

Reaksi Embrio Somatik Kedelai terhadap Polietilena Glikol dan Penggunaannya untuk Seleksi *In Vitro* terhadap Cekaman Kekeringan

Responses of Soybean Somatic Embryos to Polyethylene Glycol and Its Uses for In Vitro Selection of Soybean Against Drought Stress

WAHYU WIDORETNO^{1*}, RITA MEGIA², SUDARSONO^{1*}

¹Departemen Budi Daya Pertanian, Faperta, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor 16680

²Departemen Biologi, FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Jalan Raya Pajajaran, Bogor 16144

Diterima 7 Maret 2003/Disetujui 23 Agustus 2003

The objectives of this experiment were to determine the ability of polyethylene glycol (PEG) to suppress soybean somatic embryos (SE) regeneration, to determine the use PEG as selective agent in the medium, and the regeneration of plantlet from *in vitro* selected SE on medium containing PEG. To determine the effect of PEG on regeneration, SE from three soybean genotypes B3731, Tidar and MSC8606 were subjected to selective medium containing 0, 5, 10, 15, and 20% PEG. *In vitro* selection to identify variant SE, that were tolerance to stress condition due to PEG, was conducted by exposing SE of soybean genotypes B3731, MLG2999, and MSC8606 directly to the medium containing 20% PEG for three months or by subjecting them subsequently to 10%, 15% or 20% PEG, each for one month period, respectively. The secondary somatic embryos developed from explants on the selective medium were germinated and regenerated. The results showed that selective medium containing PEG inhibited soybean SE development. The sub-lethal level (lethal dose > 95%) were identified at concentration of 20% PEG. Direct selection at 20% PEG resulted in less SE survival than that through stepwise increased of PEG concentration. However, the results of the later approach of *in vitro* selection gave more escaped. At the end *in vitro* selection, 98 plantlets were regenerated from SE that tolerated stress condition due to PEG. The plantlets were grown in the glass house to produce SC2 and SC3 generation of seeds.

PENDAHULUAN

Salah satu kendala yang dihadapi dalam budi daya kedelai di Indonesia ialah penurunan hasil kedelai akibat cekaman kekeringan. Adanya cekaman kekeringan dalam setiap periode pertumbuhan dan perkembangan tanaman kedelai dapat menurunkan hasil meskipun besarnya penurunan yang terjadi bergantung pada fase pertumbuhan saat cekaman kekeringan terjadi (Budianto *et al.* 1984). Tersedianya galur kedelai yang toleran diharapkan dapat mengatasi kendala akibat cekaman tersebut.

Tanaman hasil kultur *in vitro* tidak selalu seragam (klonal), tetapi dapat bervariasi akibat terjadinya mutasi pada sel somatik yang beregenerasi menjadi tanaman (Maralappanavar *et al.* 2000; Seliskar & Gallagher 2000). Variasi di antara populasi tanaman hasil kultur *in vitro* tersebut terjadi akibat fenomena variasi somaklonal (Larkin & Scowcroft 1981). Galur varian somaklonal yang mempunyai karakter unggul tertentu seperti resisten terhadap penyakit atau toleran terhadap cekaman lingkungan telah berhasil didapatkan (Remotti *et al.* 1997; Claxton *et al.* 1998; Mercado *et al.* 2000; Mohamed *et al.* 2000).

Tersedianya teknik *in vitro* yang efektif untuk meregenerasikan planlet dalam jumlah banyak dan menghasilkan populasi tanaman varian somaklonal merupakan salah satu syarat keberhasilan penerapan seleksi *in vitro* untuk mendapatkan galur varian somaklonal dengan sifat unggul tertentu. Seleksi *in vitro* telah digunakan untuk menghasilkan galur varian tanaman tembakau, padi, sorgum, dan mulberi toleran cekaman kekeringan (Sumaryati *et al.* 1992; Adkins *et al.* 1995; Duncan *et al.* 1995; Tewary *et al.* 2000). Selain menghemat waktu dan ruangan, tekanan seleksi terhadap sel atau jaringan dapat diberikan secara homogen sehingga diharapkan lebih efisien.

Metode yang efektif untuk induksi embrio somatik (ES) primer dan sekunder dari eksplan kotiledon dan regenerasi tanaman kedelai *in vitro* (Widoretno *et al.* 2003) dapat membantu untuk menghasilkan tanaman varian somaklonal kedelai.

Senyawa polietilena glikol (PEG) dilaporkan dapat menurunkan potensial air media untuk mendapatkan tanaman varian yang toleran cekaman kekeringan (Kaur *et al.* 1998) dan telah dilakukan pula pada tanaman padi, sorgum, dan anggur (Adkins *et al.* 1995; Duncan *et al.* 1995; Dami & Hughes 1997). Hasil penelitian menunjukkan adanya korelasi positif antara toleransi sel atau jaringan yang dikulturkan *in vitro* terhadap PEG dengan toleransi tanaman terhadap cekaman kekeringan di lapangan. Penelitian ini bertujuan mendapatkan varian somaklonal kedelai yang toleran kekeringan.

*Alamat kini: Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Brawijaya, Jalan Veteran 16, Malang 65145

*Penulis untuk korespondensi, Tel./Fax. +62-251-629353, E-mail: sudarsono@biotrop.org

BAHAN DAN METODE

Bahan. Genotipe kedelai yang digunakan yaitu kedelai B3731, MLG2999 (toleran), kultivar Tidar (moderat), dan MSC8606 (peka) terhadap cekaman kekeringan (Jusuf *et al.* 1993; Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian 1997). Benih kedelai yang digunakan diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Kacang-kacangan dan Umbi-umbian (Balitkabi), Malang dan Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetika (Balitbiogen), Bogor. Benih ditanam dalam pot plastik dengan volume 5000 ml yang berisi media campuran tanah, pasir, pupuk kandang (1:1:1) dan dipelihara sampai menghasilkan polong muda (45 hari setelah tanam). Polong muda dipanen untuk diambil kotiledonnya yang digunakan sebagai eksplan dalam percobaan selanjutnya.

Inisiasi dan Pemeliharaan Embrio Somatik. Embrio somatik primer diinduksi dari kotiledon muda kedelai dalam media MS (Murashige & Skoog 1962) yang dimodifikasi dengan penambahan vitamin B5 (Gamborg *et al.* 1968), sukrosa 15 g/l, agar-agar 6 g/l, dan 2,4-D 40 ppm. ES primer dikulturkan dalam media tersebut di atas dengan penambahan NAA dan 2,4-D masing-masing 10 ppm untuk memperoleh ES sekunder berumur satu bulan yang akan digunakan untuk berbagai uji lanjut.

Pengaruh PEG terhadap Perkembangan ES Kedelai. Untuk mengevaluasi pengaruh penambahan PEG dalam media induksi ES terhadap perkembangan ES kedelai, eksplan ES sekunder (B3731, Tidar, dan MSC8606) umur satu bulan dikulturkan dalam media cair yang terdiri atas garam makro dan mikro penyusun media MS, vitamin B5, sukrosa 15 g/l, NAA dan 2,4-D masing-masing 10 ppm, dan dengan penambahan berbagai konsentrasi PEG (BM 6000), yaitu 5%, 10%, 15%, dan 20% yang masing-masing menghasilkan tekanan osmotik dalam media sebesar -0.03, -0.19, -0.41, dan -0.67 MPa (Mexal *et al.* 1975).

Untuk mencegah agar eksplan tidak tenggelam, eksplan yang dikulturkan diletakkan di atas busa sintesis yang dilapisi satu lapis kertas saring dan diambangkan dalam media cair. Setelah penambahan PEG, busa sintesis dan kertas saring, media selektif disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1.5 psi selama 30 menit.

Percobaan disusun menggunakan rancangan acak lengkap dan setiap unit percobaan terdiri atas 10 eksplan yang dikulturkan dalam satu botol. Setiap eksplan yang digunakan merupakan segumpal kalus embriogenik dengan 3-4 ES sekunder. Setiap perlakuan diulang sebanyak 10 kali (10 botol) sehingga total eksplan yang dikulturkan untuk setiap perlakuan PEG dari masing-masing genotipe kedelai yang diuji mencapai 100 eksplan.

Perkembangan eksplan dalam kultur diamati empat minggu setelah eksplan dikulturkan dalam media selektif. Pengamatan dilakukan terhadap pertumbuhan dan perkembangan eksplan yang dikulturkan, persentase eksplan yang hidup, dan jumlah ES sekunder baru yang terbentuk per eksplan. Konsentrasi PEG subletal ditentukan berdasarkan pada reaksi perkembangan eksplan yang dikulturkan dalam media dengan penambahan PEG. Batasan dari konsentrasi PEG subletal ditetapkan menurut Nabors dan Dykes (1985), yaitu konsentrasi PEG yang dapat menghambat pertumbuhan normal ES minimal sampai dengan 95% ($LD > 95\%$).

Seleksi *In Vitro* dalam Media yang Mengandung PEG. Konsentrasi PEG subletal yang telah didapat pada percobaan

sebelumnya digunakan untuk menyeleksi dan mengidentifikasi keberadaan varian ES yang toleran terhadap kekeringan akibat penambahan PEG dalam media selektif. Varian ES yang diseleksi ialah genotipe kedelai B3731, MLG 2999, dan MSC8606.

Identifikasi varian ES yang toleran kondisi selektif diseleksi secara langsung dan bertahap. Untuk seleksi langsung, eksplan kedelai dikulturkan langsung dalam media selektif yang mengandung konsentrasi PEG subletal (20% PEG) selama tiga bulan. Selama periode tersebut eksplan disubkultur ke media selektif yang masih segar setiap satu bulan. Untuk seleksi bertahap, eksplan dikulturkan bertahap dalam media selektif yang mengandung 10, 15, dan 20% PEG masing-masing selama satu bulan. Sebagai perlakuan kontrol digunakan media regenerasi ES tanpa penambahan PEG.

Untuk setiap genotipe kedelai yang diuji dan untuk masing-masing cara seleksi dikulturkan 600 eksplan dalam 60 botol (10 eksplan/botol). Selama periode seleksi, kultur diinkubasi dalam kondisi gelap dalam ruang kultur yang bersuhu 25° C. Jumlah eksplan yang tetap hidup dan rata-rata jumlah ES yang berkembang per eksplan yang dikulturkan diamati selama tiga bulan dengan selang pengamatan satu bulan.

Regenerasi Tanaman dari Varian ES Toleran Cekaman PEG. ES yang terbentuk dalam media selektif dengan penambahan PEG dipindahkan ke media maturasi sehingga terbentuk ES yang sempurna. Selanjutnya ES yang didapat dikecambahkan dalam media perkecambahan ES dan diregenerasikan menjadi planlet. Baik untuk percobaan inisiasi dan pemeliharaan ES maupun untuk regenerasi tanaman dari varian ES toleran terhadap cekaman PEG, digunakan tahapan metode menurut Widoretno *et al.* (2003). Kultur diinkubasi dalam ruang kultur bersuhu 25°C dengan pencahayaan 1000 lux selama 24 jam. Perkembangan ES dan jumlah planlet yang didapat diamati selama periode inkubasi.

HASIL

Pengaruh PEG terhadap Perkembangan ES Kedelai. Media selektif dengan penambahan PEG menghambat pertumbuhan dan perkembangan eksplan dan menurunkan jumlah ES yang terbentuk (Tabel 1 & Gambar 1). Dengan meningkatnya konsentrasi PEG yang ditambahkan dalam media selektif, pengaruh negatif PEG terhadap perkembangan ES sekunder yang diamati juga semakin meningkat (Tabel 2 & Gambar 2).

Persentase eksplan yang tetap hidup dan mampu berkembang membentuk ES pada media selektif dengan 5% atau 10% PEG untuk kultivar Tidar dan genotipe kedelai MSC8606 tidak berbeda nyata dengan perlakuan kontrol (0% PEG). Perbedaan yang nyata dengan kontrol untuk persentase eksplan yang tetap hidup baru terlihat pada perlakuan 15% PEG. Sedangkan untuk genotipe kedelai B3731, penurunan persentase eksplan yang tetap hidup baru terjadi pada perlakuan 20% PEG. Tetapi jumlah ES yang terbentuk secara nyata menurun pada perlakuan 5% PEG (Gambar 2).

Pada perlakuan 15% PEG, persentase eksplan B3731 (genotipe kedelai toleran) yang hidup masih tinggi, yaitu sebanyak 90%, sedangkan untuk varietas Tidar (genotipe kedelai moderat) dan MSC8606 (genotipe kedelai peka) lebih rendah, yaitu masing-masing hanya 54% dan 30% (Tabel 2 & Gambar 2). Jumlah ES yang terbentuk per eksplan pada B3731 dalam kondisi selektif

juga lebih banyak dibandingkan dengan Tidar dan MSC8606. Pada pemberian 20% PEG, persentase eksplan kedelai yang hidup dan membentuk ES dari B3731 juga lebih tinggi dibandingkan dengan Tidar dan MSC8606.

Konsentrasi PEG subletal didefinisikan sebagai perlakuan PEG yang menurunkan eksplan kedelai yang hidup atau jumlah ES per eksplan kedelai minimal sebesar 95% dibandingkan dengan perlakuan kontrol. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa konsentrasi PEG subletal untuk ketiga genotipe kedelai yang diuji berbeda. Konsentrasi subletal untuk genotipe kedelai B3731 dan Tidar belum tercapai dengan perlakuan 20% PEG. Sebaliknya untuk MSC8606 (genotipe kedelai peka) konsentrasi subletal telah dicapai pada perlakuan 20% PEG (Tabel 1). Berdasarkan hasil yang diperoleh, untuk percobaan seleksi *in vitro*, perlakuan 20% PEG digunakan sebagai konsentrasi subletal yang ditambahkan ke dalam media selektif.

Seleksi *In Vitro* dalam Media yang Mengandung PEG. Sebagian besar eksplan kedelai yang diseleksi secara langsung dalam media dengan penambahan 20% PEG (konsentrasi subletal) menjadi cokelat kehitaman dan mati. Pada sebagian eksplan kedelai yang lain, di antara jaringan yang mati muncul jaringan yang berkembang membentuk struktur ES atau kalus embriogenik kedelai berwarna putih kekuningan (Gambar 3). Kalus embriogenik dan ES kedelai terseleksi ini diduga berkembang dari sel atau jaringan varian kedelai yang dapat hidup dalam kondisi selektif akibat penambahan 20% PEG.

Persentase eksplan kedelai yang hidup dan menghasilkan ES serta jumlah ES yang terbentuk per eksplan kedelai dalam seleksi *in vitro* secara bertahap jauh lebih banyak dibandingkan dengan seleksi langsung (Tabel 2).

Regenerasi Planlet dari ES Hasil Seleksi. Setelah dipisahkan dari jaringan yang mati dan dikulturkan dalam media maturasi, dikecambahkan, dan diregenerasikan menjadi planlet, hanya sebagian kecil dari ES hasil seleksi yang toleran

terhadap cekaman berhasil membentuk planlet normal. Sebagian besar ES hasil seleksi berkembang membentuk planlet yang abnormal (Gambar 3), terutama untuk ES hasil seleksi dari genotipe kedelai MSC8606.

Dari genotipe kedelai B3731 berhasil diperoleh 25 planlet varian somaklonal yang diregenerasikan dari ES hasil seleksi *in vitro* secara bertahap dan 14 planlet dari ES hasil seleksi secara langsung dalam media yang mengandung PEG. Untuk genotipe kedelai MLG2999 masing-masing diperoleh 33 planlet hasil seleksi bertahap dan 14 planlet hasil seleksi langsung, sedangkan untuk kedelai MSC8606 hanya diperoleh 12 planlet hasil seleksi bertahap. Tanaman varian somaklonal MSC8606 yang diregenerasikan dari ES kedelai hasil seleksi secara langsung tidak berhasil diperoleh karena ES yang dikecambahkan membentuk planlet abnormal.

PEMBAHASAN

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa penambahan PEG ke dalam media untuk menginduksi pembentukan ES bersifat menghambat terhadap kemampuan eksplan membentuk ES. Tingkat penghambatan yang terjadi mempunyai pola yang berbeda untuk genotipe kedelai yang toleran dan peka cekaman kekeringan.

Potensial osmotik media tumbuh merupakan faktor penting yang berpengaruh terhadap proses pembentukan ES dalam kultur *in vitro*. Penurunan potensial air media akibat penambahan PEG diduga merupakan penyebab pengaruh negatif PEG terhadap pembentukan ES dari eksplan kedelai. PEG dalam media telah dilaporkan menurunkan proliferasi, pertumbuhan jaringan eksplan, dan regenerasi tunas (Kong *et al.* 1998; Tewary *et al.* 2000). Mekanisme penghambatan tersebut diduga terjadi karena kondisi cekaman akibat perlakuan PEG menyebabkan perubahan kandungan poliamina endogen dalam jaringan eksplan. Kandungan poliamina endogen telah dilaporkan berperan penting dalam pembentukan ES dari eksplan karet (El Hadrami & D'Auzac 1992), wortel (Bastola & Minocha 1995), dan *Picea glauca* (Kong *et al.* 1998) secara *in vitro*.

Kemampuan PEG untuk menurunkan potensial air diharapkan dapat berfungsi sebagai kondisi selektif untuk menduga reaksi jaringan yang dikulturkan terhadap cekaman kekeringan dan mengisolasi sel atau jaringan varian yang mempunyai fenotipe cekaman toleran. Keefektifan PEG untuk

Tabel 1. Pengaruh Polietilena Glikol dalam media selektif terhadap nilai indeks relatif terhadap kontrol untuk jumlah eksplan yang hidup dan embrio somatik (ES) sekunder yang terbentuk per eksplan dan persentase penurunannya dari tiga genotipe kedelai

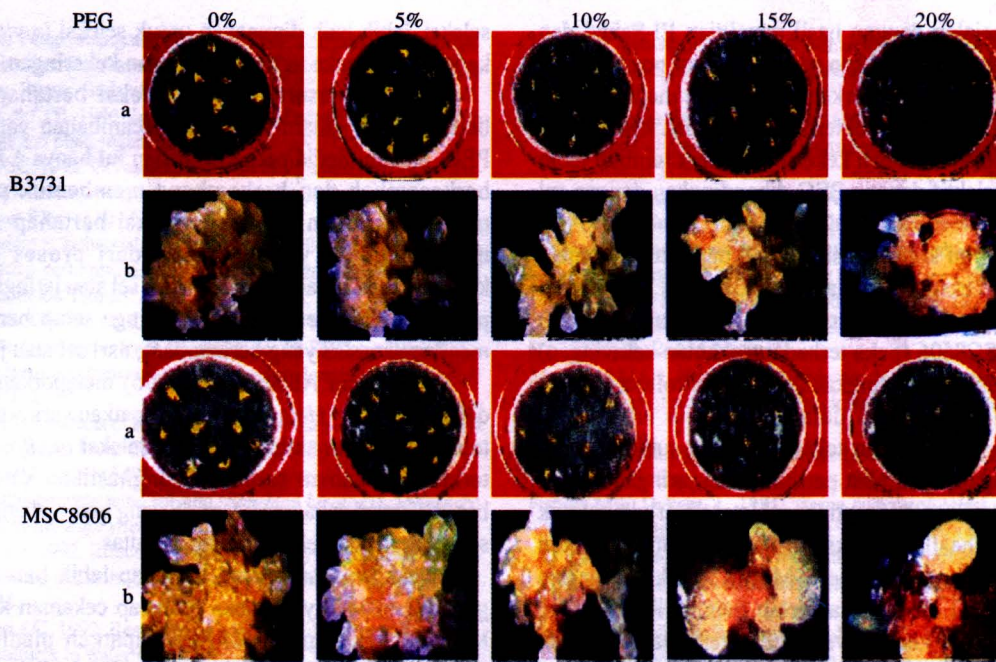
Genotipe kedelai		Eksplan yang hidup*		ES per eksplan*	
		Indeks relatif (%)	Penurunan (%)	Indeks relatif (%)	Penurunan (%)
B3731	0	100	0	100	0
	5	100	0	75	25
	10	98	2	38	62
	15	91	9	32	68
	20	46	54	10	90
Tidar	0	100	0	100	0
	5	101	-1	86	14
	10	98	2	59	41
	15	56	44	16	84
	20	40	60	11	89
MSC8606	0	100	0	100	0
	5	99	1	66	34
	10	95	5	40	60
	15	31	69	6	94
	20	16	84	4	96

*Indeks relatif dihitung berdasarkan pada rumus $(ES_i/ES_0) \times 100\%$, penurunan dihitung menggunakan rumus $[1 - (ES_i/ES_0)] \times 100\%$, dengan ES_0 merupakan reaksi pada media selektif dengan PEG dan ES_i merupakan reaksi pada media kontrol

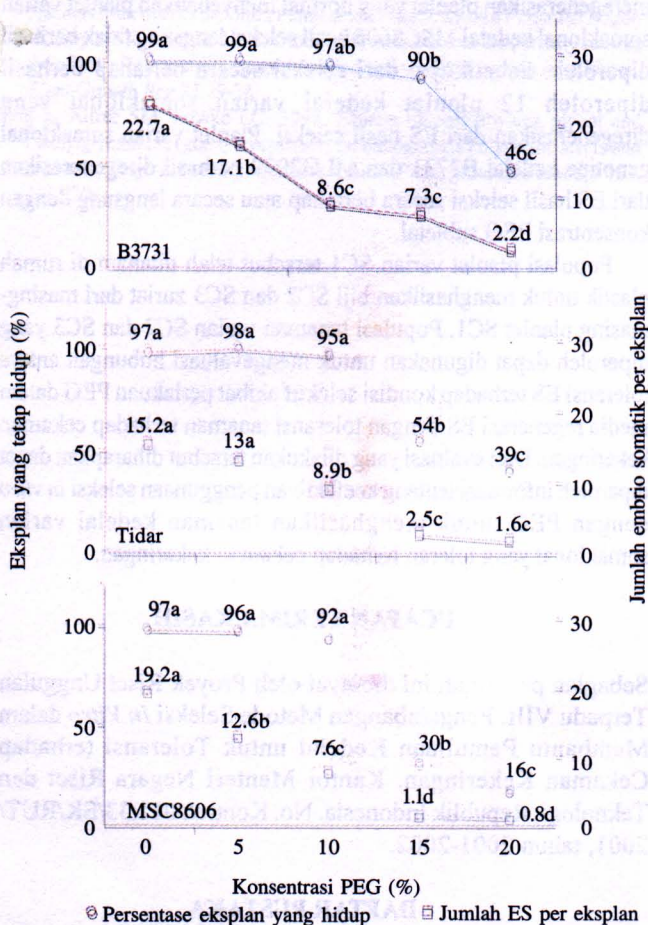
Tabel 2. Pertumbuhan dan perkembangan eksplan embrio somatik dari tiga galur kedelai yang dikulturkan dalam media selektif dengan konsentrasi PEG subletal secara langsung atau secara bertahap

Genotipe kedelai	Metode seleksi	% eksplan yang hidup			Jumlah ES per eksplan			Jumlah ES pada akhir seleksi*
		Sub-1	Sub-2	Sub-3	Sub-1	Sub-2	Sub-3	
B3731	Bertahap	93	98	54	7.2	6.1	2.3	2027
	Langsung	47	37	60	2.1	1.8	1.6	69
MLG2999	Bertahap	87	96	65	7.7	7.0	2.0	1375
	Langsung	59	44	61	3.7	1.9	1.9	78
MSC8606	Bertahap	94	71	26	5.4	3.4	1.4	308
	Langsung	43	17	33	1.8	1.4	1.0	3

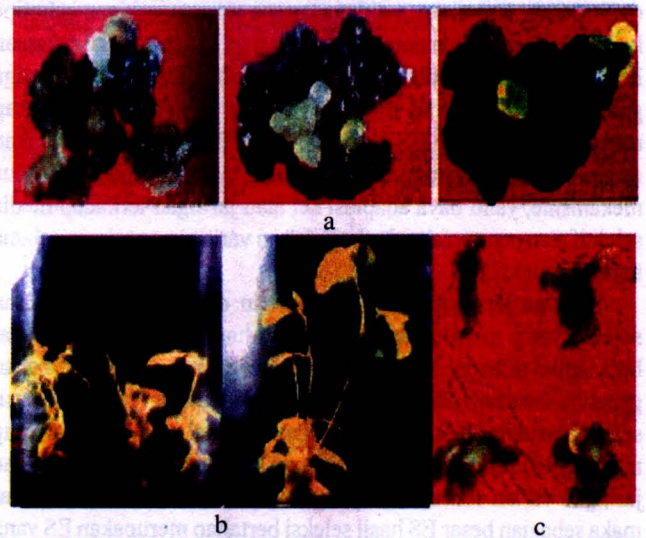
Sub-1, sub-2, sub-3: hasil pengamatan yang dilakukan setelah subkultur ke- 1, 2, atau 3. Subkultur ke media selektif yang masih segar dilakukan setiap satu bulan. *Dihitung setelah tiga bulan dalam media selektif



Gambar 1. Reaksi pertumbuhan dan perkembangan embrio somatik kedelai B3731 (toleran) dan MSC8606 (peka terhadap kekeringan) yang dikulturkan dalam media selektif dengan PEG. a. Penampakan eksplan setelah ditanam dalam media seleksi selama tiga bulan, b. Perkembangan eksplan embrio somatik hasil seleksi (perbesaran 40^x).



Gambar 2. Persentase eksplan yang bertahan hidup dan jumlah embrio somatik sekunder yang terbentuk dari eksplan tiga genotipe kedelai setelah dikulturkan dalam media selektif yang mengandung PEG 0, 5, 10, 15, dan 20%.



Gambar 3. Perkembangan eksplan yang dikulturkan dalam media selektif dengan PEG dan regenerasi planlet dari ES terseleksi: a. Sebagian besar eksplan mengalami kematian, pada eksplan yang mati berkembang ES yang diduga berasal dari sel toleran; b. Hasil regenerasi planlet normal; dan c. Planlet abnormal.

menyebutkan bahwa reaksi tanaman kedelai terhadap cekaman kekeringan secara *in vitro* telah diuji dengan mengevaluasi kemampuan membentuk ES berbagai genotipe kedelai yang toleran dan peka terhadap cekaman kekeringan. Hasil percobaan menunjukkan genotipe kedelai yang toleran cekaman kekeringan mampu berkembang dan membentuk ES dalam media selektif dengan konsentrasi PEG lebih tinggi dibandingkan dengan genotipe kedelai peka. Adanya kesesuaian antara hasil evaluasi secara *in vitro* dengan penapisan di lapang mengindikasikan media dengan penambahan PEG dapat digunakan sebagai media selektif untuk melakukan seleksi *in vitro*.

Hasil tersebut sejalan dengan hasil penelitian El-Sahed dan Kirkwood (1992) yang menunjukkan adanya korelasi positif antara kemampuan untuk tumbuh dan berkembang dalam media selektif secara *in vitro* dengan toleransi sel terhadap cekaman kekeringan. Sel kedelai yang toleran cekaman kekeringan dapat tumbuh lebih baik dalam media selektif dengan PEG dibandingkan dengan sel yang peka.

Dalam penelitian ini konsentrasi subletal untuk menghambat pembentukan ES dari eksplan kedelai ialah 20% PEG. Dalam media selektif tersebut, jumlah ES per eksplan yang terbentuk dari genotipe kedelai MSC8606 (peka terhadap cekaman kekeringan) menurun lebih dari 95% dibandingkan dengan kontrolnya. Nabors dan Dykes (1985) menyatakan dalam seleksi *in vitro* harus digunakan media selektif dengan tekanan seleksi subletal, yaitu tekanan seleksi yang menghambat pertumbuhan jaringan hingga minimal 95%. Penggunaan konsentrasi subletal diperlukan untuk meningkatkan keberhasilan seleksi *in vitro* dan menurunkan kemungkinan terjadinya *escaped*. Media selektif dengan penambahan 20% PEG disimpulkan telah memberikan kondisi subletal untuk genotipe kedelai yang peka terhadap cekaman kekeringan sehingga dapat digunakan dalam seleksi *in vitro*.

Pada seleksi langsung atau bertahap, total ES hasil seleksi yang didapat dari genotipe kedelai toleran (B3731 dan MLG2999) lebih banyak dibandingkan dengan dari genotipe kedelai peka (MSC8606). Hal tersebut diduga karena sel atau jaringan genotipe kedelai toleran lebih mampu beradaptasi terhadap kondisi cekaman PEG dibandingkan dengan genotipe kedelai peka. Untuk tiga genotipe kedelai yang diuji, seleksi *in vitro* secara bertahap menghasilkan jumlah ES hasil seleksi lebih banyak dibandingkan dengan seleksi langsung. Hal ini paling tidak diduga karena dua mekanisme, yaitu daya adaptasi sel atau jaringan terhadap media selektif atau pengayaan sel atau jaringan varian yang toleran selama tahapan seleksi.

Sel atau jaringan yang dikulturkan dalam kondisi tekanan seleksi yang meningkat secara bertahap kemungkinan dapat beradaptasi terhadap kondisi cekaman tanpa mengalami perubahan genetika (mutasi). Dalam percobaan ini, sebagian besar ES hasil seleksi bertahap diduga berkembang dari sel atau jaringan yang mampu beradaptasi terhadap cekaman PEG dan bukan dari sel atau jaringan varian somaklonal yang toleran. Jika hal tersebut benar maka sebagian besar ES hasil seleksi bertahap merupakan ES yang *escaped* dari proses seleksi dan akan menghasilkan tanaman yang sama reaksinya terhadap cekaman kekeringan seperti tanaman asal.

Kondisi selektif akibat penambahan PEG dalam media bersifat menghambat pertumbuhan dan perkembangan sel atau jaringan yang peka. Dengan seleksi secara bertahap, sel atau jaringan varian yang toleran dapat berkembang normal sedangkan yang peka secara bertahap mengalami kematian. Melalui seleksi bertahap diharapkan terjadi proliferasi atau perbanyakannya klonal sel atau jaringan varian yang toleran sebelum diseleksi pada konsentrasi PEG subletal sehingga pada akhir periode seleksi diperoleh ES hasil seleksi dalam jumlah lebih banyak. Jika mekanisme ini yang terjadi maka sebagian besar ES hasil seleksi merupakan ES yang berkembang dari sel atau jaringan varian somaklonal dan menghasilkan tanaman yang toleran cekaman kekeringan. Dari hasil percobaan yang didapat disimpulkan bahwa metode seleksi bertahap dalam media dengan PEG, meskipun memberikan lebih banyak ES yang *escaped* dari

seleksi, lebih baik digunakan untuk seleksi *in vitro* dari genotipe kedelai yang peka terhadap cekaman kekeringan.

Sebagian besar ES hasil seleksi bertahap tidak mampu berkecambah dalam media perkecambahan yang mengandung PEG. Dalam media perkecambahan ini hanya 4 ES yang mampu berkecambah dan berkembang membentuk planlet. Hal ini mengindikasikan ES hasil seleksi bertahap sebagian besar merupakan ES yang *escaped* dari proses seleksi, tetapi kemungkinan terjadinya proliferasi sel atau jaringan varian selama proses seleksi bertahap diduga juga tetap berperan dalam mendapatkan ES yang berkembang dari sel atau jaringan varian.

Barakat dan Abdel-Latif (1996) melaporkan hal yang sama dalam seleksi *in vitro* untuk mendapatkan varian somaklonal yang toleran cekaman akibat salinitas. Seleksi *in vitro* secara bertahap terhadap cekaman salinitas menghasilkan kalus toleran yang banyak, tetapi sebagian besar ES yang berkembang dari kalus hasil seleksi ternyata peka terhadap salinitas.

Seleksi *in vitro* secara bertahap lebih baik dilakukan pada genotipe kedelai yang peka terhadap cekaman kekeringan, yaitu MSC8606. Kemungkinan mendapatkan planlet kedelai yang berkembang dari ES hasil seleksi bertahap lebih besar dibandingkan dengan seleksi secara langsung pada media dengan konsentrasi PEG subletal. Rendahnya jumlah ES kedelai hasil seleksi langsung dari MSC8606 dan kegagalan ES hasil seleksi untuk meregenerasikan planlet yang normal menyebabkan planlet varian somaklonal kedelai MSC8606 hasil seleksi langsung tidak berhasil diperoleh. Sebaliknya, dari seleksi secara bertahap berhasil diperoleh 12 planlet kedelai varian somaklonal yang diregenerasikan dari ES hasil seleksi. Planlet varian somaklonal genotipe kedelai B3731 dan MLG2999 berhasil diregenerasikan dari ES hasil seleksi secara bertahap atau secara langsung dengan konsentrasi PEG subletal.

Populasi planlet varian SC1 tersebut telah ditanam di rumah plastik untuk menghasilkan biji SC2 dan SC3 zuriat dari masing-masing planlet SC1. Populasi tanaman varian SC2 dan SC3 yang diperoleh dapat digunakan untuk mengevaluasi hubungan antara toleransi ES terhadap kondisi selektif akibat perlakuan PEG dalam media regenerasi ES dengan toleransi tanaman terhadap cekaman kekeringan. Dari evaluasi yang dilakukan tersebut diharapkan dapat diperoleh informasi tentang keefektifan penggunaan seleksi *in vitro* dengan PEG untuk menghasilkan tanaman kedelai varian somaklonal yang toleran terhadap cekaman kekeringan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Sebagian penelitian ini dibiayai oleh Proyek Riset Unggulan Terpadu VIII: Pengembangan Metode Seleksi *In Vitro* dalam Membantu Pemuliaan Kedelai untuk Toleransi terhadap Cekaman Kekeringan. Kantor Menteri Negara Riset dan Teknologi, Republik Indonesia. No. Kontrak 011.33/SK/RUT/2001, tahun 2001-2002.

DAFTAR PUSTAKA

- Adkins SW, Kunanuvachaidah R, Godwin ID. 1995. Somaclonal variation in rice-drought tolerance and other agronomic characters. *Aust J Bot* 43:201-209.

- Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. 1997. Ringkasan penelitian-Kelompok Peneliti Sumber Daya Genetika. Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan. Bogor: Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian.
- Barakat MN, Abdel-Latif TH. 1996. *In vitro* selection of wheat callus tolerant to high levels of salt and plant regeneration. *Euphytica* 91:127-140.
- Bastola RP, Minocha SC. 1995. Increased putrescine biosynthesis through transfer of mouse ornithine decarboxylase cDNA in carrot promotes somatic embryogenesis. *Plant Physiol* 109:63-71.
- Budianto FA, Solahuddin S, Baharsjah JS, Rumawas F. 1984. Pengaruh tekanan kekeringan terhadap pertumbuhan dan produksi beberapa varietas kedelai pada grumusol Lombok Tengah. *Bul Agron* 14:17-30.
- Claxton JR, Arnold DL, Clarkson JM, Blakesley D. 1998. The regeneration and screening of watercress somaclones for resistance to *Spongospora subterranean* f. sp. *nasturtii* and measurement of somaclonal variation. *Plant Cell Tiss Org Cult* 52:155-164.
- Dami I, Hughes HG. 1997. Effects of PEG-induced water stress on *in vitro* hardening of 'Valliant' grape. *Plant Cell Tiss Org Cult* 47:97-101.
- Duncan RR, Waskom RM, Nabors MW. 1995. *In vitro* screening and field evaluation of tissue-culture-regenerated sorgum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) for soil stress tolerance. *Euphytica* 85:371-380.
- El Hadrami I, D'Auzac J. 1992. Effects of polyamine biosynthesis inhibitors on somatic embryogenesis and cellular polyamines in *Hevea brasiliensis*. *J Plant Physiol* 140:33-36.
- El-Sahed H, Kirkwood RC. 1992. Response of adapted and unadapted soybean cell suspension cultures to water stress. *Phyton-Horn* 32:263-275.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. 1968. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50:151-158.
- Jusuf M, Kasno A, Sopandie D, Supena EDJ, Widyastuti U, Miftahudin, Hamim, Supijatno. 1993. Evaluasi plasma nutfah kedelai untuk lahan kering atau ber-pH rendah serta berkualitas nutrisi baik. [Laporan Penelitian]. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- Kaur S, Gupta AK, Kaur N. 1998. Gibberellic acid and kinetin partially reverse the effect of water stress on germination and seedling growth in chickpea. *Plant Growth Reg* 25:29-33.
- Kong L, Attree SM, Fowke LC. 1998. Effects of polyethylene glycol and methylglyoxal bis (guanyldrazone) on endogenous polyamine levels and somatic embryo maturation in white spruce (*Picea glauca*). *Plant Sci* 133: 211-220.
- Larkin PJ, Scowcroft WR. 1981. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor Appl Genet* 60: 197-214.
- Maralappanavar MS, Kuruvinahetti MS, Harti CC. 2000. Regeneration, establishment and evaluation of somaclones in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Euphytica* 115:173-180.
- Mercado JA, Sancho-Carrascosa MA, Jimenez-Bermudez S, Peran-Quesada R, Pliego-Alfaro F, Quesada MA. 2000. Assessment of *in vitro* growth of apical stem section and adventitious organogenesis to evaluate salinity tolerance in cultivated tomato. *Plant Cell Tiss Org Cult* 62:101-106.
- Mexal J, Fisher JT, Osteryoung J, Patrick Reid CP. 1975. Oxygen availability in polyethylene glycol solutions and its implications in plant-water relation. *Plant Physiol* 55:20-24.
- Mohamed MAH, Harris PJC, Henderson J. 2000. *In vitro* selection and characterization of a drought tolerant clone of *Tagetes minuta*. *Plant Sci* 159: 213-222.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised media for media rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497.
- Nabors MW, Dykes TA. 1985. Tissue culture of cereal cultivar with increased salt, drought, and acid tolerance. Di dalam: *Biotechnology in International Agricultural Research*. Proceeding of the Inter-center seminar on International Agricultural Research Center and Biotechnology. Manila: 23-27 Apr 1984. hlm 121-138.
- Remotti PC, Loffler HJM, van Loten-Doting L. 1997. Selection of cell-lines and regeneration of plants resistant to fusaric acid from *Gladitolus x grandiflorus* cv. 'Peter Pears'. *Euphytica* 96:237-245.
- Seliskar DM, Gallagher JL. 2000. Exploiting wild population diversity and somaclonal variation in the salt marsh grass *Distichlis spicata* (Poaceae) for marsh creation and restoration. *Amer J Bot* 87:141-146.
- Sumaryati S, Negrutiu I, Jacobs M. 1992. Characterization and regeneration of salt-and water-stress mutants from protoplast culture of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Theor Appl Genet* 83:613-619.
- Tewary PK, Sharma A, Raghunath MK, Sarkar A. 2000. *In vitro* response of promising mulberry (*Morus* sp.) genotypes for tolerance to salt and osmotic stresses. *Plant Growth Reg* 30:17-21.
- Widoretno W, Arumningtyas E, Sudarsono. 2003. Metode Induksi pembentukan embrio somatic dari kotiledon dan regenerasi planlet kedelai secara *in vitro*. *Hayati* 10:19-24.