

PERANAN KULTUR MIKROSPORA DAN KULTUR ANTER UNTUK PEMULIAAN KELAPA SAWIT

Sjafrul Latif, Subronto, Tri Hutomo dan Kabul Pamin

ABSTRAK

Teknik *in vitro* dalam hal menghasilkan tanaman kelapa sawit haploid atau haploid ganda bertujuan untuk memendekkan siklus pemuliaan melalui perakitan bahan tanaman kelapa sawit galur murni.

Percobaan dengan menggunakan kultur mikrospora dan anter telah dilakukan di PPKS. Percobaan meliputi tahapan identifikasi mikrospora, isolasi mikrospora dan mencari media yang terbaik. Hasil pendahuluan menunjukkan bahwa media N6 dengan 2 ppm 2,4-D dikombinasikan dengan 0,5 ppm kinetin dan maltosa sebanyak 150 g sebagai sumber energi dalam pembuatan media yang terbaik. Suhu inkubasi 32°C sesuai dengan suhu untuk menginduksi terjadinya embrioid. Tiga jenis struktur yang menyerupai kalus ditemukan dari kultur anter pada media agar. Penelitian lanjutan masih diperlukan guna merealisasikan bahan tanaman kelapa sawit galur murni.

Kata kunci: *Elaeis guineensis*, kultur mikrospora dan anter, haploid

PENDAHULUAN

Teknik *in vitro* seperti kultur mikrospora dan kultur anter telah digunakan sebagai pelengkap metode pemuliaan konvensional. Penggunaan teknik kultur mikrospora dan kultur anter yang dapat menghasilkan tanaman haploid menjadi perhatian bagi pemuliaan tanaman sejak beberapa waktu yang lalu, karena tanaman haploid sangat berperan dalam rencana penelitian genetika dan pemuliaan tanaman.

Masalah yang dihadapi oleh pemulia tanaman kelapa sawit adalah, antara lain keragaman genetik yang sempit, produktivitas yang jauh lebih rendah dari potensi secara teoritik, kualitas minyak yang belum sesuai dengan berbagai jenis permintaan pasar. Salah satu program penelitian pemuliaan kelapa sawit adalah menciptakan variabilitas genetik melalui tanaman haploid.

Melalui metode pemuliaan konvensional bahan tanaman kelapa sawit dari galur murni belum diperoleh disebabkan panjangnya waktu untuk terciptanya suatu generasi dan akibat tekanan genetik kondisi tanaman yang telah dikawinkan sendiri berulang-ulang menjadi lemah. Oleh karena itu teknik kultur mikrospora dan kultur anter dapat menciptakan bahan tanaman kelapa sawit galur murni lebih memungkinkan untuk diterapkan.

Mikrospora dari beberapa jenis tanaman bila ditempatkan dalam media buatan yang sesuai dapat diinduksi untuk tumbuh mengikuti lintasan sporofitik membentuk embrioid yang mampu untuk menghasilkan tanaman haploid atau haploid ganda. Tanaman yang berasal dari embrioid kultur mikrospora dapat berupa tanaman haploid, diploid atau poliploid. Kultur anter dari tanaman serealia, pada umumnya ber-

kembang menjadi tanaman diploid, hanya sedikit yang berkembang menjadi tanaman haploid atau tetraploid (20).

Perlakuan colchicine secara *in vitro* terhadap planlet merupakan suatu cara yang lebih maju disebabkan penggunaan volume dan konsentrasi colchicine yang lebih sedikit dan penggunaannya terkontrol. Selain terdapat keuntungan dari teknik ini, juga tidak lepas dari kekurangan, misalnya memerlukan banyak tenaga, juga induksi penggadaan kromosom pada tanaman rape seed tidak lebih dari 50 -70 % (14).

Pemuliaan tanaman dengan menggunakan haploid ganda, melalui kultur anter dan mikrospora, telah menunjukkan peranannya yang sangat penting sebagai sarana penciptaan variabilitas genetik yang sangat bermanfaat, seperti diuraikan oleh Maheshwari (11).

Makalah ini mengemukakan hasil yang telah dicapai dengan menggunakan teknik kultur mikrospora dan kultur anter pada tanaman kelapa sawit dalam upaya menciptakan bahan tanaman kelapa sawit galur murni.

BAHAN DAN METODE

Identifikasi tahapan mikrospora tanaman kelapa sawit

Penelitian dilakukan sejak tahun 1991 di Laboratorium Pengembangan Teknologi Bahan Tanaman di Medan. Infloresensia bunga jantan yang masih diselubungi seludang pada pelepasan daun yang belum membuka dari tanaman kelapa sawit yang ditanam pada tahun 1986 digunakan sebagai bahan penelitian. Identifikasi tahapan mikrospora dilakukan melalui pewarnaan yang

dikembangkan oleh Alexander (1). Tunas bunga diambil dari spikelet menggunakan forsep, 1-2 tetes zat pewarna diteteskan ke atas tunas tersebut, tunas ditekan dengan menggunakan objek gelas, ditutup dengan kaca penutup dan diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 100 kali.

Isolasi mikrospora kelapa sawit

Tunas bunga dari beberapa tahapan mikrospora digunakan sebagai bahan eksplan disuci-hamakan dengan 70 % alkohol selama 2 menit kemudian dengan 0,1 % HgCl₂ selama 7 menit, diikuti dengan membilasnya 3-4 kali dengan akuades steril. Sebanyak 50 tunas bunga dari setiap tahapan mikrospora digerus menggunakan saringan nylon 250 µm dengan 0.4 M NaCl. Suspensi mikrospora yang berada dalam larutan NaCl kemudian dipindahkan ke dalam tabung sentrifus dan diputar pada kecepatan 1000 rpm selama 5-10 menit. Kemudian suspensi disaring lagi dengan menggunakan saringan nylon 40 µm, aliquot dipisahkan dan supernatan dibilas dengan larutan media, kembali diputar selama 5 menit pada kecepatan 1000 ppm. Mikrospora yang telah terisolasi dikultur pada media cair.

Mencari media yang terbaik

Guna menginduksi terjadinya kalus dari mikrospora yang telah diisolasi beberapa jenis media telah digunakan antara lain yang dikembangkan oleh Licher (10), Murashige & Skoog (12), B5 (7), N6 (6) dan media yang diformulasikan oleh Kuhlmann and Foroughi-Wehr (8). Selain jenis media juga beberapa sumber karbohidrat seperti maltosa, sukrosa, glukosa dalam berbagai konsentrasi (25 - 150 g/l), juga kombinasi dari 2,4-D dengan kinetin

sama halnya dengan NAA dengan BAP dalam konsentrasi 0,5 - 4 mg/l digunakan dalam percobaan ini.

Mikrospora yang telah ditanam dalam cawan petri diinkubasi pada suhu 32-34°C selama 2 hari dalam inkubator. Kepadatan mikrospora dalam cawan petri berkisar antara 60.000 sampai 100.000 mikrospora/ml media kultur.

Selain itu juga dilakukan percobaan untuk mencari kondisi inkubasi yang terbaik termasuk perlakuan pra kultur, suhu inkubasi dan kebutuhan akan cahaya.

Kultur anter

Untuk kultur anter beberapa media yang berbeda telah dicoba kan antara lain :

- N6 + maltosa 100 g, 2,4-D 2 mg dan kinetin 0,5 mg
- N6 + sukrosa (30,60,100 g), 2,4-D (1,2,4 mg), kinetin 0,5 dipadatkan dalam gelrite (2-3 g) dan arang aktif 2 g
- N6+ ficoll 200 g, maltosa (20,100 g) 2,4-D 2 mg, kinetin 0,5 mg
- N6 + sukrosa 100, 2,4 -D 2 mg, kinetin 0,5 mg
- N6 + sukrosa 100 g, NAA (2-4 mg) dan BAP (0,5 and 1 mg)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tahapan mikrospora

Sangatlah sulit menentukan tahapan perkembangan mikrospora yang hanya berdasarkan letak/kedudukan spiral pelepasan daun tanpa melakukan pewarnaan dan melihatnya di bawah mikroskop. Sebagai contoh infloresensia

bunga jantan dari kelompok Dura masih ditutupi oleh seludang walaupun tahapan dari mikrospora adalah awal-tengah uninukleat atau tengah-akhir uninukleat. Di lain pihak pada kelompok Tenera pada umumnya infloresensia bunga jantan telah terbuka walaupun masih pada tahap uninukleat sangat awal. Dengan demikian kedudukan pelepasan daun tidak dapat digunakan sebagai penciri morfologi untuk menentukan tahapan dari mikrospora. Hal ini disebabkan sering kalianya dijumpai infloresensia bunga jantan yang masih muda keluar pada pelepasan daun yang lebih tua.

Tidak terdapat perbedaan yang nyata dari tahapan mikrospora yang diisolasi dari tunas yang berada dari berbagai bagian spikelet. Pada umumnya di bagian bawah spikelet tahapan mikrospora lebih tua daripada spikelet bagian tengah atau ujung. Perbedaannya tidak lebih dari satu tahap. Spikelet dari Tenera lebih panjang daripada spikelet Dura. Spikelet yang berada di bagian tengah dari infloresensia biasanya lebih panjang kemudian diikuti oleh spikelet dari bagian bawah dan ujung.

Tahapan dari mikrospora yang dapat diidentifikasi adalah berturut-turut: sel induk, tetrad, uninukleat dan binukleat. Untuk lebih rinci lagi tahap unicellular dapat dibagi lagi menjadi 5 sub-tahapan yaitu; sangat awal, awal, awal-tengah, tengah, dan akhir (9).

Tahap sangat awal dapat dibedakan dengan sub-tahapan lainnya karena dinding selnya sangat tipis yang mengakibatkan selalu pecah selama pengisolasian. Tahapan awal uninukleat adalah tahapan di mana pada umumnya inti sel berada di tengah-tengah mikrospora sedangkan tahap awal-tengah dan tengah-akhir bila 2/3 dan 1/3 dari inti sel mikrospora berada di

tengah-tengah dan selebihnya inti sel mikrospora berada di pingir. Sedangkan pada tahap akhir uninukleat semua inti sel mikrospora berada di pingir, beberapa telah memiliki dua inti.

Zarsky *et al.* (21) mengatakan bahwa perkembangan tepung sari pada tanaman tingkat tinggi sangat teratur dan biasanya berupa urutan pembelahan sel yang sinkron. Meiosis yang terjadi pada sel induk tepung sari diikuti dengan mikrosporogenesis, mitosis pada mikrospora menghasilkan dua sel yang tidak sama yaitu sel yang berukuran besar merupakan sel vegetatif. Bila sel vegetatif tidak lagi membelah diri sel generatif membelah diri menjadi dua sel sperma. Mitosis tepung sari ini terjadi baik selama pendewasaan tepung sari (seperti pada tanaman gandum) atau pada tabung tepung sari sesudah perkecambahan (seperti pada tanaman tembakau). Kebanyakan siklus-sel yang terjadi pada saat pendewasaan tepung sari sangatlah tertentu, tetapi sampai sekarang belum pasti pada tahap siklus sel yang mana sel pasti pada tahap siklus sel yang mana sel

vegetatif dari tepung sari berhenti membelah. Jalur tepung sari embriogenesis telah diuraikan oleh Maheshwari *et al.* (11).

Pada penelitian ini belum dapat diketahui apakah embriogenesis mikrospora kelapa sawit sama seperti pada tanaman gandum ataukah tanaman tembakau, disebabkan tahap multinukleat sebagai tahap awal proses embriogenesis belum lagi dihasilkan.

Mencari media yang terbaik

Sebagai hasil pendahuluan dapat dilaporkan sebagai berikut:

- Media N6 merupakan media yang terbaik dibanding media lainnya berdasarkan viabilitas mikrospora setelah 3-4 bulan diinkubasi.
- Zat pengatur tumbuh 2,4-D lebih baik dari pada TIBA atau NAA
- Sedangkan Kinetin lebih baik dari pada BAP
- Suhu yang lebih tinggi dari 30°C sesuai untuk induksi embrioid

Tabel 1. Tanggap mikrospora tahap awal uninukleat terhadap berbagai jenis karbohidrat

Table 1. Response of early uninucleate microspore to different carbohydrate sources

Media	4 hari 4 days		1 minggu 1 week		3 minggu 3 weeks		6 minggu 6 weeks	
	mbs <i>Swl</i>	mbs <i>Swl</i>	mbs <i>Swl</i>	tp <i>Pt</i>	mbs <i>Swl</i>	tp <i>Pt</i>	eksin <i>Exine</i>	
A -1	++	++	+	++	+++	++	+++	
	++	++	+	+	+++	-	+++	
	+	+	+	+	+	-	+	
	-	-	-	-	-	-	-	
B -1	+++	+++	+	++	++	+++	++++	
	++	++	++	++	+++	+	++++	
	+	+	+	+	++	-	++	
	+	+	-	-	-	-	-	

Tabel 2. Tanggap mikrospora tahap akhir uninukleat terhadap berbagai jenis karbohidrat*Table 2. Response of late uninucleate microspore to different carbohydrate sources*

Media	1 hari 1 day				4 hari 4 days				1 minggu 1 week				3 minggu 3 weeks				7 minggu 7 weeks			
	mbs Swl	mbs Swl	tp Pt	eksin Exine	mbs Swl	tp Pt	eksin Exine	mbs Swl	tp Pt	eksin Exine	mbs Swl	tp Pt	eksin Exine	mbs Swl	tp Pt	eksin Exine	mbs Swl	tp Pt	eksin Exine	
A-1	+++	+	+	-	+	++	++	+	++	+	-	++	++	-	++	++	-	++	++	
-2	++	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	
-3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
B-1	++++	++	+++	+	++	++++	+++	+	++++	++	+	++++	++	+	+++	++	-	+++	++	
-2	+++	++	+++	+	+	+++	++	+	+++	++	*	+++	++	*	+++	++	+	+++	++	
-3	++	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
-4	++	+	+	+	-	++	-	+	++	+	-	++	+	-	+++	-	-	+++	-	
C-1	++	+	-	-	++	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
-2	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
-3	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
-4	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

mbs : membesar eksin : dinding sel mikrospora pecah

Swl : Swollen cell Exine : capture of cell wall

tp : tabung tepung sari

Pt : pollen tube

A-1,2,3,4 = Media N6 dengan sukrosa sebagai sumber energi sebanyak 150,100,50 dan 25 g/l

A-1,2,3,4 = N6 supplemented with 150,100,50 and 25 g/l of sucrose

B-1,2,3,4 = Media N6 dengan maltosa sebagai sumber energi sebanyak 150,100,50 dan 25 g/l

B-1,2,3,4 = N6 supplemented with 150,100,50 and 25 g/l of maltose

C-1,2,3,4 = Media N6 dengan glukosa sebagai sumber energi sebanyak 150,100,50 dan 25 g/l

C-1,2,3,4 = N6 supplemented with 150,100,50 and 25 g/l of glucose

+++++ = banyak dan besar (*plenty and longer*)

++++ = >15 sel (>15 cells)

+++ = >10>15 sel (>10>15 cells)

++ = >5>10 se (>5>10 cells)

+ = >5 sel (>5 cells)

- = tidak tanggap (no response)

* = terkontaminasi (contaminated)

Pada Tabel 1 ternyata mikrospora membesar 1.5- 2 kali lebih besar dari ukuran awalnya, ter-utama pada media N6 dengan maltosa sebanyak 150 g/l sebagai sumber energi. Beberapa hari kemudian membesar 3-5 kali. Perkembangan dari mikrospora tahap awal uninukleat cenderung untuk selalu membesar dan dinding selnya pecah, se-

dangkan mikrospora tahap akhir uninukleat cenderung untuk membentuk tabung tepung sari. Tanggap media N6 baik sukrosa maupun glukosa kurang begitu baik.

Untuk mempercepat pembelahan inti sel mikrospora suatu percobaan dengan menggunakan larutan *colchicine* pada konsentrasi 0, 10, 20, 30, 40 dan 50

mg/l juga dilakukan. Sebagai hasil ternyata pemberian larutan colchicine di dalam media tidak memberikan pengaruh untuk terjadinya pembelahan inti sel mikrospora. Tidak terjadinya pembelahan inti sel mikrospora merupakan masalah utama sehingga induksi embrioid dari mikrospora belum berhasil.

Secara umum tingkat kesuksesan kultur mikrospora lebih tinggi pada tanaman yang tergolong dalam dicotiledon daripada tanaman yang tergolong dalam monokotiledon, baik ditinjau dari jumlah tanaman haploid yang dapat dihasilkan maupun jumlah tanaman hijau yang lebih banyak dihasilkan daripada tanaman albino (15). Pada tanaman rapeseed, keberhasilan kultur mikrospora tidak hanya tergantung dari media kultur juga genotype, umur dan keadaan fisiologis tanaman donor itu sendiri dan tahap mikrospora merupakan hal yang terpenting (10). Berdasarkan penemuan Beversdorf *et al.* (2), bahwa terdapat hubungan yang sangat erat antara mikrosporogenesis dengan tahap perkembangan mikrospora pada saat pengkulturan dan jumlah embrioid yang dihasilkan. Sebagai contoh mikrospora pada tahap uninukleat menghasilkan 1.300 embrioid/tunas bunga jantan. Sedangkan Wenzel *et al.* (19) menyimpulkan bahwa tidak mungkin untuk membuat hubungan antara media kultur dengan tanggap mikropsora dan sangatlah sulit untuk menghasilkan hal yang sama pada kondisi yang berbeda dan dengan genotype yang berbeda. Disebabkan karena adanya variasi keadaan fisiologis tanaman donor akibat perbedaan keadaan lingkungan yang berbeda sepanjang tahun, walaupun tanaman donor tersebut ditanam di rumah kaca, perbedaan genetik tidak dapat dihindari.

Thurling & Chay (18) telah me-

nunjukkan bahwa tunas bunga jantan dari tanaman *rapeseed* yang diambil dari infloresensia pada perkembangannya tahap awal memberikan hasil yang lebih baik daripada bila diambil pada tahap akhir perkembangan infloresensia. Dengan demikian hal yang sangat penting adalah memilih bahan yang berada pada kondisi optimum dari perkembangan mikrospora. Tetapi sangatlah sulit untuk mengidentifikasi infloresensia disebabkan adanya perkembangan yang menurun dari satu bulir inflorsensia dan tidak adanya metoda yang langsung sebagai penanda perkembangan morfologis. Sebagai kesepakatan yang sering digunakan dalam menghasilkan tanaman yang berasal dari mikrospora, misalnya pada tanaman tembakau, dengan menggunakan mikrospora pada saat awal mitosis dari tepung sari memberikan hasil yang terbaik. Sedangkan pada tanaman cerealia dan rapeseed tahap optimum lebih awal lagi yaitu dari mikrospora pada tahap uninukleat.

Kemungkinan kesulitan dari pembelahan inti sel mikrospora dari tanaman kelapa sawit adalah disebabkan karena tebalnya dinding sel (eksin). Untuk mengatasi masalah ini telah dicoba dengan menggunakan larutan enzim sebagaimana lazimnya digunakan dalam kultur protoplas. Sebegitu jauh teknik ini belum menunjukkan hasil yang yang lebih baik yaitu tahapan dengan banyak sel (kalus). juga telah dicoba untuk menggunakan mikrospora pada tahap tepung sari yang sedang berkecambah.

Pra kultur dan percobaan berbagai tingkat suhu inkubasi

Dalam upaya untuk merangsang pembelahan inti sel mikrospora, beberapa perlakuan pra kultur telah dicoba

antara lain mengisolasi dan mengkultur mikrospora dengan menggunakan manitol 0.5 M dan media itu sendiri bukan dengan NaCl. Sedemikian jauh tidak didapat kemajuan (ditinjau dari perkembangan mikrospora maupun terjadinya pembelahan inti sel) dibandingkan dengan prosedur baku. Penggunaan manitol 0.5 M dapat menjaga mikrospora tetap hidup untuk beberapa lama dalam kondisi yang baik.

Tanggap mikrospora terhadap media yang digunakan tidak terjadi apabila diinkubasi pada suhu 25°C, tidak terdapat perkembangan walaupun mikrospora tetap hidup. Hasil yang menggembirakan ditemukan apabila mikrospora diinkubasi pada suhu 32-34°C selama 2-5 hari. Dengan menginkubasikan mikrospora selama 4 jam pada suhu 47°C, mikrospora bertambah besar dan 1% menghasilkan tabung

tepung sari, setelah satu minggu keban-yan mikrospora telah membelah dan menghasilkan tabung tepung sari yang besar. Pada Tabel 3 di bawah ini ditunjukkan tanggap mikrospora dari tahap awal-tengah uninukleat sampai tahap awal binukleat yang diinkubasi pada suhu 32 dan 47°C.

Ternyata pada umumnya kultur menghasilkan tabung tepung sari, sebagian mikrospora mengalami plasmolisa. Penggantian sukrosa dengan maltose menyebabkan mikrospora membesar dan melurahkan eksinya dalam waktu 1-2 minggu setelah diinkubasi. Sedangkan maltose 0.1 M tanggap mikrospora tidak berbeda nyata dengan kontrol (sukrosa 0.3 M), dengan meningkatkan konsentrasi maltosa menyebabkan mikrospora lebih membesar (Tabel 4).

Tabel 3. Perkembangan tabung tepung sari pada suhu inkubasi dan tahapan mikrospora yang berbeda-beda

Table 3. Microspore stages, incubation temperature and pollen tube development

Suhu <i>Temperature</i>	Tahap mikrospora <i>Microspore stage</i>	Perkembangan tabung tepung sari <i>Pollen tube growth</i>
32°C	LU	+++
	MU-LU	+++
	MU	++
47°C	MU-LU	+/++
	LU-MU	+
	MU	+++

--- tabung tepung sari lebih dari 70%
--- over 70 % pollen tube
--- tabung tepung sari 40-70%
--- 40 - <70 % pollen tube
- tabung tepung sari <40 %
- <40 % pollen tube

LU : tahap akhir uninukleat
LU : late uninucleate
MU : tahap tengah uninukleat
MU : mid uninucleate

Tabel 4. Pengaruh sumber karbohidrat terhadap perkembangan mikrospora*Table 4. Effect of carbohydrate sources on microspore development*

Karbohidrat <i>Carbohydrate</i>	Mikrospora yang membesar <i>Swollen microspore</i>	Plasmolisis <i>Plasmolysis</i>	Mikrospora yang tidak membesar <i>Small microspore</i>
Maltosa 0.4M	++++	+	+
0.3M	+++	+	+
0.2M	++	++	++
0.1M	-	++	++
Sucrosa 0.3M	-	++	++

++++ 70-80 %

+++ 50-<70 %

++ 20-<50 %

+ <20 %

Mikrospora bentuknya agak kurang segitiga menjadi oval atau agak bulat, beberapa mikrospora meluruhkan eksinya dan menjadi lebih bulat, juga terdapat beberapa yang menjadi tabung tepung sari. Jumlah mikrospora yang mengalami plasmolisis menurun dengan meningkatnya konsentrasi maltosa.

Kultur anter

Beberapa peneliti di luar negeri telah berhasil mendapatkan tanaman haploid yang berasal dari kultur anter yang lebih mudah dilakukan daripada kultur mikrospora. Masalah utama dalam kultur mikrospora adalah: jenis species tanaman, tahapan perkembangan mikrospora, media, keadaan fisiologis dari tanaman donor, pra perlakuan (suhu, tekanan osmotik) dan lingkungan kultur itu sendiri. Sedangkan kekurangan dari kultur anter adalah munculnya tanaman diploid yang berasal dari pembelahan sel-sel dinding anter, dan kebanyakan tanaman haploid yang dihasilkan adalah tanaman albino.

Suatu percobaan kultur anter kelapa sawit telah dilakukan dengan menggunakan beberapa media, tanggap anter pada media tersebut sangat lambat walaupun eksplannya tidak berwarna cokelat sampai umur 3-4 bulan. Untuk itu telah dibuat perubahan metode antara lain: penggantian media dan kondisi kultur, perlakuan penglelahan (starvation) dengan menggunakan manitol 0.4M selama 1-2 minggu, pra inkubasi pada berbagai suhu dan waktu inkubasi, perlakuan mendinginkan spikelet memberikan hasil sebagai berikut:

Kultur anter pada media cair

Anter dipisahkan dari benang-benangnya dan dipindahkan ke dalam media cair dalam cawan petri, kepadatan anter berkisar 4-6/ml medium. Ternyata beberapa anter merekah dan meluruhkan mikrospora ke dalam media, beberapa tetap utuh, mikrospora yang keluar dari dinding anter terdapat dalam tiga bentuk.

antara lain mengisolasi dan mengkultur mikrospora dengan menggunakan manitol 0.5 M dan media itu sendiri bukan dengan NaCl. Sedemikian jauh tidak didapat kemajuan (ditinjau dari perkembangan mikrospora maupun terjadinya pembelahan inti sel) dibandingkan dengan prosedur baku. Penggunaan manitol 0.5 M dapat menjaga mikrospora tetap hidup untuk beberapa lama dalam kondisi yang baik.

Tanggap mikrospora terhadap media yang digunakan tidak terjadi apabila diinkubasi pada suhu 25°C, tidak terdapat perkembangan walaupun mikrospora tetap hidup. Hasil yang menggembirakan ditemukan apabila mikrospora diinkubasi pada suhu 32-34°C selama 2-5 hari. Dengan menginkubasikan mikrospora selama 4 jam pada suhu 47°C, mikrospora bertambah besar dan 1% menghasilkan tabung

tepung sari, setelah satu minggu keban-yanan mikrospora telah membelah dan menghasilkan tabung tepung sari yang besar. Pada Tabel 3 di bawah ini ditunjukkan tanggap mikrospora dari tahap awal-tengah uninukleat sampai tahap awal binukleat yang diinkubasi pada suhu 32 dan 47°C.

Ternyata pada umumnya kultur menghasilkan tabung tepung sari, sebagian mikrospora mengalami plasmolisa. Penggantian sukrosa dengan maltose menyebabkan mikrospora membesar dan meluruhkan eksinnya dalam waktu 1-2 minggu setelah diinkubasi. Sedangkan maltose 0.1 M tanggap mikrospora tidak berbeda nyata dengan kontrol (sukrosa 0.3 M), dengan meningkatkan konsentrasi maltosa menyebabkan mikrospora lebih membesar (Tabel 4).

Tabel 3. Perkembangan tabung tepung sari pada suhu inkubasi dan tahapan mikrospora yang berbeda-beda

Table 3. Microspore stages, incubation temperature and pollen tube development

Suhu <i>Temperature</i>	Tahap mikrospora <i>Microspore stage</i>	Perkembangan tabung tepung sari <i>Pollen tube growth</i>
32°C	LU	+++
	MU-LU	+++
	MU	++
47°C	MU-LU	+/++
	LU-MU	+
	MU	+++

+++ tabung tepung sari lebih dari 70%

+++ over 70 % pollen tube

++ tabung tepung sari 40-<70%

++ 40 - <70 % pollen tube

- tabung tepung sari <40 %

- <40 % pollen tube

LU : tahap akhir uninukleat

LU : late uninucleate

MU : tahap tengah uninukleat

MU : mid uninucleate

Tabel 4. Pengaruh sumber karbohidrat terhadap perkembangan mikrospora*Table 4. Effect of carbohydrate sources on microspore development*

Karbohidrat <i>Carbohydrate</i>	Mikrospora yang membesar <i>Swollen microspore</i>	Plasmolisis <i>Plasmolysis</i>	Mikrospora yang tidak membesar <i>Small microspore</i>
Maltosa 0.4M	++++	+	+
0.3M	+++	+	+
0.2M	++	++	++
0.1M	-	++	++
Sucrosa 0.3M	-	++	++

++++ 70-80 %

+++ 50<70 %

++ 20<50 %

+ <20 %

Mikrospora bentuknya agak kurang segitiga menjadi oval atau agak bulat, beberapa mikrospora meluruhkan eksinya dan menjadi lebih bulat, juga terdapat beberapa yang menjadi tabung tepung sari. Jumlah mikrospora yang mengalami plasmolisis menurun dengan meningkatnya konsentrasi maltosa.

Kultur anter

Beberapa peneliti di luar negeri telah berhasil mendapatkan tanaman haploid yang berasal dari kultur anter yang lebih mudah dilakukan daripada kultur mikrospora. Masalah utama dalam kultur mikrospora adalah: jenis species tanaman, tahapan perkembangan mikrospora, media, keadaan fisiologis dari tanaman donor, pra perlakuan (suhu, tekanan osmotik) dan lingkungan kultur itu sendiri. Sedangkan kekurangan dari kultur anter adalah munculnya tanaman diploid yang berasal dari pembelahan sel-sel dinding anter, dan kebanyakan tanaman haploid yang dihasilkan adalah tanaman albino.

Suatu percobaan kultur anter kelapa sawit telah dilakukan dengan menggunakan beberapa media, tanggap anter pada media tersebut sangat lambat walaupun eksplannya tidak berwarna cokelat sampai umur 3-4 bulan. Untuk itu telah dibuat perubahan metode antara lain: penggantian media dan kondisi kultur, perlakuan penglehan (starvation) dengan menggunakan manitol 0.4M selama 1-2 minggu, pra inkubasi pada berbagai suhu dan waktu inkubasi, perlakuan mendinginkan spikelet memberikan hasil sebagai berikut:

Kultur anter pada media cair

Anter dipisahkan dari benang benangnya dan dipindahkan ke dalam media cair dalam cawan petri, kepadatan anter berkisar 4-6/ml medium. Ternyata beberapa anter merekah dan meluruhkan mikrospora ke dalam media, beberapa tetap utuh, mikrospora yang keluar dari dinding anter terdapat dalam tiga bentuk.

Bentuk-bentuk yang diamati dari perkembangan anter

- i. Anter merekah dan tepung sari yang keluar akan membentuk suatu massa yang kompak yang disatukan oleh suatu struktur berupa film yang berkesinambungan. Pengamatan dengan menggunakan pembesaran menunjukkan mikrospora berkembang dengan bentuk yang lebih bulat, tetapi inti sel tidak terlihat. Eksinya ada yang sebagian masih melekat dan sebagian lagi sudah luruh. Pertumbuhan sel-sel menjadi 4-5 kali lebih besar dari ukuran awal mikrospora.
- ii. Suatu massa yang dipenuhi oleh cairan ditemukan pada beberapa kultur anter. Pada umumnya struktur ini terdapat pada benang-benang yang lepas, beberapa terdapat pada dinding sel anter. Pada awal mulanya merupakan suatu tetesan air dan berkembang menjadi putih-susu. Struktur ini sama dengan kalus embriogenik dari kultur anter tanaman *Populus*. Dengan bertambahnya waktu, massa yang dipenuhi air akan membentuk struktur yang kompak, berwarna abu-abu yang melekat pada permukaan anter. Bila struktur ini dipindahkan ke media yang baru tidak lagi menunjukkan perkembangan.
- iii. Struktur seperti benjolan terbentuk dari kultur anter. Struktur yang dipenuhi dengan tepung sari ini tidak berkembang lebih lanjut.

Sunderland dan Dunwell (16) menganalisis secara sitologis androgenesis tanaman jagung menemukan bahwa struktur seperti embrio muncul akibat pembelahan yang berulang-ulang

dari a) hanya sel-sel vegetatif saja, b) sel generatif saja, c) sel vegetatif maupun sel generatif dan d) pembelahan simetrik tanpa diferensiasi dari sel vegetatif dan sel generatif. Kebanyakan pembentukan embrioid ataupun kalus berasal dari perkembangan pembelahan yang berulang-ulang dari sel vegetatif.

Kultur anter pada media agar

Beberapa kultur pada media agar struktur seperti kalus (SSK) terlihat setelah 2-4 minggu diinkubasi. Dinding anter berwarna kuning/cokelat sampai cokelat tua dan membesar pada ujung belahan (lobus) anter. Dinding anter luruh pada salah satu atau dua titik pada permukaan atau luruh memanjang. Suatu massa yang lembut dan bercahaya bening berupa SSK muncul dari dalam anter menunjukkan bahwa SSK berasal dari mikrospora. Tiga bentuk dari SSK yang dihasilkan :

SSK A : Anter merekah secara menyeluruh, berwarna putih bening sangat bercahaya, massa keluar dari bagian bawah dinding anter.

SSK B : Anter merekah pada tempat-tempat tertentu di dinding anter dan massa keluar darinya.

SSK C : Anter merekah seluruhnya dan SSKS ditutupi dengan suatu lapisan yang berkesinambungan dan keluar dari bagian bawah dinding anter berwarna gelap.

Massa kalus yang diamati dengan pembesaran terdiri dari mikrospora diantara struktur multiseluler ataupun uniseluler. Mikrospora berada pada beberapa tahap kemunculan dari eksinya. Sel-sel tanpa eksin berukuran besar dan berbentuk tidak menentu. Juga terdapat klump dari struktur multiseluler. Mikrospora dengan tabung tepung sari juga

didapati. Pada saat ini anter dengan SSK telah dipindahkan ke dalam media untuk menghasilkan embrio dan diinkubasi di bawah penyinaran.

Chen *et al.*(3, 4, 5) menunjukkan pada kultur anter tanaman karet selama 25 hari pertama sebanyak 20 % tepung sari dalam kalus yang dihasilkan dari kultur anter berkembang menjadi massa multiseluler. Pengamatan sitologis menunjukkan selama 25 hari pertama inkubasi, kalus yang terbentuk utamanya berasal dari perbanyakannya jaringan somatik, tetapi setelah kultur berusia 50 hari, kalus dan embrioid kecil berasal dari mikrospora mulai membelah diri secara cepat dan berhubungan erat dengan sel-sel somatis di sekeliling mereka.

Jaringan dinding sel anter memerlukan peranan penting dalam menginduksi awal pembelahan sporofotik dari perkembangan tepung sari. Metabolit yang dihasilkan oleh dinding sel anter memasuki ruang-ruang anter dan menyelimuti kalus muda. Sesudah sel tapetum dari dinding anter lenyap, sel-sel yang masih ada tetap hidup dan mendapat suplai metabolit untuk perkembangan tepung sari selanjutnya. Sebaliknya Sung Pei-Lun *et al.* (17) menyanggah bahwa sel tapetum tidak memiliki hubungan langsung dengan androgenesis tepung sari di dalam kultur, dan sel baik dari jaringan penyokong anter maupun lapisan tengah dinding anter berperan aktif dalam menginduksi androgenesis tepung sari. Dengan demikian lapisan tengah dinding anter merupakan faktor kunci.

Di lain fihak Miao *et al.* (13) menemukan bahwa terdapat dua jenis kalus yang dibentuk dari anter tanaman jagung. Salah satu daripadanya agak lebih kompak dan sulit untuk hidup dan maupun disubkulturkan. Selain itu ada

lagi yang agak lembek dan mudah untuk disubkulturkan. Tipe terakhir ini bila dikultur pada media diferensiasi, tunas, akan menghasilkan akar atau embrioid.

KESIMPULAN

Walaupun dari penelitian ini belum dapat dihasilkan tanaman haploid kelapa sawit, sedemikian jauh tahap mikrospora uninukleat sangat tepat untuk menginduksi embrioid. Juga dirasakan penggunaan jenis dan konsentrasi sumber karbohidrat lebih penting daripada jenis media. Maltosa ternyata memberikan pengaruh positif untuk perkembangan mikrospora baik tahap awal atau akhir uninukleat. N6 dilengkapi dengan 2,4-D 2 ppm dan kinetin 0.5 ppm pada pH 5.8 adalah merupakan media yang tepat sampai saat ini. Selain tahapan mikrospora, kemungkinan masih banyak faktor yang mempengaruhi kejadian terbentuknya embrioid yang belum dapat diidentifikasi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih pada Dipl. Ing. Annette Bender, Dr Christian Mollers dan Dr MCM Iqbal dari Universitas Gottingen atas dukungan dan bimbingannya.

DAFTAR PUSTAKA REFERENCES

1. ALEXANDER, M.R. 1969. Differential staining of aborted and non aborted pollen. Stain Technology 14(3): 117-122.
2. BEVERSDORF,W.D., D.G. CHARNE, L.S.KOTT, P.V. CHUONG, L.POLSONI and J. ZILKA. 1987. The utilization of microspore culture and microspore derived double-haploid in a

- rapeseed (*Brassica napus* L.) breeding programme. 7th Int. Rapeseed Congress. Poland, 86-91.
3. CHEN ZHENHUA. 1983. Microscopic observation of *Hevea brasiliensis* cultures. In. Cell and Tissue Cult. Tech. for Cereal Crop Improv. Sci. Press, Beijing and IRRI, Manila, 47-54.
 4. CHEN ZHENHUA, CHEN FA-TSU, CHIEN CHANG-FA, WANG CHUANG-HUA, CHANG SHI-JIE, HSU HSU-EN, OU HSIAO-HUI, HO YUNG-TAO and LU TSUN-MIN. 1981. Obtaining pollen plants of *Hevea brasiliensis* Muell.-Arg. In. Plant Tissue Cult. The Pitman Int. Series in Applied Biol. Boston, 11-22.
 5. CHEN ZHENHUA, QIAN CHANGFA, XU XUEN and DENG ZHONGTAO. 1982. Anther culture technique of rubber tree and sugarcane. Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue & Cell Cult. Tokyo, Japan, 533-534.
 6. CHU, C.C. 1978. The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. Sino-Australian Plant Tissue Culture Symposium, 25-30 May, 1978. Peking. Pitman Adv. Publ. Program, Boston :43-50.
 7. GAMBORG, O.L., R.A.MILLER and K. OJIMA. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exptl. Cell Res. 50: 151-158.
 8. KUHLMANN, U. and B. FOROUGHI-WEHR. 1989. Production of doubled haploid lines in frequencies sufficient for barley breeding programs. Plant Cell Reprt. 8: 78-91.
 9. LATIF, S. 1991. Identifikasi mikrospora *Elaeis guineensis* Jacq. untuk kultur haploid. Bul. Perkeb. 22 (4):231-238.
 10. LICHTER, R. 1982. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus* L. Z. Pflanzenphysiol. 105:427-434.
 11. MAHESHWARI S.C., A.RASHID and A.K.TYAGI. 1982. Haploid from pollen grain - retrospect and prospect. Amer J. Bot. 69(5):865-879.
 12. MURASHIGE, T. and F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.
 13. MIAO SHU-HUA, KUO CHUNG-SHEN, KWEI YAO-LIN, SUN AN-TZE, KU SHU-YUNG, LU WEN-LIANG, WANG YU-YING, CHEN MAN-LING, WU MAO-KANG and HANG LING. 1981. Induction of pollen plants of maize and observations on their progeny. In. Plant Tissue Cult. The Pitman Int. Series in Applied Biol. Boston, 23-34.
 14. MOLLERS,C., M.C.M.IQBAL and G.ROBBELEN. 1994. Efficient production of doubled haploid *Brassica napus* plants by colchicine treatment of microspore. Euphytica 75: 95-014.
 15. ONO, H. and E.N. LARTER. 1976. Anther cultured of triticale. Crop Sci. 16: 120-122.
 16. SUNDERLAND,N. and J.M.DUNWELL. 1977. Anther and pollen culture. In. Plant Tissue and Cell Culture. H.E.Street (Ed.). Blackwell Sci. Publ. 2nd. Oxford, 223-266.
 17. SUNG PEI-LUN, CHIANG CHI-LIANG and PENG WEN-CHUNG. 1978. The induction effect of somatic tissues in the anther cultured in vitro on androgenesis and its control. In. Proc. of Symp. on Plant Tissue Cult. Beijing. Sci. Press, Beijing, 143-148.
 18. THURLING, M. and P.M.CHAY. 1984. The influence of donor plant genotype and environment on production of multicellular microspore in cultured anthers of *Brassica napus* spp. *oleifera*. Ann. Bot. 54: 681-693.
 19. WENZEL, G., F.HOFFMANN and E. THOMAS. 1977. Anthers culture as a breeding tool in rape. I. Ploidy level and phenotype of androgenic plants. Z. Pflanzenzuchtg. 78: 149-155.
 20. WENZEL, G. and B.FOROUGHI-WEHR. 1984. Anther cultures of cereals and grasses. In. Cell culture and somatic cell genetics of plants Vol. 1:311-327. I.K. Vasil (Ed). Acad. Press. Orlando.
 21. ZARSKY, V., D.GARRIDO, L.RHOVA, J.TUPY, O.VICENTE and E.HEBERLE-BORS. 1992. Depression of the cell cycle by starvation is involved in the induction of tobacco pollen embryogenesis. Sex Plant Reprod. 5:189-194.

Prospect of microspore and anther culture for oil palm breeding

Sjafrul Latif, Subronto, Tri Hutomo and Kabul Pamin

Abstract

In vitro technique to produce haploid or double haploid plants in oil palm is aimed at shortening breeding cycle and creating oil palm purelines.

An experiment of initiating microspore and anther culture was conducted at IOPRI. The experiment consisted of the identification of microspore stages, isolation, and testing the best media. The preliminary results show that medium N6 with 2,4 D 2 ppm combined with kinetin 0.5 ppm, supplemented with 150 g maltose is the best medium. Temperature of 32°C was preferable for inducing embryoids. Three types of callus-like structure were observed in anther cultures on agar media. Further studies are still needed for realizing oil palm pureline.

Key words : *Elaeis guineensis*, microspore and anther culture, haploidy

INTRODUCTION

In vitro technique, such as microspore and anther culture, has recently been introduced to compliment conventional breeding methods. Production of haploid plants through microspore and anther culture has been attracting plant breeders for long time, because it has been recognized that haploid plants can play an important role in plant breeding and genetic research programs.

The problems encountered by oil palm breeders are narrow genetic diversity, long breeding cycle, low production which is far below the theoretical yield, the quality of oil has not met the different consumer needs. One of research programs of IOPRI is to increase the genetic variability through haploid culture.

The creation of oil palm pureline has not been realized conventionally, due to long plant generation interval and the weakness of the plants caused by genetic depression. In addition to the

conventional breeding method, it is impossible to obtain a plant which is homozygous at all loci.

Producing purelines in plant species using double haploid plants through *in vitro* technique has several advantages, such as shortened breeding cycle, and more efficient technique.

When placed in culture, microspore from a number of plant species can be induced to enter the sporophytic development, leading to the formation of embryos capable of regenerating into haploid or double haploid plants. Plants generated from microspore-derived embryoids (MDEs) can be haploid, diploid or polyploid. In anther culture of cereals, most of the plants developed are diploid, the rest is haploid or tetraploid (20). Various factors affect the doubling of the ploidy level of the regenerants. The *in vitro* colchicine treatment of whole plantlets represents a progress enabling the use of low volumes and concentration of colchicine and an application under controlled conditions. Nevertheless,

the plantlets should be further cultured *in vitro* before being transferred to the greenhouse. Besides, being laborious, these treatments share the disadvantage that the induction of chromosome doubling in rapeseed rarely exceeds 50 - 70 % (14).

Plant breeding by doubled haploid, through anther and microspore culture, has shown its value that would be a good source for generating a very useful genetic variability (11).

The paper aims at briefly describing the progress and prospect of microspore and anther culture for oil palm breeding at the Indonesian Oil Palm Research Institute.

MATERIALS AND METHODS

Identification of oil palm microspore stages

The study was conducted in 1991 at the Laboratory of Plant Biotechnology of IOPRI. Young male inflorescences were collected from unopened leaves of oil palms planted in 1986. Identification of microspore stages was carried out by using staining method developed by Alexander (1). Bud was taken out from flower spikelet by forceps, added 1-2 drops of stain and macerated on a glass slide, covered with cover glass and examined under microscope.

Isolation oil palm microspore

Buds with various microspore stages were used as experiment materials. Buds were sterilized for 2 minutes in 70 % alcohol and then in 0,1 % HgCl₂ for 7 min, followed by 3-4 times rinsing in sterile distilled water. About 50 buds

of each stage were ground in 250 µm nylon sieve containing 0.4 M NaCl. The suspension of microspores in NaCl was then transferred into centrifuge tube and centrifuged 1000 rpm for 5-10 min. Suspension was filtered using 40 µm nylon sieve, the aliquot was separated and supernatant washed with medium, centrifuged 5 min at 1000 ppm. Isolated oil palm microspores were cultured in liquid media.

Testing for the best media

In order to test the best media for inducing callus from microspore the media from Licher (10), Murashige & Skoog (12), B5 (7), N6 (6), Kuhlmann and Foroughi-Wehr (8) were used, besides different carbohydrate sources maltose, sucrose, glucose in various concentrations (25 to 150 g/l), also different combination of 2,4-D and kinetin as well as NAA and BAP in concentration 0,5 to 4 mg/l were tested in the experiments. The plated microspore were incubated at 32-34 C° for 2 days in incubator. The microspore densities in culture varied from 60.000 up to 100.000 microspore/ml culture media.

Selection was done on incubation condition, including pre culture treatment, incubation temperature and light condition.

Anther culture

For anther culture, some different media used were as follows :

- N6 + maltose 100 g, 2,4-D 2 mg and kinetin 0.5 mg
- N6 + sucrose (30,60,100 g), 2,4-D (1,2,4 mg), kinetin 0,5 solidified by gelrite (2-3 g) and activated charcoal 2 g

- N6+ ficoll 200 g, maltose (20,100 g) 2,4-D 2 mg, kinetin 0,5 mg
- N6 + sucrose 100, 2,4 -D 2 mg, kinetin 0,5 mg
- N6 + sucrose 100 g, NAA (2-4 mg) and BAP (0,5 and 1 mg)

RESULTS AND DISCUSSION

Microspore stage

It would be rather difficult to have specific morphological marker in order to distinguish the stages of microspore before commencing the staining and examining under microscope. For example, in dura type, the male inflorescence was still covered by the spadix even though the stage of microspore was early-mid uninucleate or mid-late uninucleate. On the other hand, tenera type, the inflorescence mostly opened even though the stage was still very early uninucleate. The leaf number could not be used as morphological marker to determine a specific stage of microspore, because it often occurred young male inflorescence, appeared on older leaf axils. There is no apparent differences of the microspore stages isolated from shoots originated from different part of spikelet. Generally the microspore stages from lower spikelet were older than that from the middle and upper spikelet. But the difference usually is not more than one stage.

The spikelet of tenera is slightly longer than that dura type. Spikelet from the middle region of inflorescence is usually the longest followed by the basal and apical region, respectively.

Some different stages of microspore were identified easily as mother cell, tetrad, uninucleate and

binucleate. For more detail, the uninucleate stage could be divided into 5 sub-stages i.e. very early, early, early-mid, mid and late uninucleate (9).

The very early stage can be identified from other sub-stages, because the cell wall is very thin that easily broken during isolation. The early uninucleate is the stage where the nucleus is in the middle of microspore whereas in early-mid and mid-late uninucleate, 2/3 and 1/3 of microspore nucleus is in the middle. In the late uninucleate, the nucleus moves aside, some have two nuclei.

Zarsky *et al* (21) said that pollen development in higher plants is a highly ordered and often synchronous sequence of cell divisions. Meiosis in the pollen mother cell is followed by microsporogenesis, and the unequal microspore mitosis leads to the large vegetative cell. While the vegetative cell does not divide again, the generative cell divide to form the two sperm cells. This pollen mitosis takes place either during pollen maturation (as in wheat) or in pollen tube after germination (as in tobacco). Most of the cell-cycle events that occur during pollen development are well characterized, but it is still not clear at which phase of the cell-cycle the vegetative cell of the pollen is arrested. Pollen embryogenesis has been described by Maheshwari *et al* (11).

From our study it was not known yet whether the embryogenesis of oil palm microspore is similar to wheat or tobacco. The multinucleate stages as the initial process of embryogenesis has not been obtained.

Testing for the best media

A preliminary result could be reported as follows :

- N6 medium is better than others, based on the viability of microspore up to 3-4 months after incubation.
- 2,4-D is better than TIBA or NAA
- Kinetin is better than BAP
- High temperature (30°C) may be more preferable for inducing embryo

The result showed that, microspore swelled 1.5-2 times bigger than the original ones, especially in N6 media supplemented with 150 g/l maltose (Table 1). The microspore swelled around 3-5 times a few days later. The development of early uninucleate microspore tended to swell and capture the exine of the cell, whereas the late uninucleate microspore tended to develop into a pollen tube. N6 media supplemented with either sucrose or glucose gave poor response.

To increase nuclear division, an experiment of using colchicine at 0, 10, 20, 30, 40 and 50 mg/l was carried out. It showed that different concentrations of colchicine had no effect on the cell division. This was one of the main problems in induction the embryo from microspore of oil palm.

In general, the rate of success of microspore culture is somewhat higher in dicotyledonous than in the monocotyledonous plant species both in case of the number of haploids derived and the frequencies of green versus albino seedling obtained (15). In rapeseed, success of microspore culture depends not only on the culture medium but also on the genotype, age and physiological stage of the donor plant itself, and the stage of the microspore is important (10). Based on the finding of Beversdorf *et al.* (2), there was strong correlation between mi-

crosporogenesis, the stage of microspore development at the time of culture and embryoid yield. For instance, microspore at the uninucleate stage gave the best result up to 1,300 embryoid per bud. Whereas Wenzel *et al.* (19) concluded that it has not been possible to correlate culture medium and response of microspore and it is difficult to reproduce the same result on different occasions and with different genotypes. Because of the physiological variation in the donor plant due to different conditions in the year, although grown in controlled greenhouse, genetic differences between them can not be avoided.

Thurling & Chay (18) indicated that buds of rapeseed taken from inflorescences at an earlier stage of development gave better result than those taken at a later stage. It is of paramount importance to select material at the optimum stage of microspore development. But it is also difficult to identify routinely because of the gradients within the inflorescences and the absence direct method to be used as morphological indicator. As often used in large scale production of microspore, e.g. in tobacco, microspore obtained at the time of first pollen grain mitosis produces the best result, whereas in cereals and rapeseed the optimum stage is little earlier that is when the microspore are still uninucleate stage.

The possible cause the difficulty of nucleus division in oil palm microspore might be due to the thickness of the microspore exine layer. To overcome this problem, an experiment using an enzyme extract as usually done on protoplast culture is being conducted. The formation of multi cell stage from the germinated pollen is also being done. The result so far is not yet conclusive.

Pre culture and heat treatment

In order to stimulate nucleus division of the microspore cell, pre-culture treatments had been done in microspore isolation and culture by using mannitol 0.5 M and medium culture itself without NaCl. So far there was no improvement and difference in the development of microspore and the nucleus division. The 0.5 M mannitol could keep the microspore viable for some time.

The response of microspore to media culture was not seen when incubated at 25°C. No development observed at the time even though the microspore was still alive. The promising response was found when the culture was incubated at 32-34°C for 2-5 days. Incubating the microspore for 4 h at 47°C caused them to swell and 1% produced pollen tube. In one week many microspore had undergone expansion and most cultures produced profusely pollen tubes. Table 3 shows microspore from the early mid-nucleate to early binucleate stages when treated at 32 and 47°C.

Generally all of the cultures produced pollen tube and some of the microspore were plasmolyzed. Substituting the sucrose with maltose induced the microspore to enlarge and shed their exine within 1-2 weeks after culture. Whereas maltose 0.1 M did not produce a significant difference from the control (sucrose 0.3 M), an increase in maltose concentration caused microspore to swell (Table 4).

The microspore were less triangular and more oval or rounded, very few microspore shed their exine and became spherical. Pollen tube growth was also few. The proportion of plasmolyzed microspore decreased with increasing maltose concentration.

Anther culture

Some overseas researchers have succeeded in obtaining haploid plants through anther culture which is easier than from microspore culture. The main hindrances in microspore culture are plant species, stages of microspore development, media, the healthiness of donor plant, pre treatments (temperature, osmotic pressure), and condition of culture. Whereas the disadvantages of anther culture are the emergence of diploid plants originated from division of anther cell wall, and many haploid plants produced are albino.

In this experiment the anther culture was done using some media that were described earlier. Anther response in those media was very low even though the explant was not browning, but there was no development observed during 3-4 months. Alternation of media and culture, starvation treatment with mannitol 0.4M for 1-2 weeks, preincubation of the varying the incubation time with various temperatures and cold treatment of spikelets gave the following results:

Anther culture in liquid medium

Some anthers dehisced and shed their microspore into the medium, while others remained undehisced. The shed microspore consisted of three types.

Structures observed on anthers

- i. Anthers dehisced and the extruded pollen formed a compact mass held together by continuous film like structure and of the microspores swelled and spherical in shape. A nucleus could not be observed. The exine was either attached to one side or completely shed. Cellular inclu-

- sions were present in the swollen cell which was 4-5 times larger than the microspore.
- ii. An opaque fluid filled mass was observed on some anthers. This was mostly at the point of the detached filament and in a few cases on the anther wall. Initially it resembled a water droplet and progressed by turning milky white. This structure was similar to embryogenic calli in anther culture of *Populus* species. With time, the fluid filled mass lost its moisture to form a compact smaller gray colored body on the anther surface. However, transfer of this body to fresh medium did not produce any further development.
- iii. Very rarely a nodule like structure was formed on the anther. This appeared pollen filled and did not develop further.

Sunderland and Dunwell (16) when analyzing cytologically of maize androgenesis found that embryo-like structures appeared to originated from repeated divisions of i) the vegetative cell only, ii) the generative cell only, iii) both vegetative and generative cells, and iv) symmetrical division without differentiation of vegetative and generative cells. Among them, the main way of development is the formation of embryoid or callus from the repeated divisions of the vegetative cell.

Anther culture on agar medium

In some cultures on agar medium, callus-like structures (CLS) were observed 2-4 weeks after cultures. The anther wall turned yellowish brown to dark brown and swelled at the end of the anther lobe. The wall dehisced at one or two points on the surface or dehisced

longitudinally. A friable mass of white shining CLS emerged from within the anthers, indicating the microspore origin of the CLS. Three types of CLS were produced:

CLS A: Anthers were completely dehisced. The CLS was white and shining or highly reflective. The mass extended beyond the anther wall.

CLS B: Anthers dehisced at certain places on the wall from which a mass extruded.

CLS C: The anther was completely dehisced and the CLS was covered by a continuous film. The CLS extended beyond the anther wall and was dull colored.

The callus mass consisted of few isolated microspore among single and multicellular structures. Microspores were at various stages of emergence from their exine. Cells without exine were irregular in shape and enlarged. Clumps of multicellular structure were also present. Microspores with pollen tube were present. At present anthers with CLS had been transferred to embryo regenerating medium and incubated under light.

Chen *et al.*(3,4,5) showed that in anther culture of rubber tree during the first 25 days in culture about 20 % pollen grain in some callus forming anthers developed into multicellular masses. Cytological observations showed that during the first 25 days of inoculation calli were thus primarily proliferating from the somatic tissue, but after 50 days of culture the calli and small embryoid originating from the microspore began to divide vigorously that were in close contact with the somatic cells around them.

The tissue of the anther wall plays an important role in the induction of initial sporophytic division in pollen development. Metabolites that came from the anther wall entered the anther cham-

ber and enveloped the young callus . After the tapetum cell of the anther wall disappeared, remaining cells still survive and provided certain metabolites for subsequent development of pollen. Sung Pei-Lun *et al.*(17) disagreed that the tapetum has no direct relationship with the androgenesis of pollen in the culture and that cells of both the anther connective and the middle layer of the anther wall were effective for the induction of androgenesis of pollen. The middle layer of the anther wall seem to be the principal factor.

Meanwhile Miao *et al.* (13) found that two kinds of callus formed from anther of maize, one of them the cells were rather compact and it was not easy to be viable through subcultures. And the other kind the cells were relatively loose and it was easy to be subcultured. When the latter type was cultured on the differentiation medium, bud, root or embryoid were differentiated.

CONCLUSIONS

Even though no haploid oil palm plants were recovered from this study,

the procedure deserves further consideration and investigation. So far it showed that for its first development, the uninucleate microspore stage was more suitable for inducing embryoid. It also revealed that carbohydrate source was more important than the basal media. Maltose gave the best response for microspore development in both early and late uninucleate stages. N6 with 2,4-D 2 ppm and kinetin 0.5 ppm at pH 5.8 is the best media at present time. In addition to microspore stage, there are probably many other factors which might influence the frequency of embryoid recovered, including pretreatment, medium, genotype etc. Also, it is possible that the technique might be suitable for some species and not for others.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank to Dipl. Ing. Annette Bender, Dr Christian Mollers and Dr MCM Iqbal of the University of Gottingen, Germany for their constant supports during the investigation.