

LAPORAN HASIL PENELITIAN

**Induksi Androgenesis Kedelai
Melalui Kultur Antera pada Media Dua-lapis untuk
Pengembangan Teknologi Haploid dalam
Percepatan Proses Pemuliaan**

SURAT PERJANJIAN PELAKSANAAN KEGIATAN

NO. : 638/LB.620/I.1/2/2009

TANGGAL : 20 Februari 2009

Oleh :

Dr. Ir. Ence Darmo Jaya Supena

Dr. Ir. Suharsono, DEA

Dr. Ir. Ika Mariska Soedharma, APU

INSTITUT PERTANIAN BOGOR

Bekerjasama dengan

SEKRETARIAT BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN PERTANIAN

2009

LAPORAN HASIL PENELITIAN

**Induksi Androgenesis Kedelai
Melalui Kultur Antera pada Media Dua-lapis untuk
Pengembangan Teknologi Haploid dalam
Percepatan Proses Pemuliaan**

SURAT PERJANJIAN PELAKSANAAN KEGIATAN

NO. : 638/LB.620/I.1/2/2009

TANGGAL : 20 Februari 2009

Oleh :

Dr. Ir. Ence Darmo Jaya Supena

Dr. Ir. Suharsono, DEA

Dr. Ir. Ika Mariska Soedharma, APU

INSTITUT PERTANIAN BOGOR

Bekerjasama dengan

SEKRETARIAT BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN PERTANIAN

2009

LEMBAR PENGESAHAN LAPORAN HASIL PENELITIAN

1. *Judul Kegiatan* : *Induksi Androgenesis Kedelai melalui Kultur Antera* pada Media Dua-lapis untuk Pengembangan Teknologi Haploid dalam Percepatan Proses Pemuliaan
2. Penanggung Jawab Penelitian :
- a. *N a m a* : Dr.Ir. Ence Darmo Jaya Supena
 - b. *Pangkat/golongan* : Pembina / IVa
 - c. *Jabatan*
 - *Struktural* : Ketua Departemen Biologi, FMIPA-IPB
 - *Fungsional* : Lektor Kepala
3. *Lokasi Penelitian* : Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi (PPSHB) - Institut Pertanian Bogor (IPB), Jalan Kamper, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680
4. *Biaya Penelitian* : Rp. 83.000.000,-
5. *Sumber Dana* : DIPA Tahun Anggaran 2009 Badan Litbang Pertanian No.4018.0/18-09.1/-/2009, tanggal 31 Desember 2008

Bogor, 7 Desember 2009

Penanggung jawab kegiatan,

Mengetahui,
Kepala LPPM Institut Pertanian Bogor,



Prof.Dr.Ir. Bambang Pramudya, M.Eng.
NIP: 19500301 197603 1 001

Dr.Ir. Ence Darmo Jaya Supena
NIP: 19641002 198903 1 002

KATA PENGANTAR

Upaya untuk mencapai swasembada kedelai perlu dukungan dari berbagai pihak, tidak terkecuali dari para peneliti dan pemulia tanaman. Ketersediaan varietas yang mempunyai daya hasil tinggi dan mampu beradaptasi pada kondisi lokal serta mempunyai sifat-sifat agronomis yang diinginkan adalah faktor penting untuk mendukung upaya swasembada kedelai tersebut. Program pemuliaan kedelai di Indonesia masih sepenuhnya menggunakan metode konvensional yang dalam prosesnya membutuhkan waktu yang sangat lama. Oleh karena itu sudah seharusnya ada pengembangan dan introduksi teknologi baru guna mempercepat proses pemuliaan tersebut. Teknologi haploid sangat menjanjikan untuk tujuan ini.

Penelitian yang dilakukan pada tahun kedua (2009) merupakan kelanjutan tahun pertama (2008) yang masih merupakan upaya dan langkah awal dalam pengembangan teknologi haploid, yaitu menginduksi pembelahan sporofitik melalui sistem kultur antera pada media dua-lapis, yang telah berhasil dikembangkan untuk tanaman cabai kultivar lokal Indonesia. Hasil tahun pertama mengindikasikan bahwa penelitian yang dilakukan berpotensi untuk terus dikembangkan di tahun berikutnya karena telah dapat menginduksi pembelahan sporofitik sebagai tahap awal menuju induksi androgenesis. Hasil penelitian tahun kedua lebih meningkatkan lagi kemampuan induksi pembelahan sporofitik ini baik dilihat dari kuantitas mikrospor yang responsif maupun pencapaian tahapan perkembangan sporofitik, yaitu multiselular mikrospora yang dapat dicapai. Namun begitu, penelitian dua tahun ini baru menggambarkan bahwa induksi androgenesis untuk pembentukan tanaman haploid dan haploid ganda kedelai melalui kultur antera pada media dua lapis berpeluang untuk dapat dikembangkan, oleh karenanya perlu ditindak lanjuti dengan penelitian tahap berikutnya.

Penelitian ini dibiayai melalui Program KKP3T dari Sekretariat Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Departemen Pertanian yang bekerjasama dengan Perguruan Tinggi di Indonesia, yaitu antara Balai Besar Bioteknologi dan Sumberdaya Genetika Pertanian (BB Biogen) Deptan dengan Pusat penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi (PPSHB) Institut Pertanian Bogor. Untuk kepercayaan yang diberikan, tim peneliti menghaturkan terima kasih. Ucapan terima kasih disampaikan juga kepada tim dari LPPM-IPB yang telah mengkoordinir dan mengelola Program KKP3T ini.

Kritik dan saran dari sidang pembaca akan bermanfaat untuk perbaikan pelaksanaan penelitian tahap selanjutnya, dan tim peneliti mengucapkan terima kasih. Semoga laporan ini bermanfaat bagi semua pihak yang berkepentingan.

Bogor, 7 Desember 2009

Tim Peneliti

DAFTAR ISI

| | <u>Halaman</u> |
|--|----------------|
| DAFTAR TABEL | v |
| DAFTAR GAMBAR | vi |
| RINGKASAN EKSEKUTIF | vii |
| <i>EXECUTIVE SUMMARY</i> | ix |
| 1. PENDAHULUAN | 1 |
| 2. TINJAUAN PUSTAKA | 4 |
| 3. PROSEDUR KERJA | 7 |
| 4. HASIL DAN PEMBAHASAN | 11 |
| 5. KESIMPULAN | 20 |
| 6. PERKIRAAN DAMPAK HASIL KEGIATAN | 20 |
| 7. DAFTAR PUSTAKA | 21 |

DAFTAR TABEL

Halaman

1. Pengaruh perlakuan sumber karbon terhadap perkembangan mikrospora dalam jumlah dan jenis inti pada varietas Wilis dengan media dasar NN, pada umur kultur 0, 1, 2, 3, dan 4 minggu setelah kultur..... 12
2. Penampilan hasil Kombinasi dari individu Perlakuan terbaik (media dasar NN – sumber karbon Maltosa (40 g/l) – suhu dingin (4-9°C) pada minggu pertama) terhadap perkembangan mikrospora dalam jumlah dan jenis inti pada varietas Wilis pada umur kultur 0, 1, 2, 3, dan 4 minggu setelah kultur..... 13
3. Pengaruh praperlakuan kuncup bunga sumber eksplan pada suhu dingin (4-9°C) pada Kombinasi (media dasar NN – sumber karbon Maltosa (40 g/l) – suhu dingin (4-9°C) pada minggu pertama) terhadap perkembangan mikrospora dalam jumlah dan jenis inti pada varietas Wilis pada umur kultur 0, 1, 2, 3, dan 4 minggu setelah kultur..... 15
4. Pengaruh perlakuan osmolaliti berbeda dengan konsentrasi Maltosa yang berbeda terhadap perkembangan mikrospora dalam jumlah dan jenis inti pada varietas Sindoro pada umur kultur 0, 1, 2, 3, dan 4 minggu setelah kultur..... 17
5. Pengaruh perlakuan penambahan paket vitamin dan bahan organik terhadap perkembangan mikrospora dalam jumlah dan jenis inti pada varietas Wilis pada umur kultur 0, 1, 2, 3, dan 4 minggu setelah kultur..... 18

DAFTAR GAMBAR

| | <u>Halaman</u> |
|--|----------------|
| 1. Tahapan proses penelitian untuk induksi androgenesis pada tanaman kedelai dalam rangka mengembangkan teknologi haploid untuk percepatan proses pemuliaan kedelai | 7 |
| 2. Pertanaman kedelai dilakukan secara berkala dalam periode pertanaman berbeda (selang dua minggu) untuk menyediakan kuncup bunga sebagai sumber eksplan secara berkesinambungan sekaligus meremajakan benih..... | 11 |
| 3. Multiselular mikrospora yang telah mencapai perkembangan 12 sel, tercermin dari inti sel yang terwarnai dari satu dinding mikrospora berjumlah 12 inti sel (gambar atas), sedangkan gambar bawah masih memperlihatkan pembelahan menjadi dua sel yang simetris | 14 |
| 4. Pengaruh praperlakuan kuncup bunga sumber eksplan pada suhu dingin (4-9°C) selama satu hari sebelum kultur. A: keadaan mikrospora pada saat kultur; B: multiselular mikrospor >3 inti vegetatif pada umur kultur 2 minggu; C: proses keluarnya inti/sel dari dinding mikrospora dan lisis pada umur kultur 3 minggu. (Genotipe yang digunakan adalah varietas Wilis, sedangkan kultur menggunakan media dasar NN – sumber karbon Maltosa (40 g/l) – inkubasi suhu dingin (4-9°C) pada minggu pertama) | 16 |
| 5. Kultur pada fase inkubasi dalam inkubator suhu 28°C dalam kondisi gelap | 19 |

RINGKASAN EKSEKUTIF

Ketersediaan varietas tanaman kedelai (*Glycine max* L.) yang mempunyai daya hasil tinggi dengan sifat-sifat agronomis yang baik serta daya adaptasi yang baik, merupakan faktor penting untuk meningkatkan produktivitas sekaligus untuk memperluas ekstensifikasi. Semua varietas unggul nasional kedelai di Indonesia adalah hasil pemuliaan konvensional yang dalam prosesnya membutuhkan 3-4 tahun. Proses yang lama ini terkadang menyebabkan program yang sedang dilaksanakan sudah tidak sesuai lagi dengan tuntutan lapang dan kebutuhan petani. Waktu terlama adalah dalam proses seleksi dan pembuatan galur murni yang mencapai 7 generasi. Oleh karenanya diperlukan introduksi teknologi yang dapat meningkatkan efektivitas dan efisiensi program pemuliaan tersebut.

Teknologi haploid mencakup cara untuk meregenerasikan embrio haploid dari sel gamet, untuk selanjutnya memproduksi tanaman haploid dan haploid ganda. Teknologi ini merupakan cara tercepat untuk mendapatkan homosigositas termasuk pembentukan galur murni hanya dalam 1-2 generasi. Penelitian yang dilaksanakan merupakan tahap awal untuk mengembangkan teknologi haploid untuk kedelai, yaitu menginduksi pembelahan sporofitik pada kedelai melalui kultur antera dalam media dua-lapis. Bila respon dari rangkaian penelitian ini cukup baik, selanjutnya akan diupayakan rangkaian penelitian untuk menginduksi proses embriogenesis (androgenesis) untuk menghasilkan embrio yang berasal dari mikrospora untuk memproduksi tanaman haploid dan haploid ganda kedelai.

Penelitian tahun 2008 telah berhasil dipelajari korelasi antara morfologi kuncup bunga kedelai melalui perbandingan panjang sepal terhadap petal dengan fase perkembangan mikrospora. Mikrospora yang responsif untuk induksi pembelahan sporofitik adalah pada fase berinti satu akhir dan berinti dua awal. Lebih lanjut, penggunaan media dasar NN, serta perlakuan cekaman suhu rendah (4-9 °C) selama seminggu pertama kultur lebih mendukung induksi pembelahan sporofitik. Hasil ini menunjukkan adanya potensi untuk terus dikembangkan di tahun 2009 karena telah dapat menginduksi pembelahan sporofitik sebagai tahap awal menuju induksi androgenesis.

Hasil percobaan tahun 2009 menunjukkan bahwa sumber karbon Maltosa (40 g/l) lebih dapat menginduksi androgenesis daripada Sukrosa (40 g/l) dan Manitol (55 g/l). Kombinasi kultur menggunakan media dasar NN, sumber karbon Maltosa (40 g/l), dan inkubasi pada suhu dingin (4-9°C) minggu pertama kultur, terbukti merupakan kombinasi yang baik untuk induksi pembelahan sporofitik pada varietas Wilis. Berikutnya, praperlakuan kuncup bunga pada suhu dingin (4-9 °C) selama satu hari sebelum isolasi antera, juga lebih baik daripada 0 (kontrol), 3 dan 7 hari praperlakuan. Percobaan pengkayaan dengan vitamin dan bahan organik menunjukkan bahwa vitamin dan bahan organik dari media dasar NN

sudah cukup, tidak perlu lebih diperkaya seperti pada paket vitamin dan bahan organik NLN maupun B5-long, atau yang lebih sederhana seperti pada media MS. Percobaan osmolaliti dengan konsentrasi maltosa yang berbeda menunjukkan bahwa Maltosa 20 g/l dan 40 g/l lebih baik dari pada Maltosa 90 g/l dan 120 g/l, untuk kultur berikutnya Maltosa 20 g/l sudah cukup. Percobaan pengkayaan medium dengan penambahan kombinasi zat pengatur tumbuh 2,4-D dan BA, dan percobaan temperatur inkubasi kultur masih dalam tahap pelaksanaan, sedangkan uji kombinasi akhir berbagai perlakuan terpilih baru dapat dilaksanakan setelah semua individu percobaan selesai. Pengembangan teknologi haploid untuk memproduksi tanaman haploid dan haploid ganda cabai perlu diteruskan karena sangat berpotensi untuk berhasil sehingga akan dapat mempercepat proses pemuliaan kedelai.

Kata kunci: kedelai, mikrospora, androgenesis, sporofitik, induksi

EXECUTIVE SUMMARY

The availability of soybean varieties (*Glycine max* L.), which are high yield with outstanding of agronomic traits and adapted to local condition, are the important factor to improve productivities and to extent area of soybean plantation. An effective and an efficient breeding program are prerequisite to support these purposes. In Indonesia, almost all soybean varieties are produced by conventional breeding, in which very long times in process are needed (3-4 year), especially in the selection process to develop pure lines from hybridization (7 generations). In this case, ongoing breeding program can be not suitable anymore with on time of field and farmer's demands.

Haploid technology includes the regeneration of haploid embryos from gametes and the production of haploid and doubled haploid plants from them. This technique is the most rapid route to achieve homozygous as well as to produce pure lines. Development and introduction of this haploid technology would facilitate and speed up the local breeding program of soybean. The propose research is the first steps to develop haploid technology of soybean, which are to induce sporophytic divisions of soybean through anther culture in double-layers medium system. When its responsivities is sufficien enaught, the research activities would be continue to induce androgenesis to produce embryos, and both haploid and doubled haploid plant.

Research in the frist year (2008) could identified morfological markers to indicate microspore development phases, which is the ratio of brachtea and lengh of bud. The most responsive microspores to be induced to sporophytic divisions were when the population of microspore is almost in the same frequency of late uninuclear and early bicellular stages as anther source. Using medium of NN was more suitable for the culture system than MS, PC-L2, and B5 basal medium. Temperature cold (4-9 °C) stress treatment in the first week of culture induced sporophytic divisions. This result indicated that sporophytic division could be induce, which is the first step to induce androgenesis.

Result of experiment in 2009 indicated that Maltose (40 g/l) is better to induce sporophytic divisions that Sucrose (40 g/l) and Mannitol (55 g/l). Combination of NN-basic medium, Maltose (40 g/l) as carbone source, and incubation under low temperature (4-9°C) in the first week of culture was a good culture condition to induce sporophytic divisions for Wilis variety. Later, one day bud pretreatment in low temperature (4-9 °C) was better than 0 (control), 3 and 7 days pretreatment. Enrichment culture medium with vitamins and organic source indicated that the packet of NN was suppicient. It was not needed to enrich more such as in a packet in NLN or B5-long, or the offosite one more simple as MS. Osmolaliti treatment using different concentration of Maltose showed that 20 g/l and 40 g/l

Maltosa were better than 90 g/l and 120 g/l Maltosa. Enrichment medium with combination of growth hormones 2,4-D and BA, and incubation temperature treatment are still on going experiments, while the combination of all selected individual treatment will be doing when all individual experiment done. There is potential to continuous development haploid technology in soybean in order to produce haploid and double haploid plant especially to speed up soybean breeding process.

Key words: soybean, microspore, androgenesis, sporophytic, induction

1. PENDAHULUAN

Kedelai (*Glycine max* L.), meskipun merupakan tanaman pangan terpenting ketiga di Indonesia setelah padi dan jagung, tetapi produktivitasnya masih rendah dengan rata-rata pada tahun 2008 hanya 1.313 ton/ha (BPS, 2009) dibandingkan negara penghasil utama kedelai lainnya seperti Brazil dan Amerika Serikat yang mencapai sekitar 2.5 ton/ha (FAO, 2007). Produksi kedelai total tiap tahunnya juga masih jauh untuk mencukupi kebutuhan nasional, pada tahun 2008 produksi hanya 0.78 juta ton sedangkan kebutuhan mencapai 2.2 juta ton (BPS, 2009). Penggunaan utama kedelai di Indonesia adalah untuk tahu dan tempe yang mencapai lebih dari 80% kebutuhan total. Kebutuhan akan kedelai ini terus meningkat, sementara perluasan areal pertanaman kedelai dan peningkatan produktivitas masih sulit dilakukan. Kondisi ini, mengharuskan berbagai pihak untuk saling bekerjasama dalam mendukung upaya pemerintah menuju swasembada kedelai (Badan Litbang Pertanian-Deptan, 2005). Prediksi produksi pada tahun 2009 akan meningkat menjadi 0.97 juta ton dengan produktivitas sedikit meningkat menjadi 1.327 ton/ha (BPS, 2009).

Ketersediaan benih dan varietas kedelai berdaya hasil tinggi dengan sifat-sifat agronomis sesuai tuntutan petani dan daya adaptasi yang baik terhadap lingkungan atau spesifik daerah adalah salah satu faktor utama untuk meningkatkan produktivitas sekaligus merangsang untuk memperluas areal pertanaman kedelai. Untuk dapat mengembangkan varietas baru diperlukan dukungan program pemuliaan yang efektif dan efisien. Varietas kedelai yang dibudidayakan di Indonesia, umumnya adalah hasil pemuliaan konvensional melalui teknik hibridisasi atau persilangan buatan antar tetua atau varietas terpilih yang dilanjutkan dengan proses seleksi. Waktu yang dibutuhkan untuk menghasilkan varietas baru kedelai melalui teknik pemuliaan konvensional ini sangat lama, yaitu 3-4 tahun (Sumarno, 1983). Waktu terlama adalah dalam proses seleksi dan pembentukan galur homozigous dari turunan hasil persilangan yang membutuhkan waktu sampai tujuh generasi. Hal ini, selain berakibat pada produktivitas yang rendah dalam menghasilkan varietas baru, juga dapat menyebabkan program yang sedang berjalan sudah tidak sesuai lagi dengan tuntutan lingkungan dan kebutuhan petani.

Penggunaan metoda konvensional dalam pemuliaan kedelai, pada dasarnya tidak efisien dan tidak efektif lagi untuk mengimbangi tuntutan petani dan kondisi spesifik daerah. Oleh karenanya diperlukan pengembangan dan introduksi teknologi

baru untuk mencari dan mendapatkan alternatif pemecahan masalah dalam upaya meningkatkan efisiensi dan efektivitas program pemuliaan kedelai. Salah satu teknologi yang potensial untuk tujuan ini adalah teknologi haploid. Dengan teknologi ini, embrio dapat diregenerasikan dari sel gamet secara *in vitro* dan selanjutnya tanaman haploid dapat dibentuk dari embrio tersebut. Tanaman haploid ganda (HG) yang berarti homosigot untuk seluruh lokusnya atau disebut juga galur murni dapat diperoleh melalui penggandaan kromosom secara spontan, ataupun melalui induksi penggandaan kromosom dengan senyawa kimia kolkisin pada berbagai fase haploid (Jansen, 1974). Pembentukan embrio dari mikrospora ini (androgenesis) merupakan metode yang paling efisien untuk menghasilkan tanaman HG karena hanya membutuhkan waktu satu generasi (Ferrie *et al.* 1994). Fenomena ini dapat diterapkan untuk memperoleh populasi tanaman homosigot dari turunan hasil persilangan dengan hanya dalam satu generasi, atau tidak perlu sampai tujuh generasi seperti menggunakan teknik konvensional. Oleh karenanya introduksi teknologi haploid ini akan dapat mempercepat dan meningkatkan efisiensi program pemuliaan kedelai di Indonesia secara signifikan, khususnya melalui percepatan proses seleksi dan pembentukan galur homosigot dari hasil persilangan antar tetua terpilih.

Penggunaan teknologi haploid secara komersial, umumnya dimanfaatkan untuk memproduksi galur-galur murni sebagai calon tetua-tetua untuk pengembangan varietas hibrida. Teknologi haploid, dengan tanaman HG yang homosigot untuk seluruh lokusnya juga sangat membantu dalam penelitian genetik untuk sifat-sifat poligenik. Teknologi haploid bila dikombinasikan dengan teknik mutagenesis juga menjadi sangat potensial dan berdaya guna untuk meningkatkan keragaman genetik sekaligus memudahkan dalam proses seleksi dan fiksasi untuk tujuan perbaikan genetik tanaman (Palmer & Keller, 1999).

Teknik kultur jaringan atau kultur *in vitro* kedelai sebenarnya sudah cukup berkembang, khususnya pembentukan embrio dan tanaman melalui proses embriogenesis somatik untuk keperluan transformasi dalam rekayasa genetik tanaman kedelai. Contoh prosedur yang sudah relatif standar dapat dilihat di www.cropsoil.uga.edu/soy-engineering/embryogenesisprotocol.html dan Santos *et al.* (2006). Regenerasi tanaman kedelai secara *in vitro* melalui embriogenesis somatik ini sudah dilaporkan sejak awal tahun 1980-an (Cheng *et al.*, 1980; Kartha *et al.*, 1981).

Meskipun teknik embriogenesis somatik *in vitro* kedelai telah berhasil dikembangkan dan sudah diaplikasikan secara praktis, tetapi induksi embriogenesis

dan regenerasi *in vitro* dari sel gamet (khususnya androgenesis) masih dalam tahap pengembangan. Meskipun telah ada yang melaporkan keberhasilan proses androgenesis melalui kultur antera pada media padat, tetapi masih tidak efisien sehingga belum dapat dimanfaatkan secara rutin untuk produksi tanaman HG ataupun diaplikasikan untuk keperluan praktis (Hu *et al.*, 1996; Kaltchuk-Santos *et al.*, 1997; de Moraes *et al.*, 2004). Sedangkan induksi androgenesis melalui kultur isolasi mikrospora pada media padat belum ada yang melaporkan berhasil sampai memperoleh embrio dewasa (Rodrigues *et al.*, 2006).

Di Indonesia, upaya untuk mengembangkan teknologi haploid pada kedelai sudah pernah dilakukan oleh peneliti dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetika Pertanian (BB Biogen) Bogor, yaitu melalui kultur antera pada media padat maupun kultur isolasi mikrospora pada media cair, namun keduanya tidak berhasil dan hanya mencapai fase kalus (komunikasi pribadi, Pebruari 2007). Hal yang sama juga dilaporkan oleh peneliti dari Universitas Jambi (Zulkarnain, 2005), bahwa dari percobaan kultur antera kedelai pada media padat baru sampai fase multiselular mikrospora. Oleh karenanya pengembangan protokol untuk memproduksi tanaman haploid dan haploid ganda pada kedelai menjadi sangat penting tidak saja dilihat dari keperluan praktis, tetapi secara saintifik pun sangat menantang dan penting dalam memahami proses androgenesis pada kedelai.

2. TINJAUAN PUSTAKA

Salah satu faktor yang diduga sebagai penyebab ketidak atau kurang berhasil induksi androgenesis kedelai melalui kultur antera pada media padat maupun isolasi mikrospora pada media cair adalah penggunaan sumber eksplan pada fase perkembangan mikrospora yang tidak tepat. Fase perkembangan mikrospora yang responsif untuk induksi mikrospora umumnya adalah pada fase mikrospora berinti tunggal akhir sampai polen berinti ganda tahap awal, seperti pada *Capsicum annuum* (Barcaccia *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2004; Supena *et al.*, 2006), fase yang sama juga disarankan untuk kedelai (Hu *et al.*, 1981). Selain itu embriogenesis adalah suatu proses yang umumnya membutuhkan kondisi dan prasyarat tertentu pada tiap-tiap tahapannya (Rock & Quartrano 1995; Stasolla & Yeung 2003) sehingga tidak begitu saja melakukan kultur antera atau mikrospora akan langsung diharapkan menghasilkan embrio dengan satu tahapan kultur atau satu tahapan inkubasi saja.

Dalam proses embriogenesis, baik itu embriogenesis dari zigotik maupun embriogenesis dari sel somatik, begitu juga embriogenesis dari mikrospora secara *in vitro*, pada prinsipnya akan melalui beberapa tahapan. Setidaknya ada tiga tahapan kritis, yaitu: (i) saat induksi dan pembelahan sporofitik, (ii) induksi mikrospora yang sudah multiselular masuk ke jalur embriogenesis atau androgenesis, dan (iii) tahapan transisi dari pembelahan radial ke pembelahan bilateral atau tahapan antara dari fase globular dalam embriogenesis ke fase berikutnya yaitu fase hati saat terbentuknya kotiledon. Konsentrasi zat pengatur tumbuh tanaman, khususnya proporsi antara auksin dan sitokinin, berperan penting dalam alur proses embriogenesis tahap awal. Selanjutnya, penggunaan asam absisat (ABA) dan tingkatan osmolaliti medium dapat berpengaruh terhadap proses pematangan embrio baik embriogenesis zigotik maupun embriogenesis somatik (Rock & Quartrano 1995; Stasolla & Yeung 2003). Pada kultur antera kentang, penurunan suhu inkubasi juga memberikan efek positif, yaitu meningkatkan produksi embrio dan frekuensi regenerasi menjadi tanaman (Snider & Veilleux, 1994; Rokka *et al.* 1996).

Supena *et al.* (2006) telah berhasil mengembangkan protokol untuk memproduksi tanaman haploid ganda pada tanaman cabai lokal Indonesia. Dalam percobaannya, berbagai metode induksi androgenesis yang telah ada diantaranya kultur antera pada media padat, kultur isolasi mikrospora pada media cair, dan kultur antera pada media dua-lapis dicobakan dan dibandingkan. Hasilnya adalah bahwa teknik kultur antera pada media dua-lapis jauh lebih efisien dari kedua teknik lainnya.

Teknik yang dikembangkan prinsipnya mengkulturkan antera pada media dua-lapis yaitu media cair di atas media padat. Sebelumnya, cabai tipe Cayenne seperti cabai Indonesia dianggap rekalsitran atau sulit diinduksi *in vitro* untuk androgenesis melalui kultur antera pada media padat maupun kultur isolasi mikrospora pada media cair. Kasus yang sama terjadi pada kedelai, dengan upaya induksi androgenesis melalui kultur antera pada media padat (Hu *et al.*, 1996; Kaltchuk-Santos *et al.*, 1997; Moraes *et al.*, 2004) dan kultur isolasi mikrospora (Rodrigues *et al.*, 2006) ternyata mengalami kesulitan dan sudah dikategorikan rekalsitran. Sedangkan prosedur kultur antera pada media dua-lapis belum pernah dicobakan untuk kedelai, oleh karenanya selain merupakan penelitian pertama juga cukup berpeluang untuk berhasil. Dengan teknik kultur antera pada media dua-lapis, pada prinsipnya akan menggabungkan keutamaan dari teknik kultur antera pada media padat maupun teknik kultur isolasi mikrospora pada media cair, serta mengurangi efek negatif dari keduanya. Teknik kultur antera pada media dua lapis ini akan digunakan sebagai pendekatan untuk mempelajari induksi pembelahan sporofitik yang selanjutnya diharapkan mengarah ke mempelajari kemampuan embriogenesis dari mikrospora pada kedelai.

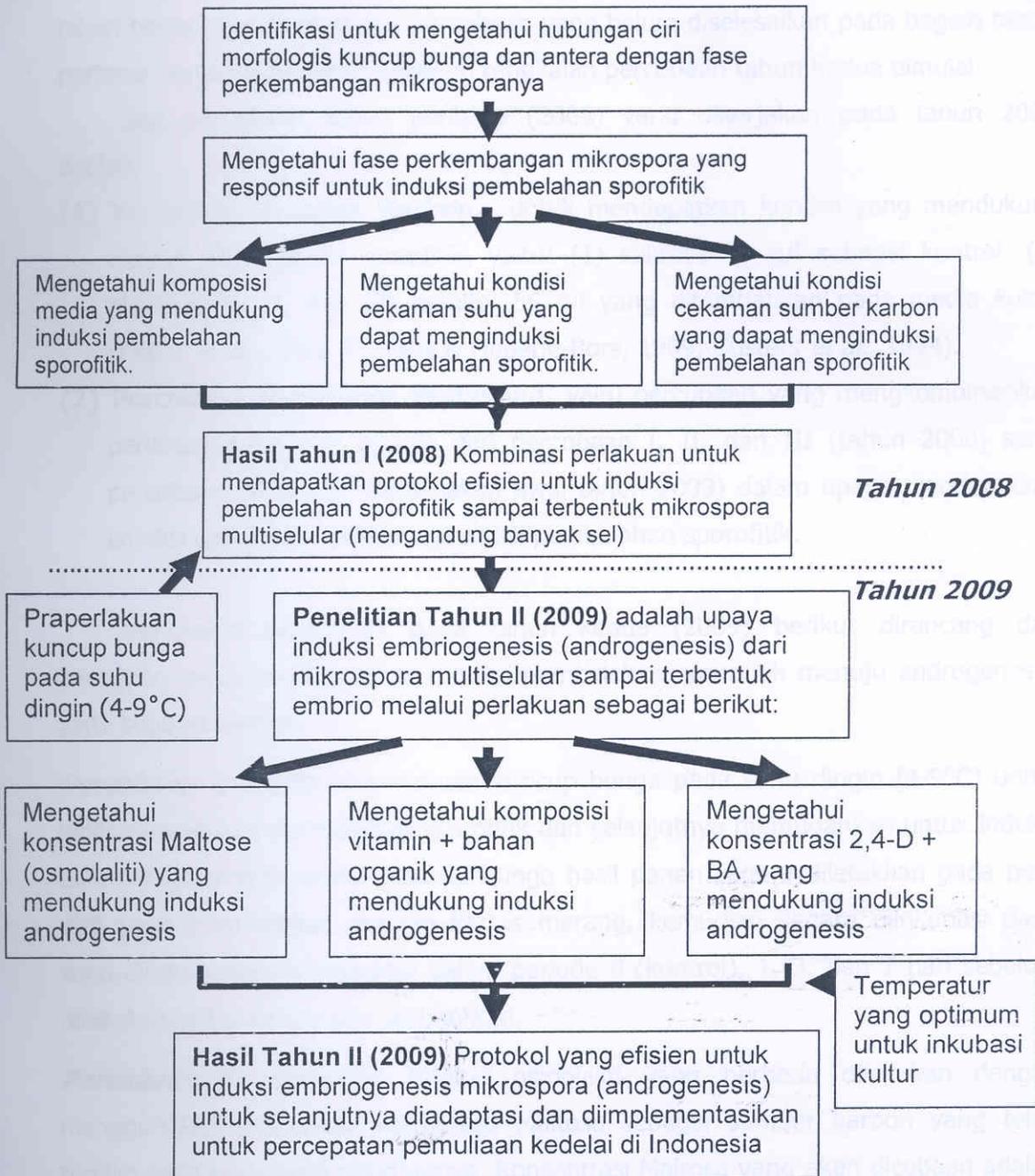
Hasil Penelitian Tahun 2008

Pada tahun pertama (2008) telah berhasil dipelajari korelasi antara morfologi kuncup terhadap fase perkembangan mikrospora. Peranda morfologi kuncup bunga kedelai yang mengandung mikrospora berinti tunggal akhir sampai berinti dua awal yaitu ketika rasio panjang braktea terhadap panjang kuncup adalah 2:2.5 sampai 2:3.5. Hasil ini sesuai dengan yang diperoleh da Silva Lauxen *et al.* (2003) yang juga mempelajari hubungan antara morfologi bunga kedelai dengan fase perkembangan mikrospora. Selanjutnya pengujian untuk mengetahui fase perkembangan mikrospora yang responsif untuk induksi pembelahan sporofitik, menunjukkan bahwa mikrospora yang responsif untuk induksi pembelahan sporofitik adalah ketika fase berinti tunggal akhir dan fase berinti dua awal dalam perbandingan yang relatif seimbang, yaitu ketika rasio braktea:kuncup 2:2.5 untuk Sindoro, 2:3.0 untuk Wilis, dan 2:3.5 untuk Slamet. Percobaan beberapa komposisi media dasar (Hu *et al.*, 1996; Kaltchuk-Santos *et al.*, 1997; Phillips & Collins, 1980; de Moraes *et al.*, 2004;), menunjukkan bahwa medium dasar NN dapat lebih mendukung kultur antera dan perkembangan mikrospora daripada media MS, PC-L2, dan B5. Perlakuan suhu inkubasi pada awal kultur (Supena *et al.*, 2006), menegaskan bahwa perlakuan cekaman suhu

rendah (4-9 °C) dan kontrol (25-28 °C) selama seminggu pertama kultur lebih mendukung induksi pembelahan sporofitik dari pada suhu tinggi (31-33 °C) yang tidak menginduksi dan bahkan mempercepat mikrospor kehilangan inti. Hasil penelitian tahun pertama (2008) ini mengindikasikan bahwa tahap awal androgenesis kedelai, yaitu induksi pembelahan sporofitik pada inti mikrospora telah dapat diinduksi melalui kultur antera kedelai dalam sistem media dua-lapis, dan bahkan hingga dihasilkan multiselular mikrospora. Pada tahun II (2009) akan melanjutkan hasil tahun 2008 yaitu upaya untuk mendapatkan kondisi yang akan meningkatkan lagi induksi pembelahan sporofitik sehingga dapat dihasilkan multiselular mikrospora, baik secara kuantitatif maupun kualitatif, untuk selanjutnya diharapkan menuju proses embriogenesis dari mikrospora (androgenesis) sehingga diperoleh embrio haploid dan atau haploid ganda.

3. PROSEDUR KERJA

Penelitian induksi androgenesis kedelai ini rencananya akan dilakukan dalam waktu dua tahun (tahun anggaran 2008 dan 2009). Rangkaian kegiatan penelitian yang dilaksanakan disajikan pada gambar 1.



Gambar 1. Tahapan proses penelitian untuk induksi androgenesis pada tanaman kedelai dalam rangka mengembangkan teknologi haploid untuk percepatan proses pemuliaan kedelai

Percobaan pada tahun kedua (2009) yaitu induksi embriogenesis mikrospora merupakan kelanjutan dari hasil percobaan tahun pertama (2008). Hasil tahun pertama yang ditargetkan dan disyaratkan mampu menginduksi pembelahan sporofitik pada mikrospora secara *in vitro* atau telah dihasilkan mikrospora yang sudah multiseluler telah dapat dicapai, sehingga perlu dan dapat diteruskan untuk tahun berikutnya. Namun dua percobaan yang belum diselesaikan pada bagian tahun pertama harus diselesaikan sebelum rangkaian percobaan tahun kedua dimulai.

Sisa percobaan tahun pertama (2008) yang dikerjakan pada tahun 2009 adalah:

- (1) **Percobaan Sumber Karbon**, untuk mendapatkan kondisi yang mendukung induksi pembelahan sporofitik, yaitu: (1) sukrosa 40 g/l sebagai kontrol, (2) maltosa 40 g/l, dan (3) manitol 55 g/l yang ditambahkan pada media kultur (Kasha *et al.*, 2003; Touraev & Heberle-Bors, 1999; Custers *et al.*, 1994).
- (2) **Percobaan Kombinasi Perlakuan**, yaitu percobaan yang mengkombinasikan perlakuan-perlakuan terpilih dari percobaan I, II, dan III (tahun 2008) serta percobaan IV (yang dilaksanakan awal tahun 2009) dalam upaya mendapatkan kondisi optimum untuk menginduksi pembelahan sporofitik.

Rangkaian percobaan pada tahun kedua (2009) berikut dirancang dan bertujuan untuk meningkatkan induksi pembelahan sporofitik menuju androgenesis, yaitu sebagai berikut:

Percobaan I, adalah praperlakuan kuncup bunga pada suhu dingin (4-9°C) untuk lebih menginisiasi pembelahan sporofitik dan selanjutnya memudahkan untuk induksi embriogenesis mikrospora. Kuncup bunga hasil panen segera diletakkan pada petri dish yang dilembabkan dengan kertas merang, kemudian segera diinkubasi pada suhu dingin dalam refrigerator dalam periode 0 (kontrol), 1, 3, dan 7-hari sebelum dilakukan isolasi antera dan dikulturkan.

Percobaan II, pengujian tingkat osmolaliti yang berbeda dilakukan dengan menggunakan perbedaan konsentrasi Maltosa sebagai sumber karbon yang telah terpilih pada percobaan sebelumnya. Konsentrasi Maltosa yang akan dicoba adalah 20, 40, 90, 120 g/l. Konsentrasi Maltosa 40 g/l adalah yang digunakan sebelumnya sebagai kontrol, kemudian ditambah perlakuan yang lebih rendah (20 g/l) dan yang lebih tinggi (90 dan 120 g/l). Penggunaan konsentrasi Maltosa ini didasarkan pada

percobaan yang dilakukan Dolcet-Sanjuan *et al.* (1996) pada cabai paprika dengan sistem media dua-lapis yang sama.

Percobaan III, adalah menguji penggunaan komposisi vitamin dan bahan organik dalam media kultur yang bersumber dari paket media dasar berbeda, yaitu media MS (Murashige & Skoog, 1962), media NN (Nitsch & Nitsch, 1969), media NLN (Lichter, 1982), dan B5 long (Gamborg *et al.*, 1968; Hu *et al.*, 1996). Kultur sebelumnya menggunakan baik media dasar maupun vitamin dan bahan organik dari media NN. Berdasarkan urusatan dari yang lebih sederhana ke yang lebih kaya atau lebih kompleks untuk paket vitamin dan bahan organik tersebut, berturut-turut adalah MS, NN, NLN, dan B5-long.

Percobaan IV, adalah pengkayaan dengan zat pengatur tumbuh tanaman sintetik, khususnya perimbangan auksin dan sitokinin. Percobaan berupa kombinasi konsentrasi 2,4-D (2.4; 4.5; 9.0; dan 13.9 μM) dan BA (dalam 1.2; 2.2; 4.5 μM) yang diharapkan dapat mendukung induksi pembelahan sporofitik sekaligus menginduksi embriogenesis mikrospora.

Percobaan V, adalah perbedaan temperatur inkubasi yaitu, 18-20; 24-26; 28-30 °C setelah sebelumnya diinkubasi pada suhu 4-9 °C pada minggu pertama kultur (Rokka *et al.*, 1996)

Percobaan VI, adalah percobaan terakhir dengan mencoba menggabungkan seluruh hasil individu percobaan sebelumnya untuk menghasilkan protokol tidak hanya efisien dalam induksi pembelahan sporofitik tetapi juga mampu menginisiasi dan menginduksi ke arah embriogenesis mikrospora (androgenesis) dan diperolehnya embrio yang berasal dari mikrospora.

Prosedur kultur sebar-mikrospora

Prosedur kultur sebar-mikrospora yang telah dikembangkan oleh Supena *et al.* (2006) digunakan pada penelitian ini. Prosedur ini pada prinsipnya adalah kultur antera pada sistem medium dua-lapis, yaitu media cair di atas media padat. Baik media cair maupun media padat pada prinsipnya mengandung unsur hara makro, mikro dan vitamin yang sama sesuai dengan komposisi media perlakuan atau media terpilih dari hasil percobaan. Khusus untuk media padat ditambahkan agar (8 g/l) dan arang aktif (10 g/l). Kedua media disterilisasi dengan autoklaf yang sebelumnya pH medium di buat menjadi 5.8 dengan penambahan beberapa tetes NaOH 1N atau HCl

1N. Cawan petri yang digunakan untuk kultur adalah ukuran diameter 6 cm dengan volume media padat maupun media cair sekitar 3 ml.

Kuncup bunga dengan kriteria ciri karakter morfologis seperti hasil tahun pertama, yaitu ketika rasio braktea:kuncup antara 2:2.5 sampai 2:3.5, dipanen pada pagi hari. Sebelum antera diisolasi dari individual kuncup bunga, kuncup bunga disterilisasi dalam alkohol 70% selama 30 detik, dibilas 3 kali dengan air steril, direndam dalam NaOCl 2% yang ditambah Tween-20 0.05% (v/v) selama 10 menit, dan selanjutnya dibilas 3 kali dengan air steril masing-masing selama 10, 5 dan 1 menit. Antera dari setiap individu bunga yang berjumlah 10 antera dibagikan atau dikulturkan secara acak pada cawan petri-cawan petri sesuai perlakuan. Setiap cawan petri dikulturkan 10 buah antera. Selanjutnya kultur diinkubasi pada suhu rendah (4-9 °C) selama seminggu pertama, berikutnya dipindahkan pada suhu 25-28 °C. Kedua periode inkubasi ini selalu dilakukan pada kondisi gelap.

Pengamatan

Setiap minggu mulai saat kultur (0 minggu), minggu 1, 2, 3 dan 4 setelah kultur, perkembangan mikrospora dalam antera diamati dengan cara dilakukan isolasi mikrospora dari antera selanjutnya dibuat preparat dengan pewarnaan DAPI dan diamati di bawah mikroskop mikroskop fluorescence dengan filter-UV. Sedangkan pengamatan secara fisik atau morfologi antera dan kultur dilakukan juga setiap minggu di bawah mikroskop stereo.

Analisis statistika

Data hasil pengamatan akan dianalisis menggunakan standar analisis keragaman General Linear Model of SPSS untuk Windows. Selanjutnya, beda nyata terkecil (BNT) akan dihitung untuk melihat pengaruh nyata dari perlakuan untuk masing-masing percobaan

4. HASIL DAN PEMBAHASAN:

Untuk menyediakan secara kontinu kuncup bunga sebagai sumber eksplan dalam rangkaian percobaan yang dilaksanakan, seperti pada tahun sebelumnya, dilakukan pertanaman secara berkala untuk kedelai varietas Sindoro, Slamet, dan Wilis tiap selang waktu dua minggu (Gambar 2). Pengaturan seri periode pertanaman secara berkala ini telah menghasilkan dan menyediakan kuncup bunga sumber eksplan hampir disepanjang waktu, sehingga ketersediaan kuncup bunga tidak menjadi kendala dalam pelaksanaan percobaan-percobaan. Namun pertanaman yang kontinu dari tahun sebelumnya ini menyebabkan tanaman mudah terkena penyakit, dan berakibat pada kualitas kuncup sebagai sumber eksplan menjadi menurun yang ditandai persentase kontaminasi yang tinggi pada awal-awal kultur tahun 2009 ketika menyelesaikan target tahun 2008. Masalah terpecahkan ketika pertanaman dipindah ke tempat lain yang cukup jauh dari pertanaman sebelumnya.



Gambar 2. Pertanaman kedelai dilakukan secara berkala dalam periode pertanaman berbeda (selang dua minggu) untuk menyediakan kuncup bunga sebagai sumber eksplan secara berkesinambungan sekaligus meremajakan dan perbanyak benih kedelai.

4.1. Pengaruh sumber karbon dan kombinasi perlakuan hasil 2008

Penyelesaian pekerjaan tahun I (2008) pada awalnya sangat terkendala dengan masalah kontaminasi yang serius, sehingga pekerjaan harus diulang beberapa kali dan akhirnya dapat juga diselesaikan dengan memindahkan pertanaman kedelai sumber eksplan menjadi tidak di tempat sebagaimana biasanya. Perlakuan sumber karbon telah dapat dilaksanakan untuk seluruh varietas yang diuji, yaitu varietas Slamet, Sindoro, dan Wilis. Untuk varietas Wilis data hasil percobaan disajikan pada tabel 1. Hasil menunjukkan bahwa Maltosa sebagai sumber karbon yang tergolong *slow-release* lebih cocok dari pada sukrosa yang tergolong *past-release* (Scott et al, 1995). Hasil ini sesuai seperti pada kasus kultur antera barley (Finnie et al, 1989), kultur antera gandum (Last & Bretell, 1990), dan kultur antera cabai pada media padat (Gémesné et

Tabel 1. Pengaruh perlakuan sumber karbon terhadap perkembangan mikrospora dalam jumlah dan jenis inti pada varietas **Wilis** dengan media dasar NN, pada umur kultur 0, 1, 2, 3, dan 4 minggu setelah kultur.

| Sumber karbon | Fase mikrospora atau jumlah dan jenis inti dalam mikrospora (%) | Umur kultur | | | | |
|---------------------|---|-------------|----------|-------------|------------|----------|
| | | Minggu-0 | Minggu-1 | Minggu-2 | Minggu-3 | Minggu-4 |
| Sukrosa (40 g/l) | EU-MU (1 inti) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | LU (1 inti) | 81.4 | 9.4 | 9.3 | 7.2 | 2.7 |
| | EB (2 inti awal (v+g)) | 18.6 | 47.9 | 5.7 | 0 | 0.6 |
| | 1 inti v + 1-2 inti g | 0 | 35.3 | 20.2 | 10.1 | 1.4 |
| | 2v + 0-3 g | 0 | 1.0 | 2.6 | 1.3 | 0 |
| | ≥ 3 inti vegetatif | 0 | 0 | 0.2 | 0 | 0 |
| | Tidak ada inti (ke luar) | 0 | 6.7 | 61.9 | 81.4 | 95.3 |
| Maltosa (40 g/l) | EU-MU (1 inti) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | LU (1 inti) | 82.5 | 58.5 | 23.9 | 15.4 | 0 |
| | EB (2 inti awal (v+g)) | 17.5 | 23.4 | 4.9 | 0 | 0.9 |
| | 1 inti v + 1-2 inti g | 0 | 0.3 | 22.2 | 11.3 | 5.9 |
| | 2v + 0-3 g | 0 | 0 | 8.8 | 0 | 0 |
| | ≥ 3 inti vegetatif | 0 | 0 | 15.9 | 0 | 0 |
| | Tidak ada inti (ke luar) | 0 | 0 | 24.5 | 73.3 | 93.1 |
| Manitol (40 g/l) | EU-MU (1 inti) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | LU (1 inti) | 83.0 | 30.3 | 10.3 | 8.3 | 2.4 |
| | EB (2 inti awal (v+g)) | 17.0 | 50.6 | 4.8 | 7.7 | 0 |
| | 1 inti v + 1-2 inti g | 0 | 19.1 | 12.8 | 3.4 | 5.7 |
| | 2v + 0-3 g | 0 | 0 | 5.5 | 7.3 | 0 |
| | ≥ 3 inti vegetatif | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Tidak ada inti (ke luar) | 0 | 0 | 66.6 | 73.3 | 91.9 |

Keterangan : EU-MU= Early/Mid Uninucleate; LU= Late Uninucleate; EB = Early Binucleate; v = inti vegetatif ; g = inti generatif

al, 1998) maupun kultur antera cabai pada sistem media dua-lapis (Dolcet-Sanjuan, et al., 1996). Sedangkan manitol memang tidak menjadi sumber karbon yang dapat dimanfaatkan, dan biasanya digunakan sebagai pengganti starvasi sumber karbon karena bersifat yang tidak dapat dimanfaatkan oleh mikrospora atau sel, seperti untuk kultur mikrospora tembakau (Touraev & Heberle-Bors, 1999).

Hasil untuk percobaan perlakuan kombinasi mulai dari stadia kuncup bunga yang responsif, media dasar terpilih NN, sumber karbon Maltosa 40 g/l, dan perlakuan suhu dingin (4-9°C) pada minggu pertama inkubasi kultur dilakukan menggunakan varietas Wilis. Hasil dari percobaan yang disajikan pada tabel 2 dan gambar 3 menunjukkan bahwa ketika hasil terbaik dari individu perlakuan dikombinasikan ternyata lebih efektif lagi untuk induksi pembelahan sporofitik. Hal ini menandakan adanya efek aditif positif untuk induksi pembelahan sporofitik, sehingga diharapkan dengan tambahan kombinasi dari hasil individual percobaan berikutnya akan lebih lagi meningkatkan efisiensi pembelahan sporofitik untuk mempermudah induksi ke arah embriogenesis yang berasal dari mikrospora (androgenesis).

Tabel 2. Penampilan hasil **kombinasi** dari individu perlakuan terbaik (media dasar NN – sumber karbon Maltosa (40 g/l) – suhu dingin (4-9°C) pada minggu pertama) terhadap perkembangan mikrospora dalam jumlah dan jenis inti pada varietas **Wilis** pada umur kultur 0, 1, 2, 3, dan 4 minggu setelah kultur.

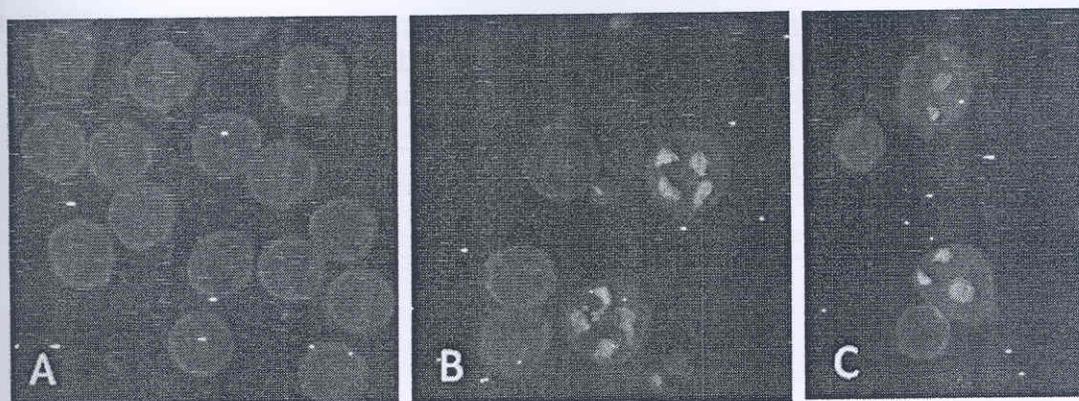
| Kombinasi perlakuan | Fase mikrospora atau jumlah dan jenis inti dalam mikrospora (%) | Umur kultur | | | | |
|---|---|-------------|-------------|-------------|------------|----------|
| | | Minggu-0 | Minggu-1 | Minggu-2 | Minggu-3 | Minggu-4 |
| (Media dasar NN ; Maltosa 40 g/l; Suhu 4-9°C pada minggu pertama) | EU-MU (1 inti) | 12.0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | LU (1 inti) | 77.6 | 49.2 | 20.5 | 16.1 | 5.4 |
| | EB (2 inti awal (v+g)) | 10.4 | 26.4 | 1.2 | 0 | 0 |
| | 1 inti v + 1-2 inti g | 0 | 4.8 | 21.2 | 12.9 | 4.0 |
| | 2v + 0-3 g | 0 | 22.9 | 3.5 | 8.6 | 0 |
| | ≥ 3 inti vegetatif | 0 | 1.6 | 16.3 | 4.8 | 0 |
| | Tidak ada inti (ke luar) | 0 | 0 | 37.4 | 57.4 | 90.9 |

Keterangan : EU-MU= Early/Mid Uninucleate; LU= Late Uninucleate; EB = Early Binucleate; v = inti vegetatif ; g = inti generatif

Tabel 3. Pengaruh praperlakuan kuncup bunga sumber eksplan pada suhu dingin (4-9°C) pada **Kombinasi** (media dasar NN – sumber karbon Maltosa (40 g/l) – suhu dingin (4-9°C) pada minggu pertama) terhadap perkembangan mikrospora dalam jumlah dan jenis inti pada varietas **Wilis** pada umur kultur 0, 1, 2, 3, dan 4 minggu setelah kultur.

| Praperlakuan suhu dingin (4-9°C) | Fase mikrospora atau jumlah dan jenis inti dalam mikrospora (%) | Umur kultur | | | | |
|----------------------------------|---|-------------|------------|------------|-------------|------------|
| | | Minggu-0 | Minggu-1 | Minggu-2 | Minggu-3 | Minggu-4 |
| 0 hari (kontrol) | EU-MU (1 inti) | 3.9 | 10.6 | 0 | 0.5 | 0 |
| | LU (1 inti) | 16.0 | 0.6 | 12.6 | 11.3 | 14.6 |
| | EB (2 inti awal (v+g)) | 54.7 | 39.1 | 43.2 | 25.5 | 21.3 |
| | 1 inti v + 1-2 inti g | 19.9 | 24.0 | 10.5 | 10.6 | 1.8 |
| | 2v + 0-3 g | 0 | 5.9 | 8.4 | 0.7 | 0 |
| | ≥ 3 inti vegetatif | 0 | 0 | 0.2 | 0.3 | 0 |
| | Tidak ada inti (ke luar) | 5.5 | 19.8 | 25.3 | 57.5 | 62.4 |
| 1 hari | EU-MU (1 inti) | 1.7 | 3.5 | 0 | 0 | 0.5 |
| | LU (1 inti) | 24.2 | 17.2 | 17.4 | 16.8 | 8.2 |
| | EB (2 inti awal (v+g)) | 49.3 | 42.4 | 19.3 | 5.3 | 1.6 |
| | 1 inti v + 1-2 inti g | 2.5 | 12.7 | 4.8 | 2.1 | 1.8 |
| | 2v + 0-3 g | 4.8 | 0 | 9.7 | 12.6 | 4.2 |
| | ≥ 3 inti vegetatif | 0 | 0 | 5.3 | 3.1 | 0.2 |
| | Tidak ada inti (ke luar) | 17.4 | 23.6 | 43.5 | 59.5 | 83.0 |
| 3 hari | EU-MU (1 inti) | 2.6 | 1.6 | 3.3 | 3.0 | 3.6 |
| | LU (1 inti) | 4.8 | 11.8 | 5.0 | 13.9 | 4.3 |
| | EB (2 inti awal (v+g)) | 13.6 | 27.2 | 4.3 | 17.2 | 2.5 |
| | 1 inti v + 1-2 inti g | 14.5 | 25.5 | 0.2 | 10.1 | 1.5 |
| | 2v + 0-3 g | 4.2 | 2.9 | 5.7 | 7.7 | 0 |
| | ≥ 3 inti vegetatif | 0 | 2.4 | 3.3 | 3.1 | 0 |
| | Tidak ada inti (ke luar) | 60.1 | 30.3 | 78.1 | 46.1 | 85.5 |
| 7 hari | EU-MU (1 inti) | 0.4 | 1.3 | 0 | 0.4 | 1.5 |
| | LU (1 inti) | 0 | 3.0 | 0.6 | 0.8 | 1.0 |
| | EB (2 inti awal (v+g)) | 3.6 | 19.7 | 1.5 | 0.8 | 0 |
| | 1 inti v + 1-2 inti g | 24.0 | 42.9 | 1.4 | 0.8 | 2.7 |
| | 2v + 0-3 g | 0.9 | 5.6 | 0.6 | 2.2 | 0 |
| | ≥ 3 inti vegetatif | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Tidak ada inti (ke luar) | 71.1 | 27.4 | 95.9 | 94.9 | 94.7 |

Keterangan : EU-MU= Early/Mid Uninucleate; LU= Late Uninucleate; EB = Early Binucleate; v = inti vegetatif ; g = inti generatif



Gambar 4. Pengaruh praperlakuan kuncup bunga sumber eksplan pada suhu dingin (4-9°C) selama satu hari sebelum kultur. A: keadaan mikrospora pada saat kultur; B: multiselular mikrospora >3 inti vegetatif pada umur kultur 2 minggu; C: proses keluarnya inti/sel dari dinding mikrospora dan lisis pada umur kultur 3 minggu. (Genotipe yang digunakan adalah varietas Wilis, sedangkan kultur menggunakan media dasar NN – sumber karbon Maltosa (40 g/l) – inkubasi suhu dingin (4-9°C) pada minggu pertama)

4.3. Pengaruh osmolaliti melalui perbedaan konsentrasi Maltosa

Perlakuan osmolaliti dengan konsentrasi Maltosa yang berbeda (0, 20, 40, 90, dan 120 mg/l) memperlihatkan pengaruh yang berbeda. Maltosa 20 mg/l ternyata sudah cukup dan bahkan cenderung lebih baik dari konsentrasi lainnya yang lebih tinggi dalam menginduksi pembelahan sporofitik. Bila dilihat dari pengaruhnya terhadap mikrospora yang akhirnya mengalami plasmolisis (persen mikrospora tanpa inti), penggunaan Maltosa yang lebih tinggi sampai 120 g/l pun tidak memperlihatkan perbedaan yang nyata dengan cukup hanya 20 g/l. Tidak perlunya konsentrasi sumber karbon yang tinggi pada kultur antera dengan sistem media dua-lapis juga dilaporkan oleh Dolcet-Sanjuan *et al.*, (1996) dan Supena *et al.*, (2006) untuk cabai. Hasil ini menggambarkan bahwa untuk kultur antera pada media dua-lapis tidak dibutuhkan larutan dengan tingkat osmotikum yang tinggi atau konsentrasi sumber karbon yang tinggi seperti untuk kultur isolasi mikrospora pada umumnya, misalnya dibutuhkan sukrosa sampai 130 g/l untuk kultur mikrospora *Brassica napus* (Lichter, 1982).

Tabel 4. Pengaruh perlakuan osmolaliti berbeda dengan konsentrasi Maltosa yang berbeda terhadap perkembangan mikrospora dalam jumlah dan jenis inti pada varietas **Sindoro** pada umur kultur 0, 1, 2, 3, dan 4 minggu setelah kultur.

| Maltosa (g/l) | Fase mikrospora atau jumlah dan jenis inti dalam mikrospora (%) | Umur kultur | | | | |
|---------------|---|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| | | Minggu-0 | Minggu-1 | Minggu-2 | Minggu-3 | Minggu-4 |
| 20 | EU-MU (1 inti) | 4.3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | LU (1 inti) | 51.0 | 29.8 | 31.5 | 9.5 | 4.4 |
| | EB (2 inti awal (v+g)) | 43.6 | 37.1 | 5.5 | 0 | 0 |
| | 1 inti v + 1-2 inti g | 0 | 11.5 | 1.2 | 0 | 0 |
| | 2v + 0-3 g | 0 | 6.6 | 4.1 | 11.1 | 0.9 |
| | ≥ 3 inti vegetatif | 0 | 0 | 10.9 | 6.6 | 0 |
| | Tidak ada inti (ke luar) | 1.1 | 15.0 | 46.0 | 74.7 | 94.7 |
| 40 | EU-MU (1 inti) | | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | LU (1 inti) | | 41.6 | 44.5 | 24.5 | 1.8 |
| | EB (2 inti awal (v+g)) | | 22.3 | 2.4 | 0 | 0 |
| | 1 inti v + 1-2 inti g | | 10.0 | 0 | 0 | 0.6 |
| | 2v + 0-3 g | | 19.8 | 4.6 | 5.6 | 0 |
| | ≥ 3 inti vegetatif | | 0 | 3.2 | 0 | 0.6 |
| | Tidak ada inti (ke luar) | | 6.3 | 45.4 | 69.8 | 95.8 |
| 90 | EU-MU (1 inti) | | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | LU (1 inti) | | 77.3 | 28.7 | 35.3 | 12.8 |
| | EB (2 inti awal (v+g)) | | 18.3 | 16.0 | 0 | 0.3 |
| | 1 inti v + 1-2 inti g | | 0 | 1.3 | 1.5 | 0.2 |
| | 2v + 0-3 g | | 0 | 4.0 | 0.2 | 0 |
| | ≥ 3 inti vegetatif | | 0 | 3.3 | 1.0 | 0.7 |
| | Tidak ada inti (ke luar) | | 4.5 | 46.6 | 62.0 | 84.4 |
| 120 | EU-MU (1 inti) | | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | LU (1 inti) | | 29.6 | 1.3 | 7.2 | 2.8 |
| | EB (2 inti awal (v+g)) | | 41.1 | 10.0 | 2.9 | 1.0 |
| | 1 inti v + 1-2 inti g | | 17.9 | 1.3 | 0 | 1.3 |
| | 2v + 0-3 g | | 3.2 | 15.3 | 4.7 | 2.7 |
| | ≥ 3 inti vegetatif | | 0 | 19.1 | 0.5 | 0 |
| | Tidak ada inti (ke luar) | | 8.3 | 53.1 | 84.8 | 73.1 |

Keterangan : EU-MU= Early/Mid Uninucleate; LU= Late Uninucleate; EB = Early Binucleate; v = inti vegetatif ; g = inti generatif

4.4. Pengaruh komposisi vitamin dan bahan organik

Hasil percobaan komposisi vitamin dan bahan organik dalam media kultur yang bersumber dari paket media dasar berbeda, yaitu media MS, media NN, media NLN, dan B5-long disajikan pada tabel 5. Hal yang menarik dari hasil ini bahwa tidak selamanya vitamin dan bahan organik yang lebih lengkap atau lebih kompleks akan berpengaruh positif terhadap perkembangan kultur. Vitamin dan bahan organik dari NN seperti yang sudah digunakan untuk kultur sebelumnya ternyata sudah cukup baik untuk keperluan induksi pembelahan sporofitik pada kultur antera kedelai dalam

sistemmedia dua-lapis. Penambahan vitamin dan bahan organik yang lebih lengkap, seperti penambahan glutation pada NLN tidak memberikan respon yang lebih baik, bahkan B5-long yang lebih kompleks lagi pun bahkan cenderung berefek negatif terhadap pembelahan sporofitik. Namun begitu, vitamin dan bahan organik MS yang lebih dan paling sederhana juga tidak memberikan efek lebih baik dari NN. Oleh karenanya vitamin dan bahan organik NN sudah baik untuk keperluan ini.

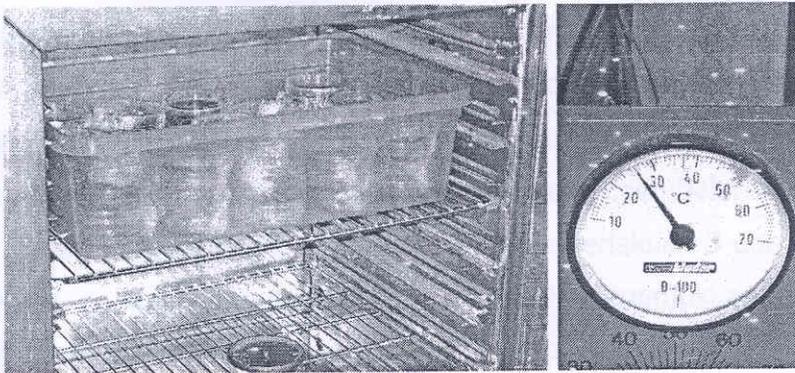
Tabel 5. Pengaruh perlakuan penambahan paket vitamin dan bahan organik terhadap perkembangan mikrospora dalam jumlah dan jenis inti pada varietas **Wilis** pada umur kultur 0, 1, 2, 3, dan 4 minggu setelah kultur.

| perlakuan jenis Vit + B.O. | Fase mikrospora atau jumlah dan jenis inti dalam mikrospora (%) | Umur kultur | | | | |
|----------------------------------|---|-------------|------------|-------------|------------|------------|
| | | Minggu-0 | Minggu-1 | Minggu-2 | Minggu-3 | Minggu-4 |
| NN | EU-MU (1 inti) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | LU (1 inti) | 16.3 | 9.6 | 0.5 | 3.8 | 0.7 |
| | EB (2 inti awal (v+g)) | 47.7 | 56.6 | 29.6 | 1.2 | 0 |
| | 1 inti v + 1-2 inti g | 25.6 | 23.8 | 0 | 0 | 0.4 |
| | 2v + 0-3 g | 1.2 | 9.2 | 24.9 | 6.9 | 1.9 |
| | ≥ 3 inti vegetatif | 0 | 0.8 | 8.2 | 0.7 | 0 |
| | Tidak ada inti (ke luar) | 9.3 | 0 | 36.8 | 87.4 | 97.0 |
| NLN | EU-MU (1 inti) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | LU (1 inti) | 34.5 | 21.1 | 0.3 | 0 | 0 |
| | EB (2 inti awal (v+g)) | 36.4 | 48.5 | 1.2 | 0 | 0 |
| | 1 inti v + 1-2 inti g | 15.3 | 20.9 | 0.6 | 0 | 0 |
| | 2v + 0-3 g | 0.5 | 3.7 | 1.2 | 0.6 | 0 |
| | ≥ 3 inti vegetatif | 0 | 0 | 0.6 | 1.5 | 0 |
| | Tidak ada inti (ke luar) | 8.3 | 5.8 | 96.2 | 97.9 | 100.0 |
| MS | EU-MU (1 inti) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | LU (1 inti) | 62.7 | 14.8 | 0.6 | 4.4 | 1.5 |
| | EB (2 inti awal (v+g)) | 21.5 | 40.6 | 0.9 | 0 | 0 |
| | 1 inti v + 1-2 inti g | 13.0 | 26.2 | 0.3 | 2.4 | 0 |
| | 2v + 0-3 g | 2.8 | 6.8 | 6.9 | 1.7 | 0.5 |
| | ≥ 3 inti vegetatif | 0 | 0 | 22.1 | 1.9 | 1.7 |
| | Tidak ada inti (ke luar) | 0 | 11.6 | 69.5 | 89.7 | 96.3 |
| B5-long | EU-MU (1 inti) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | LU (1 inti) | 29.8 | 25.5 | 30.0 | 4.9 | 0.4 |
| | EB (2 inti awal (v+g)) | 39.0 | 49.2 | 1.8 | 6.3 | 0.7 |
| | 1 inti v + 1-2 inti g | 27.0 | 21.2 | 0 | 0 | 0 |
| | 2v + 0-3 g | 3.0 | 0.7 | 3.0 | 2.8 | 0.7 |
| | ≥ 3 inti vegetatif | 0 | 0 | 6.0 | 5.7 | 0 |
| | Tidak ada inti (ke luar) | 1.1 | 3.5 | 59.3 | 80.3 | 98.2 |

Keterangan : EU-MU= Early/Mid Uninucleate; LU= Late Uninucleate; EB = Early Binucleate; v = inti vegetatif ; g = inti generatif
Untuk Vitamin dan Bahan Organik adalah NN (Nitsch & Nitsch, 1969), media NLN (Lichter, 1982), MS (Murashige & Skoog, 1962), dan B5 long (Gamborg *et al.*, 1968; Hu *et al.*, 1996).

4.5. Pengaruh zat pengatur tumbuh 2,4-D dan BA dan temperatur inkubasi

Percobaan memperkaya medium dengan menambahkan zat pengatur tumbuh tabaman sintetis, yaitu perimbangan auksin dan sitokinin dengan kombinasi 2,4-D dan BA, masih dalam tahap pelaksanaan Gambar 5. Sedangkan untuk percobaan perlakuan temperatur inkubasi masih dalam proses persiapan.



Gambar 5. Kultur pada fase inkubasi dalam inkubator suhu 28°C dalam kondisi gelap

4.6. Perlakuan kombinasi seluruh hasil percobaan tahun 2009 dan 2008

Perlakuan kombinasi semua individual percobaan yang berespon positif dan terbaik, baru akan dapat dilakukan setelah percobaan kombinasi 2,4-D dan BA, serta percobaan temperatur inkubasi dapat diselesaikan. Berdasarkan dari hasil kombinasi rangkaian percobaan pertama yang berespon positif, sangat berharaf dan optimis dengan tambahan kombinasi dari rangkaian percobaan tahun kedua ini akan lebih meningkatkan efisiensi induksi pembelahan sporofitik sehingga meningkatkan kemungkinan untuk berkembang lebih lanjut ke arah induksi embriogenesis sehingga dihasilkan embrio dari mikrospora (anrogenesis).

5. KESIMPULAN

Baik pada kedelai varietas Wilis, Slamet maupun Sindoro, penambahan Maltosa 40 g/l sebagai sumber karbon memberikan respon lebih baik terhadap pembelahan sporofitik mikrospora daripada Sukrosa 40 g/l maupun Manitol 55 g/l. Kombinasi kultur menggunakan media dasar NN, sumber karbon Maltosa (40 g/l), dan inkubasi pada suhu dingin (4-9°C) minggu pertama kultur, terbukti merupakan kombinasi terbaik untuk induksi pembelahan sporofitik pada varietas Wilis.

Praperlakuan kuncup bunga sumber eksplan pada suhu dingin (4-9°C) selama satu hari sebelum isolasi antera dan dikultur pada kombinasi perlakuan hasil sebelumnya, terbukti dapat lebih menginduksi inisiasi pembelahan sporofitik daripada kontrol (tanpa praperlakuan) ataupun dengan praperlakuan 3 dan 7 hari. Percobaan pengkayaan dengan vitamin dan bahan organik menunjukkan bahwa vitamin dan bahan organik dari media dasar NN sudah cukup, tidak perlu lebih diperkaya seperti pada paket vitamin dan bahan organik NLN maupun B5-long, atau yang lebih sederhana seperti pada media MS. Percobaan osmolaliti dengan konsentrasi maltosa yang berbeda menunjukkan bahwa Maltosa 20 g/l dan 40 g/l lebih baik dari pada Maltosa 90 g/l dan 120 g/l, untuk kultur berikutnya Maltosa 20 g/l sudah cukup.

Percobaan pengkayaan medium dengan penambahan kombinasi zat pengatur tumbuh 2,4-D dan BA, dan percobaan temperatur inkubasi kultur masih dalam tahap pelaksanaan, sedangkan uji kombinasi akhir berbagai perlakuan terpilih baru dapat dilaksanakan setelah semua individu percobaan selesai

6. PERKIRAAN DAMPAK HASIL KEGIATAN

Dengan telah diperolehnya tahapan awal menuju induksi androgenesis yaitu induksi pembelahan sporofitik dan terus dapat ditingkatkan frekuensinya, hal ini mengindikasikan bahwa pengembangan teknologi haploid kedelai melalui kultur antera pada media dua-lapis berpotensi untuk berhasil. Bila teknologi haploid untuk kedelai ini dapat berhasil dikembangkan, maka program pemuliaan tanaman kedelai, khususnya dalam proses seleksi dan pembentukan galur murni dapat dipercepat atau dipersingkat secara signifikan. Sehingga akan berdampak pada peningkatan efisiensi dan efektivitas program pemuliaan kedelai, yang pada akhirnya dapat mendukung upaya peningkatan produktivitas kedelai di Indonesia melalui pengembangan benih dan varietas berkualitas secara cepat untuk menuju swasembada kedelai.

7. DAFTAR PUSTAKA

- Badan Litbang Pertanian – Deptan (2005) Prospek dan Arah Pengembangan Agribisnis Kedelai. Badan Litbang Pertanian, Jakarta.
- Barcaccia G, Tomassini C & Falcinelli M (1999) Further cytological evidence on the androgenesis pathway in pepper (*Capsicum annuum* L.). *J Genet Breed* 53: 251-254.
- BPS (Badan Pusat Statistika) (2009) Produksi Tanaman Pangan 2008. http://www.bps.go.id/tnmn_pgn.php?eng=0 [04 Desember 2009].
- Cheng T, Saka H & Voqui-Dinh TH (1980) Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture. *Plant Sci Lett* 19: 91-99.
- Custers JBM, Cordewener JHG, Nöllen Y, Dons HJM & van Lookeren Campagne MM (1994) Temperature controls both gametophytic and sporophytic development in microspore cultures of *Brassica napus*. *Plant Cell Rep* 13: 267-271.
- Custers JBM, Cordewener JHG, Fiers MA, Maassen BTH, van Lookeren Campagne MM & Liu CM (2001) Androgenesis in *Brassica*: A model system to study the initiation of plant embryogenesis, pp.451-470. In: Bhojwani SS & Soh WY (eds), *Current Trends in Embryology of Angiosperms*. Kluwer, Dordrecht.
- da Silva Lauxen M, Kalthuc-Santos E, Yeh-Hu C, Callegari-Jacques SM, Bonadese-Zanettini MH. 2003. Association between floral bud size and developmental stage in soybean microspores. *Braz Arch of Biol and Technol* 46:515-520.
- Dolcet-Sanjuan R, Claveria E & Huerta A (1997) Androgenesis in *Capsicum annuum* L.-effects of carbohydrate and carbon dioxide enrichment. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 122: 468-475.
- FAO (2007) Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nation, FAOSTAT Database. <http://faostat.fao.org/faostat>.
- Ferrie AM, Palmer CE & Keller WA (1994) Biotechnological application of haploids, pp. 77-110. In: Shargool PD & Ngo TT (eds), *Biotechnological Applications of Plant Cultures*. CRC, Boca Raton.
- Finnie SJ, Powell W, Dyer AF (1989) The effect carbohydrate composition and concentration on anther culture response in barley (*Hordeum vulgare* L.) *Plant Breeding* 103: 110-118.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension culture of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50:151-158.
- Gémesné JA, Sági ZS, Salamon P, Somogyi N, Zatykó L & Venzcel G (1998) Experiences and results of *in vitro* haploid methods application in pepper breeding programme, pp 201-205. Proceedings of the Xth Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant, Avignon, France, Sept. 7-11, 1988.

- Hu C-Y, Yin G-C & Zanettini MHB (1996) Haploid of soybean. In: Jain SM, Sopory SK & Veilleux (eds) *In Vitro Haploid Production in Higher Plants*. Kluwer, Dordrecht.
- Jansen CJ (1974) Chromosome doubling techniques in haploids, pp. 153-190. In: Kasha KJ (ed.), *Haploids in Higher Plants, Advances and Potential*. Proceeding of the First International Symposium, Guelph, Ontario, June 10-14, 1974.
- Kaltchuk-Santos E, Meriath JE, Mundstock E, Hu C-Y & Bodanese-Zanettini MH (1997) Cytological analysis of early microspore divisions and embryo formation in culture soybean anthers. *Plant Cell Tiss Org Cult* 49: 107-115.
- Kartha KK, Pahl K, Leung NL & Mroginski LA (1981) Plant regeneration from meristems of grain legumes: soybean, cowpea, peanut, chickpea, and bean. *Can J Bot* 59: 1671-1679.
- Kasha KJ, Simon E, Oro R & Shim YS (2003) Barley isolated and microspore culture protocol, pp.43-47. In: Maluszynski M *et al.* (eds) *Doubled Haploid Production in Crop Plant*. Kluwer, Dordrech.
- Kim M, Kim J, Yoon M, Choi DI & Lee KM (2004) Origin of multicellular pollen and pollen embryos in cultured anthers of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Tiss Org Cult* 77: 63-72.
- Moraes AP, Bodanese-Zanettini MH, Callegari-Jaques SM & Kaltchuk-Santos E (2004) Effect of temperature shock on soybean microspore embryogenesis. *Braz Arch Biol Technol* 47: 537-544.
- Murashige T & Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Nitsch JP & Nitsch C (1969) Haploid plants from pollen grains. *Science* 163: 85-85.
- Palmer CE & Keller WA (1999) Haploidy, pp. 247-286. In: Gómez-Campo C (ed) *Biology of Brassica Coenospecies*. Amsterdam: Elsevier.
- Phillips GC, Collins GB (1980) In vitro culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. *Crop Sci* 19:59-64.
- Rock CD & Quatrano RS (1995) The role of hormones during seed development, pp. 671-697. In: Davies PJ (ed) *Plants Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Dordrecht: Kluwer.
- Rodrigues LR, Oliviera JMS, Mariath JEA, Iranço LB & Bodanese-Zanettini MH (2006) Anther culture and cold treatment of floral buds increase symmetrical and extra nuclei frequencies in soybean pollen grains. *Plant Cell Tiss Org Cult* 81: 101-104.
- Rodrigues LR, Forte BdC & Bodanese-Zanettini MH (2006) Isolation and culture of soybean (*Glycine max* L. Merrill) microspore and pollen grains. *Braz Arch Biol Technol* 49: 537-545.

- Rokka VL, Leena P, Eija P. 1996. Enhanced production of dihaploid lines via anther culture of tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L. spp. Tuberosum) clones. Amer Potato J 73:1-12.
- Santos KGB, Mariath JEdA, Moco MCC, Bodanese-Zanettini MH (2006) Somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean (*Glycine max* L. Merr.): ontogeny of somatic embryo. Braz Arch Biol Technol 49: 49-55.
- Scott P, Lyne RL, Rees T. 1995. Metabolism of maltose and sucrose by microspores isolated from barley (*Hordeum vulgare* L.) *Planta* 197:435-441.
- Snider KT, Veilleux RE. 1994. Factors affecting variability in anther culture and in conversion of androgenetic embryos of *Solanum phureja*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 36:345-354.
- Stasolla C, Yeung EC. 2003. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. *Plant Cell Tiss Org Cult* 74:15-35.
- Sumarno (1983) Teknik Pemuliaan Kedelai. Pusat Litbang Tanaman Pangan, Bogor.
- Supena EDJ, Suharsono S, Jacobsen E & Custers JBM (2006) Successful development of shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot peppers (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Rep* 25:1-10.
- Touraev A, Vicente O & Heberle-Bors E (1997) Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Trend Plant Sci.* 2: 297-302
- Touraev A & Heberle-Bors E (1999) Microspore embryogenesis and *in vitro* pollen maturation in tobacco, pp 281-291. *In: Hall RD (ed) Methods in Molecular Biology, Vol.111: Plant Cell Culture Protocols.* Humana, Totowa, NJ.
- Zulkarnain (2005) Pengaruh pra-perlakuan stress pada kultur antera empat kultivar kedelai. *J Akta Agrosia* 8: 56-61.