

## **Pembangunan teknik krioawetan keladi menggunakan kaedah vitrifikasi titisan PVS3**

(Development of cryopreservation technique of taro using the droplet vitrification method)

Noor Camellia Noor Alam, Abdul Muhaimin Abdul Kadir dan Umikalsum Mohamed Bahari

### **Pengenalan**

Keladi (*Colocasia esculenta*) merupakan makanan ruji di Asia Pasifik dan negara-negara membangun. Hampir kesemua bahagian keladi termasuk umbisi, daun dan batang boleh dimakan. Keladi ditanam secara meluas terutamanya di Asia Tenggara, Asia Timur dan Kepulauan Pasifik. Pemuliharaan bahan genetik janaplasma tumbuhan ini telah dilakukan di luar negara menggunakan teknik tisu kultur dan krioawetan disebabkan beberapa faktor. Antaranya adalah disebabkan oleh penyebaran penyakit seperti hawar daun keladi (TLB) yang memusnahkan hampir seluruh janaplasma ladang di Kepulauan Samoa pada tahun 1993. Kemusnahan akibat bencana alam seperti banjir, kebakaran hutan dan kemarau yang teruk juga memberi ancaman kepada diversiti keladi yang menjadi sumber alternatif karbohidrat negara. Oleh itu, pembangunan teknik krioawetan sangat diperlukan untuk menyimpan koleksi janaplasma keladi di Malaysia untuk jangka masa panjang.

Krioawetan merupakan teknik simpanan jangka panjang bagi tanaman yang menghasilkan biji benih rekalsitran, tidak menghasilkan biji benih dan yang membiak secara kaedah pembiakan vegetatif. Penyimpanan pada suhu ultra sejuk menggunakan nitrogen cecair ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) menyebabkan kesemua pembahagian sel dan proses metabolik tertangguh di samping memberi kesan minimum terhadap kestabilan genetik berbanding dengan penyimpanan secara kultur tisu. Secara teorinya, bahan tumbuhan boleh disimpan tanpa sebarang subkultur dalam tempoh jangka hayat (infiniti). Penyimpanan ini juga memerlukan penyelenggaraan yang rendah bagi penggunaan tenaga kerja, ruang simpanan yang bersaiz kecil, bebas penyakit dan penggunaan elektrik yang minimum.

Oleh itu, krioawetan berpotensi untuk digunakan sebagai teknik penyimpanan jangkamasa panjang untuk keladi. Terdapat beberapa jenis pendekatan krioawetan antaranya adalah melalui penyejukan perlahan, pengeringan, pengeringan pengkapsulan dan beberapa jenis teknik vitrifikasi seperti vitrifikasi titisan dan vitrifikasi pengkapsulan. Teknik vitrifikasi titisan adalah antara teknik yang popular digunakan kerana ia adalah teknik yang efisien dan mudah serta kadar regenerasinya yang tinggi meliputi pelbagai jenis genotip tumbuhan. Teknik ini dapat mencapai kadar penyejukan dan pemanasan yang sangat tinggi disebabkan oleh dua faktor iaitu jumlah medium kriopelindung yang sangat kecil

diletakkan bersama eksplan serta kedudukan eksplan yang berada di atas kepingan aluminium yang telah melalui prapenyjukan di atas bongkah ais sebelum dimasukkan ke dalam nitrogen cecair.

### **Proses asas teknik krioawetan**

Proses asas teknik krioawetan keladi melalui kaedah vitrifikasi titisan menggunakan cecair kriopelindung *Plant vitrification solution 3* (PVS3) ditunjukkan secara ringkas seperti dalam *Carta alir 1* manakala kandungan medium dan larutan yang digunakan dalam proses krioawetan dinyatakan seperti dalam *Jadual 1*.

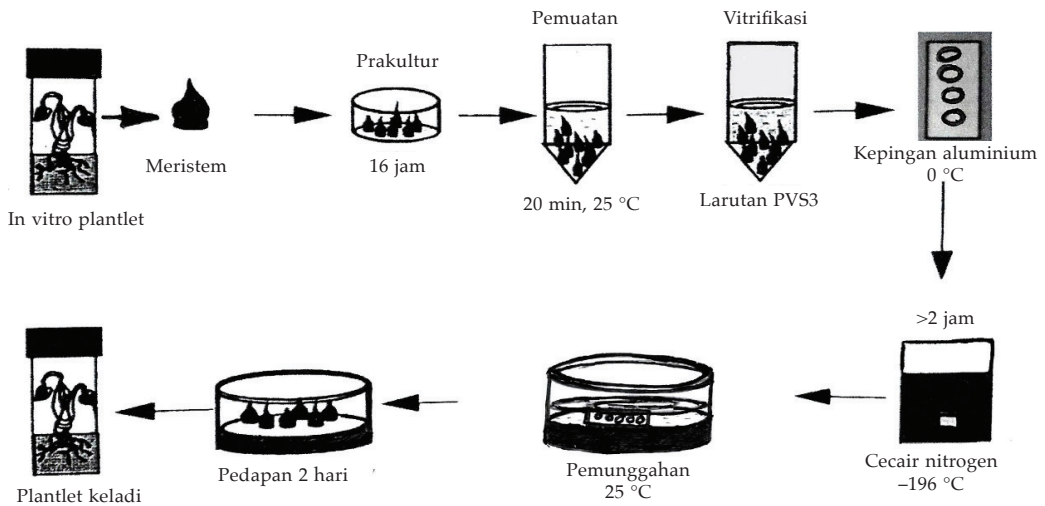
### **Pembangunan teknik krioawetan vitrifikasi titisan**

Keladi yang dibiakkan secara in vitro digunakan sebagai sumber eksplan. Meristem apeks yang berukuran 0.8 – 1.0 mm diekstrak daripada eksplan tersebut menggunakan mikroskop stereo di dalam kebuk laminar. Meristem tersebut diprakultur ke dalam piring Petri mengandungi medium prakultur separa pepejal dan disimpan semalaman dalam keadaan gelap. Kemudian, eksplan tersebut dimasukkan ke dalam larutan pemuatan (*loading*) atau larutan pelindung krio selama 20 minit pada suhu bilik bagi tujuan memberi perlindungan kepada sel membran supaya tidak membentuk kristal ais setelah dimasukkan ke dalam nitrogen cecair.

Kemudian, eksplan dimasukkan ke dalam larutan vitrifikasi PVS3 bertujuan untuk mengeluarkan lebih air dalam sel daripada membentuk kristal ais semasa proses krioawetan dijalankan. Selepas pendedahan kepada larutan PVS3 selama 10 minit, eksplan bersama larutan PVS3 dialihkan menggunakan pipet pakai buang steril dan diletakkan dalam satu titisan di atas kepingan aluminium bersuhu 0 °C di atas blok ais (*Carta alir 1*). Kepingan aluminium bersama eksplan tadi kemudiannya dimasukkan ke dalam nitrogen cecair untuk simpanan jangka masa panjang sekurang-kurangnya dalam tempoh 1 jam hingga lebih dari 100 tahun.

### **Pemulihan eksplan selepas krioawetan**

Pemulihan selepas krioawetan perlu dilakukan dengan teliti kerana langkah ini akan menentukan kadar kemandirian eksplan. Kepingan aluminium bersama eksplan yang dikeluarkan daripada nitrogen cecair direndam ke dalam larutan pemunggaan selama 15 minit pada suhu bilik sebelum dikulturkan ke atas medium pedapan selama dua hari. Eksplan seterusnya dialihkan ke medium pemulihan untuk pertumbuhan menjadi plantlet. Plantlet perlu disubkultur ke atas medium pemulihan baharu selepas enam minggu dikulturkan.



Carta alir 1. Proses penyimpanan meristem keladi secara krioawetan menggunakan kaedah titisan vitrifikasi

Jadual 1. Kandungan medium dan larutan yang digunakan dalam proses krioawetan

Medium/larutan	Kandungan medium/larutan
Medium prakultur	Medium Murashige & Skoog + 0.3 M sukrosa (separa pepejal)
Larutan pemuatan ( <i>loading</i> )	Medium Murashige & Skoog + 1.5 M gliserol + 5% dimethyl sulfoxide (DMSO) + 0.4 M sukrosa (optimum)
Larutan vitrifikasi PVS3	Medium Murashige & Skoog + 50% gliserol + 50 % sukrosa
Larutan pemunggaan ( <i>unloading</i> )	Medium Murashige & Skoog + 1.2 M sukrosa (optimum)
Medium pedapan	Medium Murashige & Skoog + 0.3 M sukrosa + kertas turas berganda
Medium pemulihan	Medium Murashige & Skoog + 0.1 M sukrosa

### Kesan teknik krioawetan secara vitrifikasi titisan

Selepas enam minggu pengkulturan, pemulihan meristem apeks keladi yang dikrioawetkan dapat dicapai sehingga 78% kemandirian menggunakan teknik yang dibangunkan ini (Jadual 2 dan 3). Pendedahan eksplan kepada larutan pemuatan (1.5 M gliserol + 5% DMSO + 0.4 M sukrosa) selama 20 minit, larutan kriopelindung PVS3 selama 10 minit dan pemulihan semula selepas krioawetan dengan rendaman dalam larutan pemunggaan (1.2 M sukrosa) selama 15 minit pada suhu 25 °C adalah teknik yang paling optimum untuk mendapatkan kadar regenerasi yang tinggi selepas krioawetan. *Gambar 1* menunjukkan regenerasi meristem apeks keladi selepas krioawetan dan tanpa krioawetan menggunakan pelbagai jenis larutan pemuatan. Tiada perbezaan ketara dapat dilihat pada pertumbuhan anak benih yang berbeza rawatan larutan pemuatan. Penambahan sebanyak

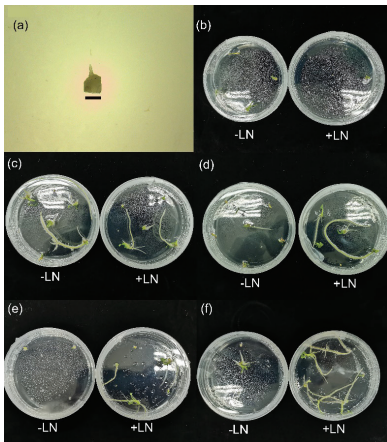
5% DMSO dalam larutan pemuatan tidak signifikan secara statistik namun penggunaannya pada jenis tumbuhan yang lain seperti *Rosa hybrida* dapat meningkatkan lagi kadar regenerasi tumbuhan selepas dikrioawetkan. DMSO juga digunakan secara meluas sebagai kriopelindung yang ditambah sebelum krioawetan dilakukan sama ada semasa peringkat prakultur ataupun vitrifikasi. Anak benih keladi yang berjaya diregenerasi, diaklimatisasikan menggunakan medium penanaman gambut Holland. Tiada perbezaan dari segi pembesaran diperhatikan pada anak benih yang melalui proses krioawetan dan tanpa krioawetan selepas tujuh minggu diaklimatisasi (*Gambar 2*).

Jadual 2. Kesan kombinasi masa pendedahan kepada larutan penghidratan PVS3 dan jenis proses pemungahan terhadap kemandirian meristem apeks keladi

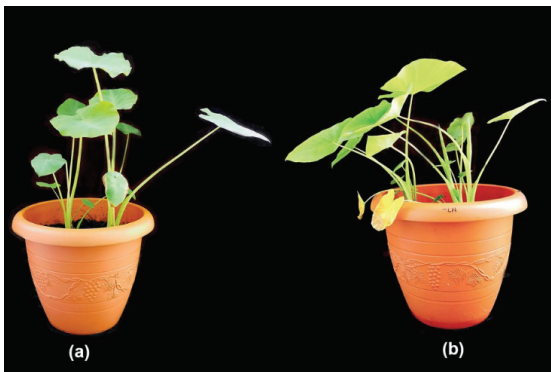
Jenis dan tempoh proses pemungahan	Masa pendedahan terhadap larutan PVS3 (minit)	Kemandirian (%) (Min ± ralat piawai)
		Krioawetan
0.8 M sukrosa; 40 °C 30 saat, 25 °C 40 minit (Kim, 2012)	0	4.7 ± 4.6 b
	10	21 ± 4.0 bc
	30	5.7 ± 5.6 b
	60	0 a
1.2 M sukrosa; 25 °C 15 minit	10	41 ± 8.5 c
	15	17 ± 16.5 bc
	20	0 a
	25	8 ± 8 b

Jadual 3. Peratus kemandirian meristem apeks keladi yang melalui proses krioawetan dan tanpa krioawetan selepas dirawat dengan larutan pemuatan berbeza dan diikuti dengan 10 minit masa penghidratan dalam larutan PVS3 dan dipulihkan semula selepas krioawetan dengan rendaman dalam larutan pemungahan (1.2 M sukrosa) pada suhu bilik selama 15 minit

Larutan pemuatan	Kemandirian (%)	
	Krioawetan	Tanpa krioawetan
Kawalan (tanpa rawatan)	5.6 ± 5.6 a	58.9 ± 4.9 abc
2.0 M gliserol + 0.4 M sukrosa	61.1 ± 14.7 b	72.2 ± 5.5 bc
2.0 M gliserol + 5 % DMSO + 0.4 M sukrosa	55.5 ± 14.7 b	83.3 ± 9.6 c
1.5 M gliserol + 0.4 M sukrosa	55.6 ± 20.0 b	44.4 ± 5.6 ab
1.5 M gliserol + 5 % DMSO + 0.4 M sukrosa	77.8 ± 11.1 b	33.4 ± 16.7 a



Gambar 1. (a) Eksplan meristem apeks keladi sebelum dikrioawetkan; berskala = 1.0 mm. Pertumbuhan meristem apeks keladi selepas dikrioawetkan (+LN) dan tanpa krioawetkan (-LN) selepas dirawat dengan pelbagai jenis larutan pemuatan iaitu (b) tanpa rawatan (c) 2.0 M gliserol (d) 2.0 M gliserol +5% DMSO (e) 1.5 M gliserol dan (f) 1.5M gliserol + 5% DMSO



Gambar 2. Anak benih keladi berumur tujuh minggu selepas aklimatisasi diperolehi daripada (a) krioawetkan dan (b) kawalan tanpa krioawetkan

## Kesimpulan

Penyimpanan jangka masa panjang keladi secara krioawetkan merupakan penyelesaian kepada masalah simpanan bahan genetik tanaman selain di janaplasma ladang kerana tidak memerlukan ruang simpanan yang besar disebabkan saiz eksplan yang digunakan adalah kecil dan bebas daripada penyakit dan perosak tanaman. Penyimpanan secara krioawetkan keladi hanya memerlukan penyelenggaraan yang minimum. Melalui teknik krioawetkan vitrifikasi titisan yang memberikan kadar kemandirian yang tinggi sehingga 78%, maka kaedah ini boleh diguna pakai untuk penyimpanan janaplasma keladi secara krioawetkan di Malaysia.

## Bibliografi

- Abdulai, M., Norshie, P.M. dan Santo, K.G. (2020). Incidence and severity of taro (*Colocasia esculenta* L.) blight disease caused by *Phytophthora colocasiae* in the Bono Region of Ghana. *SSRG International Journal of Agriculture and Environmental Science* 7(2): 52 – 63
- Alexandra, S., Jamora, N., Smale, M. dan Ghanem, M. E. (2020). The tale of taro leaf blight: a global effort to safeguard the genetic diversity of taro in the Pacific. *Food Security* 12: 1005 – 1016

- Brison, M., Boucaud, M. T., Pierronnet, A. dan Dosba, F. (1997). Effect of cryopreservation on the sanitary state of a cv. *Prunus* rootstock experimentally contaminated with Plum Pox Potyvirus. *Plant Science* 123: 189 – 196
- Helliot, B., Panis, B., Poumay, Y., Swennen, R., Lepoivre, P. dan Frison, E. (2002). Cryopreservation for the elimination of cucumber mosaic and banana streak viruses from banana (*Musa* spp.). *Plant Cell Reports* 20: 1,117 – 1,122
- Kim, H.H. (2012). ‘Personalisation’ of droplet-vitrification, protocols for plant cells: A systematic approach to optimizing chemical and osmotic effects. *Cryoletters* 33(4): 271 – 279
- Macharia, M.W., Runo, S.M., Muchugi, A.N. dan Palapala, V. (2014). Genetic structure and diversity of East African taro [*Colocasia esculenta* (L.)]. *African Journal of Biotechnology* 13(29): 2,950 – 2,955
- Maxted, N., Ford-Lloyd, B.V. dan Hawkes, J.G. (1997). Contemporary conservation strategies. Dalam: Maxted N., Ford-Lloyd B.V. dan Hawkes J.G. (ed.) *Plant Genetic Conservation: The In-situ Approach*. Chapman and Hall, London. m.s. 20 – 55
- Murashige, T. dan Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473 – 497
- Noor Camellia, N.A., Abdul Muhaimin, A.K., Nur Atisha, S., Mohd Norfaizal, G., Suryanti, B. dan Umikalsom, M.B. (2020). *In vitro* Micropropagation Techniques of Two Local Taro Cultivars. *Transactions of the Malaysian Society of Plant Physiology* 27: 199 – 203
- Panis, B., Piette, B. dan Swennen, R. (2005). Droplet vitrification of apical meristems: A cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. *Plant Science* 168(1): 45 – 55
- Panis, B., Andre, E. dan Swennen, R. (2011). Development of droplet-vitrification protocols for tropical vegetatively propagated crops. In Grapin, A., Keller, E.R.J., Lynch, P.T., Panis, B., Bahillo, A.R. dan Engelmann, F. (ed.), *Cryopreservation of crop species in Europe: Proceedings of the final meeting Agrocampus Ouest Centre d’Angers INHP, Angers, France*. m.s. 104 – 109
- Park, S.U. dan Kim, H.H. (2015). Cryopreservation of sweet potato shoot tips using a droplet-vitrification procedure. *Cryoletters* 36(5): 344 – 352
- Sakai, A., Kobayashi, S. dan Oiyama, I. (1990). Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) cooled to -196 °C. *Journal of Plant Physiology* 137: 465 – 470
- Sant, R., Taylor, M. dan Tyagi, A. (2006). Cryopreservation of in vitro-grown shoot-tips of tropical taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) by vitrification. *Cryoletters* 27: 133 – 142
- Sant, R., Panis, B., Taylor, M. dan Tyagi, A. (2008). Cryopreservation of shoot tips by droplet vitrification applicable to all taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) accessions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 92: 107 – 111

- Taylor, M., Hunter, D., Rao, V.R., Jackson, G.V.H., Sivan, P. dan Guarino, L. (2010). Taro collecting and conservation in the Pacific Region. PAPGREN C taro collecting and complementary conservation V3
- Towill, L.E. dan Bonnart, R. (2003). Cracking in a vitrification solution during cooling or warming does not affect growth of cryopreserved mint shoot tips. *Cryoletters* 24: 341 – 346
- Withers, L.A. dan Engels, J.M.M. (1990). The test tube genebank - a safe alternative to field conservation. IBPGR Newsletter for Asia and the Pacific 3. m.s. 1 – 2

### **Ringkasan**

Kajian ini dijalankan untuk meneroka kebolehlaksanaan teknik krioawetan menggunakan vitrifikasi titisan dan menyediakan asas untuk mewujudkan protokol krioawetan untuk aplikasi rutin dalam pemuliharaan gemplasma keladi Malaysia. Meristem apeks varieti keladi putih bersaiz 0.6 – 0.8 mm daripada eksplan kultur in vitro berumur tiga bulan dalam medium Murashige dan Skoog (MS) digunakan. Eksplan diprakultur pada medium MS dengan penambahan 0.3 M sukrosa disimpan selama 16 jam dalam keadaan gelap. Eksplan didedahkan kepada larutan pemuatan, larutan penghidratan PVS3, dimasukkan ke dalam nitrogen cecair dan dipulihkan dalam larutan pemunggaan dan dikultur ke atas medium pedapan dan pemulihan untuk mendapatkan semula regenerasi eksplan. Peratus kemandirian meristem apeks keladi yang diperolehi adalah sebanyak 78%. Penggunaan kombinasi tiga langkah kritikal yang tepat dalam proses krioawetan (pemuatan, penghidratan dan pemunggaan) dapat meningkatkan kadar kemandirian meristem apeks. Krioawetan menggunakan prosedur vitrifikasi titisan terbukti dapat digunakan untuk penyimpanan keladi dalam jangkamasa panjang.

### **Summary**

This study was conducted to explore the feasibility of the droplet-vitrification cryopreservation procedure and provide the groundwork for establishing a cryopreservation protocol for routine application in germplasm conservation of Malaysian taro. Apical meristem with size of 0.5 – 0.8 mm from 3 months old in vitro plantlets of *keladi putih* variety cultured on Murashige and Skoog (MS) medium were used. Explants were precultured on MS medium supplemented with 0.3 M sucrose for 16 hours under dark conditions. The explants were exposed to a loading solution, PVS3 dehydration solution, immersed in liquid nitrogen and recovered in the unloading solution and cultured on blotting and recovery media to regain explant regeneration. The percentage survival of the apical meristem of taro was achieved as high as 78%. The use of perfect combinations in the critical step in cryopreservation (loading, dehydration, and unloading) increased the survival rate of the cryopreserved meristem. Cryopreservation techniques employing droplet vitrification proved to be viable for the long-term storage of taro.

**Pengarang**

Noor Camellia Noor Alam

Pusat Penyelidikan Tanaman Industri

Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor

E-mel: camellia@mardi.gov.my

Abdul Muhaimin Abdul Kadir dan Umikalsum Mohamed Bahari

Pusat Penyelidikan Tanaman Industri,

Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor