliki kemampuan untuk dikulturkan lebih baik dibandingkan indica, kultur anter F₁ hasil persilangan antara japonica dengan indica menunjukkan adanya heterosis. 'Nipponbare' dan 'Gajah Mungkur' digunakan sebagai tanaman model untuk praperlakuan malai dan media yang digunakan pada tahap induksi kalus dan regenerasi karena kedua varietas tersebut memiliki respon mudah untuk dikultur anter. Komposisi media dasar N6 yang telah dimodifikasi oleh Chu *et al.* (1975) pada konsentrasi mio inositol, asam nikotinat, piridoksin HCl, dan tiamin HCl digunakan sebagai media dasar pada tahap induksi kalus, media dasar N6 telah banyak digunakan untuk menginduksi kalus pada kegiatan kultur anter padi japonica.

Hasil penelitian pada japonica memperlihatkan bahwa komposisi media induksi kalus berpengaruh terhadap jumlah kalus yang terbentuk. Secara umum japonica diketahui memiliki respon di tahap *in vitro* lebih baik dibandingkan indica, akan tetapi bila menggunakan komposisi media yang kurang sesuai, maka jumlah kalus yang terbentuk juga akan berkurang. 'Ciuhao' memperlihatkan respon yang lebih baik bila menggunakan maltosa sebagai sumber karbon pada media induksi kalus (Tabel 1.). Penggunaan maltosa dikombinasikan dengan AgNO₃ dapat meningkatkan persentase jumlah kalus yang terbentuk hingga tiga kali lipat (10% meningkat menjadi 32%). Maltosa berperan penting pada androgenesis dikarenakan maltosa dapat menjaga kestabilan osmosis pada media kultur, sedangkan sukrosa dapat memplasmolisis mikrospora. Maltosa memiliki kemampuan untuk mendegradasi glukosa secara lambat dibandingkan sukrosa, sehingga

mampu menginduksi kalus lebih baik dibandingkan sukrosa (Xie *et al.*, 1995; Scott and Lyne, 1994; Last and Brettell, 1990).

Tabel 1. Data percobaan komposisi media induksi kalus 'Ciuhao'

Varietas	Praperlakuan Malai	Media	Jumlah anter yang dikulturkan	Jumlah kalus yang terbentuk	Persentase kalus yang terbentuk (%)
'Ciuhao'	9 hari, 4 ^o C	kontrol	100	5	5
		1	100	21	21
		2	100	2	2
		3	100	4	4
		4	100	32	32

Keterangan: **Kontrol** = NAA 2 ppm + sukrosa 54 g/L + putrescin 0,1644 g/L, **media 1** = 2,4-D 2,5 ppm + AgNO₃ 10 ppm + maltosa 40 g/L, **media 2** = 2,4-D 2,5 ppm + AgNO₃ 10 ppm + sukrosa 54 g/L, **media 3** = NAA 2 ppm + maltosa 40 g/L + putrescin 0,1644 g/L, **media 4** = 2,4-D 2,5 ppm + maltosa 50 g/L + AgNO₃ 10 ppm.

Perlakuan suhu dingin yang semula 8 hari perlakuan, pada percobaan kedua digunakan 9 hari perlakuan. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa perpanjangan praperlakuan suhu dingin efektif untuk menginduksi perkembangan mikrospora menjadi kalus. Hasil ini sesuai dengan hasil penelitian Trejo-Tapia (2002), praperlakuan suhu dingin yang dilanjutkan dengan penanaman anter pada komposisi media dengan konsentrasi auksin dan sumber karbon sesuai dengan kebutuhan yang diinginkan oleh genotipe, dapat meningkatkan persentase kalus.

Hasil penelitian pada indica menunjukkan bahwa sifat rekalsitran padi indica dapat terlihat pada sedikitnya jumlah kalus yang terbentuk, kemampuan untuk diregenerasikan yang rendah dan tingginya jumlah tanaman albino yang terbentuk, hal ini sesuai dengan hasil penelitian Roy dan Mandal (2005). Komposisi media yang digunakan semula sama dengan yang digunakan oleh Dewi *et al.* (2004), hasil yang diperoleh persentase pembentukan kalus sangat sedikit, dari empat nomor yang digunakan, persentase pembentukan kalus tertinggi hanya 0,04%. Persentase pembentukan kalus dapat ditingkatkan menjadi 0,4% hingga 10,4% menggunakan empat komposisi media seperti yang dilakukan di japonica,

akan tetapi tidak semua genotipe memberikan respon yang sama terhadap media, genotipe yang cukup responsif hanya F₁ hasil persilangan 3008_3 dengan PD 10762 (Tabel 2).

Hasil penelitian kultur anter pada F₁ hasil persilangan 'Ciuhao' dengan 'Basmati' menunjukkan bahwa kultur anter F₁ hasil persilangan japonica dengan indica memberikan respon lebih baik dibandingkan kultur anter japonica dan indica pada tahap pembentukan kalus dan regenerasi (Gambar 2). Respon tersebut diduga disebabkan karena adanya heterosis pada F₁ sehingga mampu memberikan respon lebih baik dibandingkan kedua tetua (Xu-ming *et al.*, 2009). Diperoleh dua kelompok tanaman haploid dan tiga kelompok tanaman haploid ganda spontan. Tanaman haploid yang diperoleh pada aklimatisasi pertama selanjutnya diinduksi menggunakan perendaman kolkisina 1500 ppm selama 10 jam (Tabel 3).

Benih yang diperoleh dari hasil aklimatisasi selanjutnya ditanam untuk mendapatkan haploid ganda generasi pertama (HG₁). Verifikasi morfologi pada aklimatisasi pertama dilakukan dengan mengamati karakter tinggi tanaman, ada tidaknya ligula dan aurikula, jumlah anakan, dan sterilitas tanaman pada masing-masing individu tanaman di tiap kelompok, sedangkan verifikasi seluler untuk mengetahui tingkat ploidi dilakukan dengan mengambil sampel daun baik tanaman yang diduga haploid ganda spontan maupun tanaman hasil induksi menggunakan kolkisin. Analisis ploidi menggunakan tetua sebagai kontrol perlakuan dan IR36 sebagai kontrol diploid (Gambar 3 dan 4). Karakterisasi morfologi dilakukan pada lima kelompok tanaman HG₀ baik yang spontan maupun hasil induksi kolkisina. Dari hasil karakterisasi morfologi, dapat diketahui bahwa lima nomor tanaman kandidat haploid ganda memiliki gabungan sifat dari kedua tetua.

Tabel 2. Data tahap induksi kalus pada indica

Nomor/varietas	Praperlakuan Malai	Media	Jumlah anter dikulturkan	Jumlah kalus terbentuk	Presentase kalus terbentuk (%)
Tahap 1					
♀2996 x 10762♂	8 hari, 4 ⁰ C	kontrol	2500	1	0,04
♀3004_2 x10762♂	8 hari, 4 ⁰ C	kontrol	5000	1	0,02
♀3008_3 x10762♂	8 hari, 4 ⁰ C	kontrol	6875	3	0,04
♀3008_4 x10762♂	8 hari, 4 ⁰ C	kontrol	5750	0	0
'Basmati'	8 hari, 4 ⁰ C	kontrol	1900	0	0
Tahap 2					
♀2996 x 10762♂	9 hari, 4 ⁰ C	kontrol	250	2	0,8
		1	250	6	2,4
		2	250	0	0
		3	250	0	0
		4	250	7	2,8
♀3004_2 x10762♂	9 hari, 4 ⁰ C	kontrol	250	1	0,4
		1	250	0	0
		2	250	0	0
		3	250	0	0
		4	250	0	0
♀3008_3 x10762♂	9 hari, 4 ⁰ C	kontrol	250	0	0
		1	250	26	10,4
		2	250	10	4
		3	250	10	4
		4	250	9	3,6
♀3008_4 x10762♂	9 hari, 4 ⁰ C	kontrol	250	2	0,8
		1	250	0	0
		2	250	0	0
		3	250	2	0,8
		4	250	2	0,8
'Gajah Mungkur'	9 hari, 4 ⁰ C	kontrol	250	5	2
		1	250	4	1,6
		2	250	0	0
		3	250	0	0
		4	250	0	0
'Basmati'	9 hari, 4 ⁰ C	kontrol	250	0	0
		1	250	0	0
		2	250	0	0
		3	250	0	0
		4	250	1	0,4

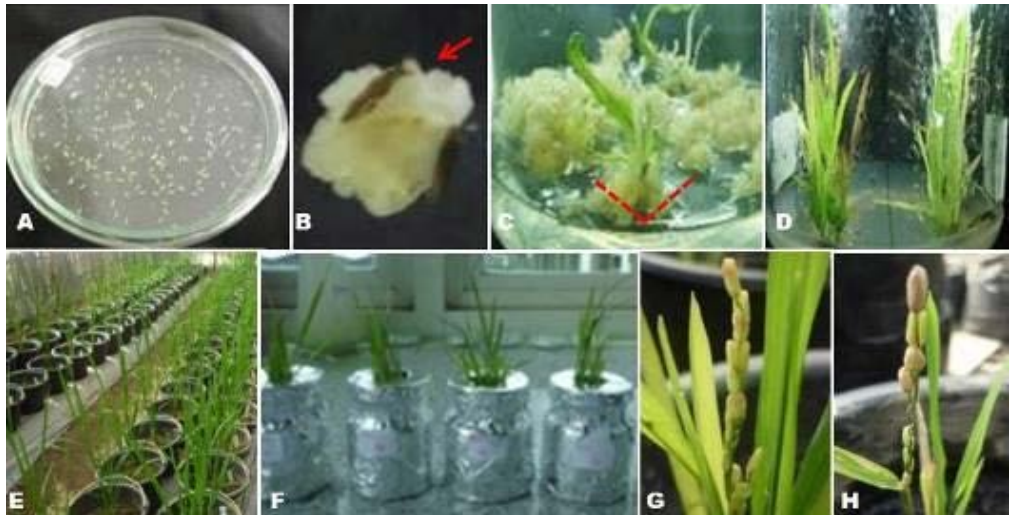
Keterangan : **Kontrol** = NAA 2 ppm + sukrosa 54 g/L + putrescin 0,1644 g/L, **media 1** = 2,4-D 2,5 ppm + AgNO₃ 10 ppm + maltosa 40 g/L, **media 2** = 2,4-D 2,5 ppm + AgNO₃ 10 ppm + sukrosa 54 g/L, **media 3** = NAA 2 ppm + maltosa 40 g/L + putrescin 0,1644 g/L, **media 4** = 2,4-D 2,5 ppm + maltosa 50 g/L + AgNO₃ 10 ppm.

Tabel 3. Data kultur anter 'Ciuhao' , ' Basmati' dan hasil persilangannya

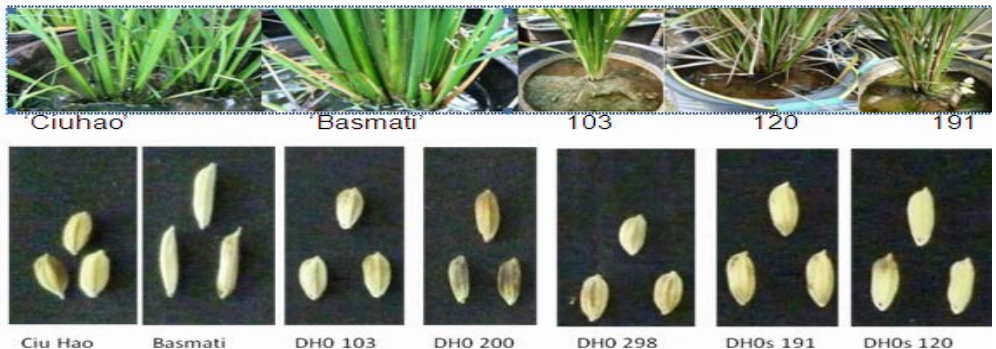
Tahap perkembangan	Nipponbare	Ciuhao	Basmati	♀Ciuhao x Basmati♂
1. Induksi kalus				
Praperlakuan malai	8 hari, 4 ⁰ C	8 hari, 4 ⁰ C	8 hari, 4 ⁰ C	8 hari, 4 ⁰ C
Anter yang dikulturkan	400	200	1900	5082
Kalus yang terbentuk	12	10	0	794
Persentase kalus (%)	3	5	0	15,62
2. Regenerasi				
Kalus embriogenik	40	27	0	51
Regeneran hijau	241	15	0	34
Presentase regeneran (%)	602,50	55,55	0	66,67
Albino	56	1	0	17
3. Perbanyakkan regeneran				
Planet yang terbentuk	124	323	0	305
4. Aklimatisasi HGO				
Tanaman yang diaklimatisasi	10	10	0	169
Tanaman yang tumbuh normal	10	10	0	29
Tanaman haploid ganda spontan	0	0	0	15
Tanaman haploid	10	10	0	15

Keterangan : Media induksi kalus menggunakan media dasar N6 dengan modifikasi + NAA 2 ppm + kinetin 0,5 ppm + sukrosa 54 g/L + putrescin 0,16 g/L + Phytigel 2,5 g/L. Media regenerasi menggunakan media dasar MS dengan modifikasi + NAA 0,5 ppm + kinetin 2 ppm + sukrosa 30 g/L + Phytigel 2,5 g/L.

Verifikasi seluler dilakukan dengan menganalisis tingkat ploidi dari lima kandidat tanaman haploid ganda dibandingkan dengan tetua ('Ciuhao' dan 'Basmati'). Histogram masing-masing kelompok tanaman, dua nomor haploid ganda spontan dan tiga nomor hasil induksi menggunakan kolkisin, menunjukkan bahwa kelima nomor tersebut merupakan tanaman haploid ganda. (Gambar 4 dan 5).



Gambar 2. Tahap kultur anter hasil persilangan ‘Ciuhao’ dengan ‘Basmati’. A.B: induksi kalus; C: regenerasi kalus; D: perbanyakan ; E. aklimatisasi ; F: perlakuan kolkisin ; G: tanaman haploid ; H: tanaman haploid ganda.



Gambar 3. Keragaman morfologi regeneran haploid ganda. A. Bentuk kaki batang dibandingkan tetua. B. Bentuk biji tetua (‘Ciuhao’ dan ‘Basmati’) dibandingkan biji lima kandidat tanaman haploid ganda.

Genotipe memberikan pengaruh nyata terhadap hasil induksi haploid ganda menggunakan kultur anter. Pada penelitian ini diketahui ‘Basmati’, tipe indica,

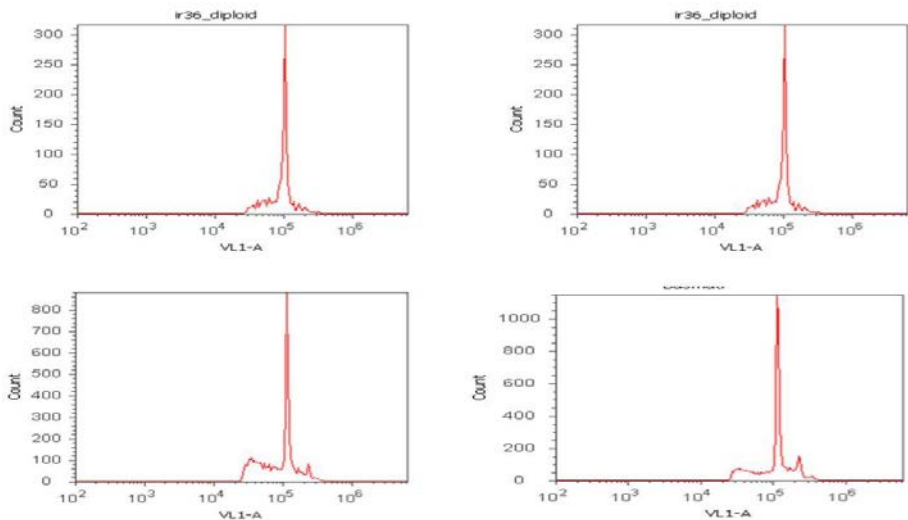
bersifat rekalsitran, sehingga respon anter di tahap induksi kalus sangat rendah, dari 1900 anter yang dikulturkan, tidak ada satu pun kalus yang bisa diinduksi. Sementara ‘Ciuhao’, tipe japonica, yang digunakan

sebagai tetua betina memiliki respon yang baik (*high culturability*) di tahap induksi kalus. Di tahap induksi kalus, persentase kalus yang terbentuk lebih tinggi dibandingkan tanaman model ('Nipponbare'). 'Ciuhao' memberikan pengaruh yang positif pada tahap induksi kalus, regenerasi dan aklimatisasi pada kultur anter F₁ hasil persilangan 'Ciuhao' dan 'Basmati'. Data yang diperoleh di tahap *in vitro* menunjukkan bahwa japonica memang memiliki respon yang lebih baik di tahap *in vitro* dibandingkan indica. Respon "Basmati yang sangat rendah sesuai dengan hasil penelitian Guiderdoni *et al.* (1992) dan Yan *et al.* (1996), bahwa indica memiliki respon paling rendah bila digunakan sebagai bahan tanam kultur anter, sedangkan japonica merupakan tipe padi yang paling potensial sebagai bahan untuk kultur anter.

Verifikasi morfologi dilakukan pada tiga puluh tanaman yang dapat tumbuh secara normal setelah dilakukan praaklimatisasi di media Yoshida (Yoshida *et al.*, 1976) dan di pindah tanam ke media tanah. Tiga puluh tanaman tersebut berasal dari lima nomor tanaman yang diperbanyak dari lima kalus yang berbeda (Tabel 1). Data verifikasi morfologi menunjukkan adanya perbedaan utama antara tanaman haploid dan haploid ganda. Tanaman haploid memiliki karakter steril, tidak memiliki ligula dan aurikula, anakan banyak, daun sempit, malai berukuran kecil, sedangkan tanaman haploid ganda memiliki karakter seperti tanaman diploid (Zepata-Arias, 2003). Hasil verifikasi morfologi menunjukkan lima belas tanaman dari tiga nomor (nomor 120, 191 dan 200) merupakan tanaman haploid ganda spontan, sedangkan lima belas tanaman dari dua nomor merupakan tanaman haploid (nomor 103 dan 298). Raturan dilakukan untuk menginduksi haploid ganda secara alami, akan tetapi setelah dilakukan tiga kali raturan, kedua nomor tanaman masih haploid sehingga dilakukan penggandaan kromosom menggunakan perendaman kolkisin. Perendaman selama 10 jam menggunakan kolkisin 1500 ppm pada plantlet yang haploid efektif untuk menggandakan kromosom dari haploid menjadi haploid ganda.

Selain mengamati tingkat ploidi berdasarkan morfologi tanaman, pengamatan terhadap karakter tanaman yang memiliki gabungan sifat dari kedua tetua juga dilakukan. Penggabungan sifat dari kedua tetua dapat terlihat pada bentuk benih dari lima nomor tanaman yang diamati (Gambar 3). Penelitian ini merupakan penelitian awal, untuk mengetahui kestabilan sifat, verifikasi morfologi akan dilakukan sampai dengan generasi ketiga (HG3). Verifikasi seluler dilakukan dengan mengukur kadar DNA inti (*nuclear DNA content*) menggunakan *flow cytometry*. Histogram dari kadar DNA inti pada tetua (Ciuhao dan Basmati) sama dengan kontrol diploid IR36, sedangkan pada nomor 103 haploid, kadar DNA inti kurang dari nilai kadar DNA inti pada diploid. Setelah dilakukan penggandaan kromosom menggunakan kolkisin, nilai kadar DNA inti nomor 103 meningkat dan sama dengan histogram diploid. Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Cousin *et al.* (2009) bahwa kadar DNA inti tanaman haploid berukuran setengah dari diploid.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kultur anter bermanfaat untuk menginduksi haploid ganda hasil persilangan japonica dengan indica, dengan waktu lebih cepat dari pemuliaan konvensional.



Experiment Name: AC6_103_8DES2011

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **ir36_diploid**

Name	Event Count	% Parent	% Total	Mean X	Mean Y	Median X	Median Y	Std. Dev. X	Std. Dev. Y	% C.V. X	% C.V. Y	Concentratic
All Events	20,000	---	100.000%	255,678	16,298	195,650	10,519	367,177	90,139	143.61%	553.07%	200.00
R1	1,828	9.140%	9.140%	100,547	5,309	103,111	4,613	44,137	3,698	43.90%	69.66%	18.28

Experiment Name: AC6_103_8DES2011

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **ciuhao**

Name	Event Count	% Parent	% Total	Mean X	Mean Y	Median X	Median Y	Std. Dev. X	Std. Dev. Y	% C.V. X	% C.V. Y	Concentratic
All Events	20,000	---	100.000%	204,479	19,348	142,832	11,937	232,431	36,417	113.67%	188.23%	266.67
R1	3,340	16.700%	16.700%	131,397	20,945	118,580	13,515	36,671	20,613	27.91%	98.42%	44.53

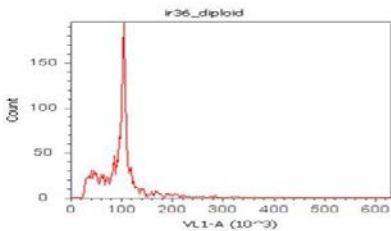
Experiment Name: AC6_103_8DES2011

Specimen Name: **Specimen**

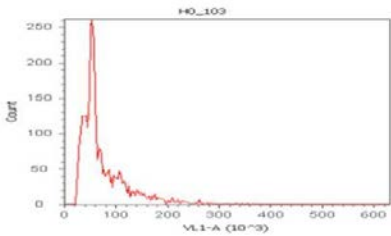
Sample Name: **basmati**

Name	Event Count	% Parent	% Total	Mean X	Mean Y	Median X	Median Y	Std. Dev. X	Std. Dev. Y	% C.V. X	% C.V. Y	Concentratic
All Events	20,000	---	100.000%	201,038	11,077	142,563	6,160	357,623	56,864	177.89%	513.34%	121.21
R1	6,423	32.115%	32.115%	123,742	12,938	118,201	7,958	64,836	14,988	52.40%	115.84%	38.93

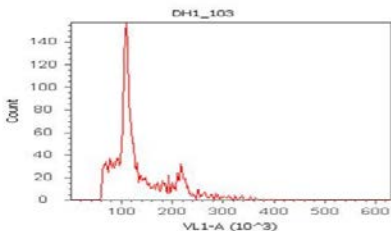
Gambar 4. Hasil analisis ploidi pada ‘Ciuhao’ dan ‘Basmati’ dibandingkan dengan ‘IR36’ sebagai kontrol positif (+) diploid, dengan hasil penghitungan pada *flowcytometer*.



Kontrol Positif (+)



Planlet Haploid (H0)
Sebelum Induksi Kolkisin



Tanaman Haploid Ganda
(HG) setelah induksi kolkisin

Name	Event Count	% Parent	% Total	Mean X	Mean Y	Median X	Median Y	Std. Dev. X	Std. Dev. Y	% C.V. X	% C.V. Y	Concentratik
All Events	20,000	---	100.000%	255,678	16,298	195,650	10,519	367,177	90,139	143.61%	553.07%	200.00
R1	1,828	9.140%	9.140%	100,547	5,309	103,111	4,613	44,137	3,698	43.90%	69.66%	18.28

Parameters: **VL1-A vs Count**
Gate: **R1**
Experiment Name: **AC6_103_8DES2011**
Specimen Name: **Specimen**
Sample Name: **H0_103**

Name	Event Count	% Parent	% Total	VL1-A Mean	VL1-A Medit	VL1-A Std. (VL1-A % C\)	Concentratik
All Events	20,000	---	100.000%	29,022	4,496	115,895	399.33%	387.10
R1	3,050	15.250%	15.250%	69,193	58,335	27,984	40.44%	59.03

Parameters: **VL1-A vs Count**
Gate: **R1**
Experiment Name: **AC6_103_8DES2011**
Specimen Name: **Specimen**
Sample Name: **DH1_103**

Name	Event Count	% Parent	% Total	VL1-A Mean	VL1-A Medit	VL1-A Std. (VL1-A % C\)	Concentratik
All Events	13,429	---	100.000%	37,928	9,897	120,394	317.43%	45.30
R1	2,303	17.149%	17.149%	137,878	115,051	60,484	43.87%	7.77

Gambar 5. Hasil analisis ploidi pada tanaman nomor 103 sebelum dan sesudah induksi kolkisina dibandingkan dengan 'IR36' sebagai kontrol positif (+) diploid, dengan hasil penghitungan pada *flowcytometer*.

KESIMPULAN

Praperlakuan malai pada suhu 4 °C selama 8 hari, induksi kalus menggunakan komposisi media dasar N6 dengan modifikasi + NAA 2 ppm + kinetin 0,5 ppm + sukrosa 54 g/L + putrescin 0,1644 g/L + Phytigel 2,5 g/L dapat digunakan pada hibrida hasil persilangan japonica dengan indica.

Praperlakuan malai pada suhu 4 °C selama 9 hari, induksi kalus menggunakan komposisi media dasar N6 dengan modifikasi + 2,4-D 2.5 ppm + kinetin 0,5 ppm + AgNO3 10 ppm + maltosa 40 g/L + Phytigel 2,5 g/L dan media dasar N6 dengan modifikasi + 2,4-D 2,5 ppm + kinetin 0,5 ppm + maltosa 50 g/L + AgNO3 10 ppm + Phytigel 2,5 g/L dapat digunakan untuk meningkatkan pembentukan kalus pada 'Ciuhao' dan beberapa genotipe indica. Lima galur haploid ganda berhasil diperoleh dari hasil persilangan 'Ciuhao' dan 'Basmati', dua galur didapat dari hasil induksi menggunakan kolkisina dan tiga galur merupakan galur haploid

ganda spontan.

DAFTAR PUSTAKA

- Arumuganathan, K., E.D. Earle. 1991. Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. *Plant Mol. Biol. Rep.* 9: 229-241.
- Cha-um, S., B. Srianan., A. Pichakum., C. Kirdmanee. 2009. An efficient procedure for embryogenic callus induction and double haploid plant regeneration through anther culture of Thai aromatic rice (*Oryza sativa* L. subsp. *Indica*). *In Vitro Cell.Dev.Biol.- Plant.* 45: 171-179.
- Chu, C.C., C.C. Wang., C.S. Sun., C. Hsu., K.C. Yin., C.V. Bi. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen source. *Sci. Sin.*18: 659-668.
- Dewi, I.S., B.S. Purwoko., H. Aswidinnoor., I.H. Somantri. 2004. Kultur antera padi pada beberapa formulasi media yang mengandung poliamin. *Jurnal Bioteknologi Pertanian* 9(1):14-19.
- Guiderdoni, E., E. Galinato.,J. Luistro., G. Vergara. 1992. Anther culture of tropical japonica 9 indica hybrids of rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica* 62: 219–224.
- Last, D.I., R.I.S. Brettell. 1990. Embryo yield in wheat anther culture is influenced by the choice of sugar in the culture medium. *Plant Cell Rep* 9: 14-16.
- Lentini, Z., P. Reyes., C.P. Martinez., W.M. Roca. 1995. Androgenesis of highly recalcitrant rice genotypes with maltose and silver nitrate. *Plant Sci.* 110: 127- 138.
- Murashige, T., F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15(3): 473-497.
- Nguyen, N.V. 2009. Ensuring food security in the 21st century with hybrid rice: issues and challenges. *In: Xie, F. Hardy, B. (Eds.). Accelerating Hybrid Rice Development. The 5th International Symposium Hybrid Rice. Los Banos (Philippines): International Rice Research Institute. p.9-24.*
- Roy, B., A.B. Mandal. 2005. Anther culture response in indica rice and variations in major agronomic characters among androclones of a scented cultivar, Karna local. *Afr J Biotechnol* 4(3): 235–240.
- Sasmita, P. 2008. Daya kultur antera genotipe padi sawah *Oryza sativa* L. subsp. *indica*. Pros. Seminar Nasional Sains. Peran Sains dalam Kebangkitan Pertanian. Fakultas MIPA IPB, Bogor.
- Scott, P., R.L. Lyne. 1994. Initiation of embryogenesis from cultured barley microspore: a further investigation into the toxic effect of sucrose and glucose. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 37:61-65.

- Silva, T.D. 2010. Indica rice anther culture: can the impasse be surpassed. *Plant Cell Tissue and Organ Cult* 100: 1-11.
- Trejo-Tapia, G., U.M. Amaya, G.S. Morales, A.D.J. S´anchez, B.M. Bonfil, M. Rodr´ıguez-Monroy, A. Jim´enez-Aparicio. 2002. The effects of cold- pretreatment, auxins and carbon source on anther culture of rice. *Plant Tiss Organ Cult.* 71: 41-46.
- Xie, J.H., M. Gao., Q. Cai., X. Sheng., Y. Shen., Z. Liang. 1995. Improved isolated microspore culture efficiency in medium with maltose and optimized growth regulator combination in japonica rice (*Oryza sativa*). *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 42: 245-250.
- Xu-ming, X., L. Kang-jing., Z. Shou-gang., S. Wei., Z. Ying-ying., W. Xin-yu., K. Bei. 2009. Analysis of indica-japonica differentiation in rice parents and derived lines using ILP markers. *Agricultural Sciences in China.* 8(12): 1409-1418.
- Yamagishi, M., M. Otani., M. Higashi., Y. Fukuta., K. Fukui., M. Yano., T. Shimada. 1998. Chromosomal regions controlling anther culturability in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica.* 103: 227-234.
- Yan, J., Q. Xue., J. Zhu. 1996. Genetic studies of anther culture ability in rice (*Oryza sativa*). *Plant Cell Tissue and Organ Cult* 45: 253–258.
- Yoshida, S., Forno, D.A., Cock, J.H. and K.A. Gomez. 1976. *In: Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice.* 3rd edition. IRRI. Los Banos, Philippines. p.83.
- Zepata-Arias, F.J. 2003. Laboratory protocol for anther culture technique in rice. *In: Maluszynski M.; Kasha K. J.; Forster B. P.; Szarejko I (Eds).* Double haploid production in crop plants: a manual. Kluwer, Dordrecht (The Netherlands): 109–116.