

EMBRYO CULTURE

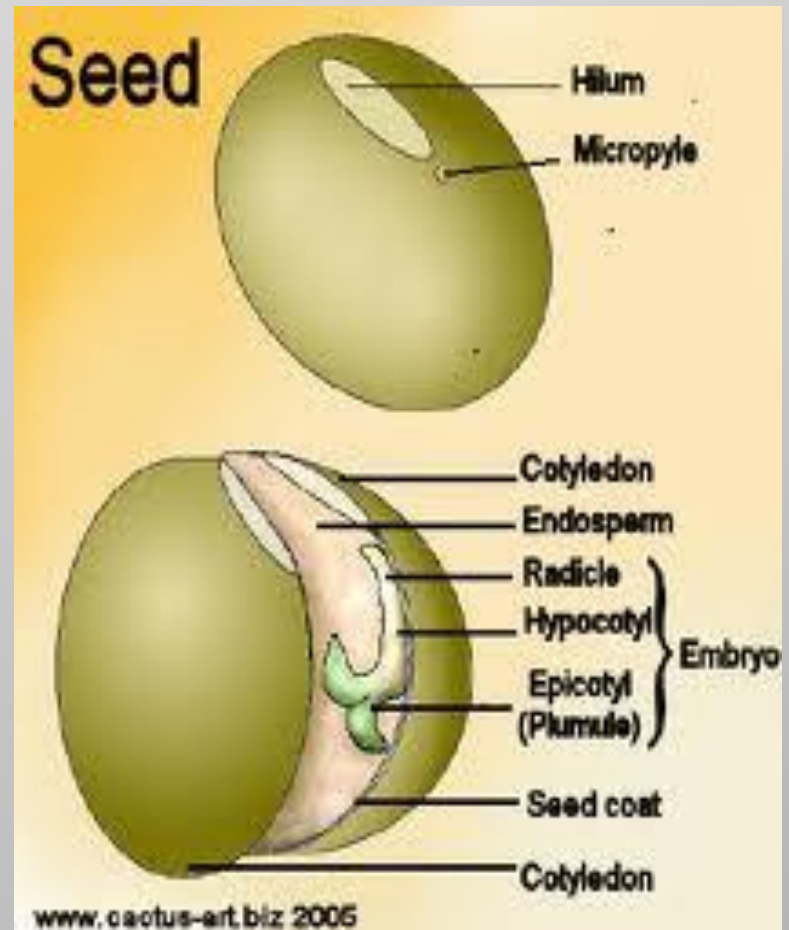
Paramita Cahyaningrum Kuswandi

(email :paramita@uny.ac.id)

FMIPA UNY

2012

- ▶ **Kultur embrio :**
pengambilan embrio dari biji dan mengecambahkan dalam kondisi aseptik.
- ▶ **Tujuan utama :**
untuk ‘menyelamatkan’ embrio yang kemungkinan besar gugur atau mati sebelum buah menjadi matang



Latar belakang

- ▶ Kadang embrio tumbuhan gugur (abort) sebelum berkembang
- ▶ Untuk meningkatkan keberhasilan pertumbuhan embrio maka dilakukan kultur embrio
- ▶ Penyelamatan embryo disebut dengan **embryo rescue**

Faktor–faktor penyebab keguguran embrio

- ▶ Inkompatibilitas antar spesies atau genus
Contoh kasus : Interspecific hybridization (persilangan antar spesies) yang terlihat berhasil tetapi dalam fase lanjut embrio tidak berkembang
- ▶ Inkompatibilitas antara pistil dan stigma yang mempengaruhi perkembangan pollen tube
- ▶ Fertilisasi terjadi tetapi embrio tetap abort. Kemungkinan karena faktor lingkungan.

Terdapat 2 macam kultur embrio

1. Kultur embrio dari biji yang masih muda.
Biasanya dilakukan untuk menyelamatkan embrio pada fase awal perkembangannya. Kultur ini sulit dilakukan karena embrio masih membutuhkan nutrisi yang kompleks dan harus dicukupi dalam media kultur



2. Kultur embrio dari biji yang sudah tua (matang). Teknik ini lebih mudah dan biasanya dilakukan untuk mempercepat pertumbuhan embrio menjadi bibit. Media yang digunakan lebih sederhana

Contoh : menginduksi perkecambahan pada biji yang dorman sehingga memperpendek siklus pemuliaan tanaman



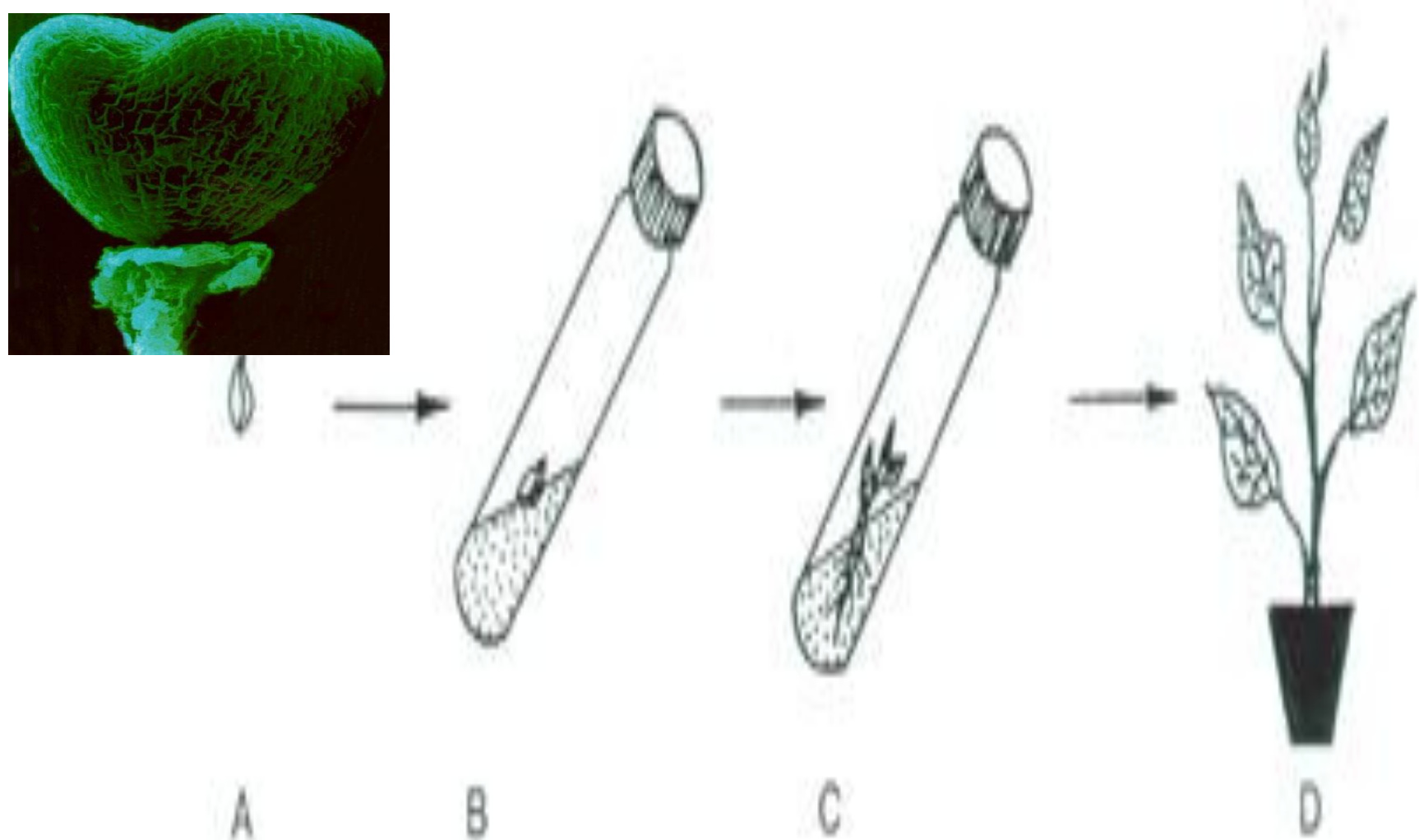
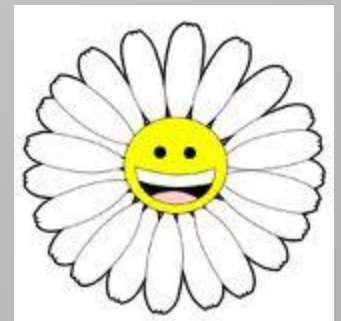


FIG. 8.4. Embryo culture. (A) Proembryo dissected 3 to 5 days after pollination. (B) Proembryo cultured on solid agar medium. (C) Plantlet developing from embryo. (D) Plantlet transplanted into soil.

Teknik

- ▶ Untuk kultur embrio biasanya tidak ada masalah dengan sterilisasi
- ▶ Permasalahan muncul saat pengambilan embrio. Embrio yang masih sangat muda sulit untuk diambil tanpa merusak jaringan
- ▶ Teknik pengambilan embrio tergantung pada spesies tanaman yang digunakan



Kenapa gagal....?

- ▶ Pada tahun 1969, Lange mengisolasi 1888 embrio barley dan hanya menghasilkan 201 bibit
- ▶ Penyebab rendahnya viabilitas tanaman tsbt :
 1. Adanya kontaminasi
 2. Embrio terlalu kecil
 3. Gangguan perkembangan embrio
 4. Kerusakan (biasanya pada biji yang keras)
 5. Kondisi yang belum sesuai untuk pertumbuhan embrio (e.g. media)

Faktor–faktor yang mempengaruhi keberhasilan kultur embrio

1. Genotipe
2. Fase perkembangan embrio
3. Kondisi pertumbuhan tanaman induk
4. Komposisi media
5. Oksigen
6. Cahaya
7. Suhu

1. Genotipe

- ▶ Pada spesies tertentu embrio mudah ditumbuhkan
- ▶ Ada perbedaan antar kultivar dalam satu spesies

2. Fase perkembangan embrio

- ▶ Embrio yang masih sangat muda lebih sulit untuk ditumbuhkan secara in vivo
- ▶ Terdapat teknik untuk embrio yang sangat muda yaitu ditanam berdekatan dengan endosperm (dari biji yang sudah tua), dan jaringan hipokotil

3. Kondisi pertumbuhan tanaman induk

- ▶ Tanaman induk biasanya ditumbuhkan di greenhouse untuk menjaga dalam kondisi yang sehat
- ▶ Tetapi juga dapat tumbuh di lahan kemudian dipindah ke kondisi yang terkontrol
- ▶ Pertumbuhan tanaman induk harus bagus untuk menghasilkan pertumbuhan endosperm dan embrio yang bagus
- ▶ Kadang tanaman diberi giberelin untuk meningkatkan ukuran embrio

4. Komposisi media

- ▶ Embrio yang belum berkembang membutuhkan komposisi media yang lebih kompleks
- ▶ Elemen makro dan mikro sangat dibutuhkan
- ▶ pH 5–6
- ▶ Gula dibutuhkan untuk sumber energi, untuk embrio yang sudah berkembang 2–3 % dan untuk embrio yang masih sangat muda 8–12 %
- ▶ Agar 0,6–0,8 %

- ▶ ZPT auksin dan sitokinin biasanya tidak digunakan karena akan menginduksi kalus
- ▶ Vitamin juga kadang dibutuhkan
- ▶ Ada beberapa spesies yang bisa tumbuh dengan penambahan zat alami seperti air kelapa dan ekstrak malt

5. Oksigen

- ▶ Kebutuhan oksigen untuk embrio yang ditanam in vitro lebih banyak

6. Cahaya

- ▶ Kadang pada tahap awal embrio ditumbuhkan dalam kondisi gelap selama 7–14 hari
- ▶ Kemudian dipindah ke tempat yang terang untuk pembentukan klorofil

7. Suhu

- ▶ Suhu optimum untuk pertumbuhan embrio sangat tergantung pada spesies tanaman
- ▶ Biasanya 22–28 °C
- ▶ Tapi ada spesies yang perlu suhu rendah misal lily dengan suhu 17 °C
- ▶ Atau suhu 4 °C untuk memecah dormansi

Aplikasi kultur embrio

1. Membantu perkecambahan yang sulit
Pada spesies tertentu perkecambahan sulit terjadi secara in vivo sehingga kultur embrio dilakukan untuk terjadinya perkecambahan.
e.g. Colocasia esculenta, Musa balbisiana, Pinus sp.
2. Perkecambahan biji tanaman parasit, yang tanpa tanamna inang tidak dapat berkecambah

3. Pemendekan siklus breeding

Untuk mematahkan dormansi biji atau mempercepat proses perkecambahan sehingga mempercepat siklus hidup.

e.g. mawar, kelapa sawit, bunga iris

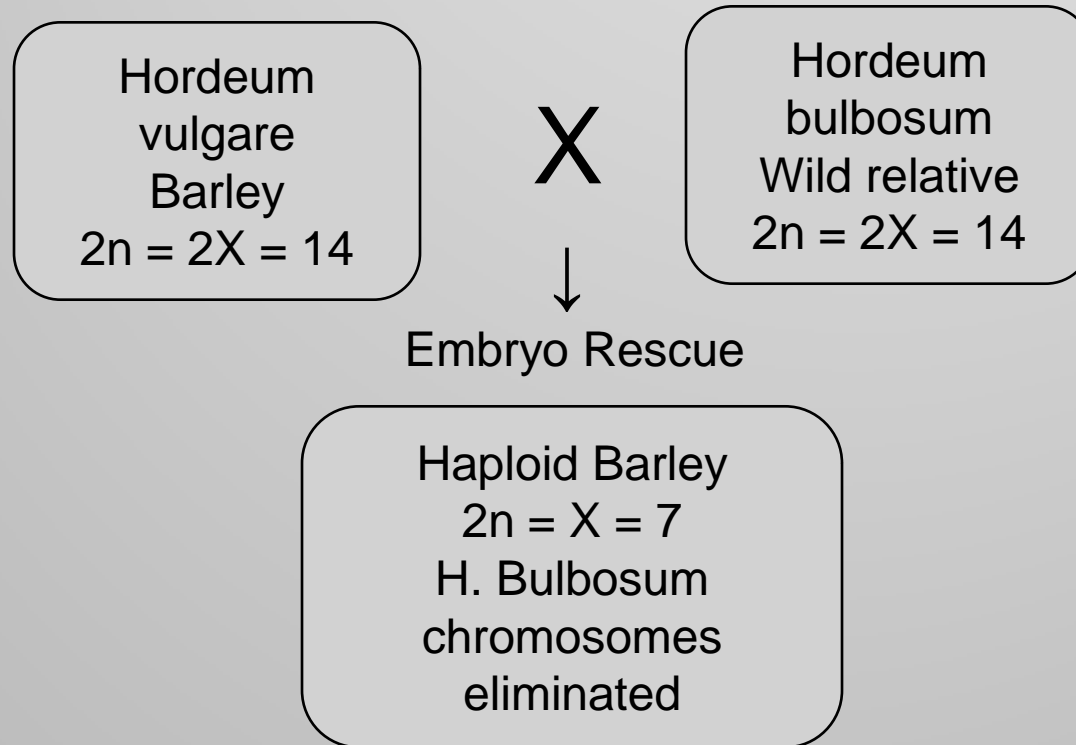
Untuk mempercepat breeding dengan kultur embrio yang belum matang/masih sangat muda

e.g. anggrek

4. Produksi tanaman haploid

Pada persilangan tertentu menghasilkan elminisai kromosom salah satu tetua. Untuk menghindari embryo abortion, dilakukan embryo rescue. Pada kasus persilangan *Hordeum vulgare* x *H. bulbosum* dilakukan kultur embryo.

Bulbosum Method



- ▶ This was once more efficient than microspore culture in creating haploid barley
 - ▶ Now, with an improved culture media (sucrose replaced by maltose), microspore culture is much more efficient (~2000 plants per 100 anthers)

Bulbosum technique

- ✓ *H. vulgare* is the seed parent
- ✓ zygote develops into an embryo with elimination of HB chromosomes
- ✓ eventually, only *H.vulgare* chromosomes are left
- ✓ embryo is "rescued" to avoid abortion

Excision of the immature embryo:

- ✓ Hand pollination of freshly opened flowers
- ✓ Surface sterilization – EtOH on enclosing structures
- ✓ Dissection – dissecting under microscope necessary
- ✓ Plating on solid medium – slanted media are often used to avoid condensation

Culture Medium

- Mineral salts – K, Ca, N most important
 - Carbohydrate and osmotic pressure
 - Amino acids
 - Plant growth regulators

Culture Medium

- Carbohydrate and osmotic pressure
 - 2% sucrose works well for mature embryos
 - 8-12% for immature embryos
 - transfer to progressively lower levels as embryo grows
 - alternative to high sucrose – auxin & cyt PGRs
- amino acids
 - reduced N is often helpful
 - up to 10 amino acids can be added to replace N salts, incl. glutamine, alanine, arginine, aspartic acid, etc.
 - requires filter-sterilizing a portion of the medium

Durum wheat

$2n = 28$

AABB

X

Rye

$2n = 14$

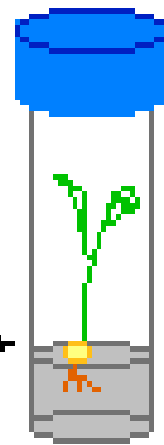
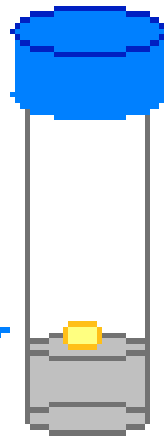
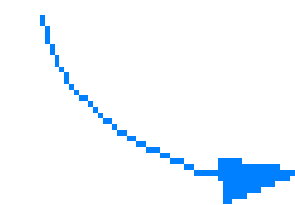
RR

“Wide” crossing of wheat and rye requires embryo rescue and chemical treatment to double the number of chromosomes.

Haploid embryo

$n = 21$

ABR



Haploid plantlet

$n = 21$

ABR

Embryo culture

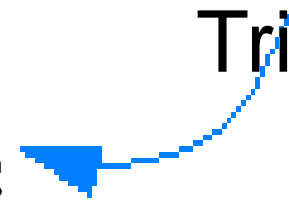
Chromosome doubling

Primary hexaploid triticales

$2n = 42$

AABRRR

Triticale



5. Mencegah embryo abortion pada tanaman buah yang buahnya matang sebelum embrio berkembang

Misal peach, cherry, apricot, plum, transport air dan mineral ke embrio menjadi terhambat sehingga embryo tidak berkembang

6. Mencegah embryo abortion karena inkompatibilitas

Untuk hasil persilangan interspecific, intergeneric, dan antar tanaman diploid x tetraploid. Embryo yang dihasilkan mudah mati/tidak berkembang sehingga perlu ditanam in vitro untuk membantu pertumbuhannya

7. Perbanyak vegetatif

Perbanyak vegetatif lebih mudah dilakukan dengan eksplan berupa embrio. Misal pada Gramineae dan Coniferae. Embrio digunakan sebagai eksplan kemudian diinduksi untuk pembentukan tunas.

Contoh kultur embrio pada tanaman clover (*Trifolium sp.*)

Fase 1 : konsentrasi sukrose yang tinggi, auksin sedang dan sitokinin rendah untuk 1 – 2 minggu. Embrio kemudian mengalami hambatan pertumbuhan dan harus dipindah media di fase 2

Fase 2 : Konsentrasi sukrosa normal, auksin rendah, dan sitokinin sedang. Embrio tumbuh lagi dan kadang tunas juga mulai terlihat

Fase 3 : Embrio dengan tunas dipindah ke media dengan auksin rendah dan sitokinin tinggi untuk stimulasi perbanyak tunas. Tunas kemudian diakarkan dan dipindah tanam

Fase 4 : embrio dengan pertumbuhan baru tetapi tidak teratur, dipindah ke media baru untuk induksi embriogenesis somatik

Next week

- ▶ Mikropropagasi 1 :
 - Manfaat mikropropagasi
 - Sumber eksplan
 - Tahap-tahap mikropropagasi

