Buletin Teknologi MARDI Bil. 38 (2023): 23 – 30

Morfologi debunga dan proses pendebungaan titisan induk sitoplasma mandul jantan dan induk penyenggara padi hibrid tempatan

(Pollen morphology and pollination process of local cytoplasmic male sterile and maintainer lines of hybrid rice)

Shahida Hashim, Phebe Ding, Asfaliza Ramli dan Elixon Sunian

Pengenalan

Padi merupakan tanaman yang melakukan pendebungaan sendiri di mana setiap bunga padi mengandungi kedua-dua bahagian jantan dan betina. Ciri ini membolehkan setiap bunga padi mendebunga sendiri tanpa memerlukan bunga atau pokok padi yang lain. Benih padi terhasil apabila telur di dalam ovari disenyawakan oleh biji debunga yang dilepaskan oleh anter daripada floret yang sama, anter daripada floret lain dan anter daripada pokok lain varieti yang sama. Namun, kejadian kacuk-silang (*out-crossing*) pokok padi boleh berlaku di petak sawah tetapi pada kadar yang sangat rendah (<4%), juga bergantung kepada susun atur pokok di sawah dan keadaan persekitaran seperti tiupan angin. Spesies *Oryza* liar diketahui mempunyai sifat kacuk-silang yang tinggi (0 – 44%) berbanding dengan padi yang ditanam (*cultivated rice*). Pada tahun 1973, saintis telah menjumpai pokok padi *wild-abortive cytoplasmic male sterile* (WA-CMS) di Pulau Hainan. Pokok padi WA-CMS ini tidak mampu membentuk biji menerusi pendebungaan sendiri disebabkan oleh biji debunganya yang bersifat mandul. Justeru, titisan ini dijadikan sebagai induk betina atau lebih dikenali sebagai sitoplasma mandul jantan (CMS) dalam sistem padi hibrid. Titisan WA-CMS ini telah digunakan secara meluas sebagai komponen utama dalam sistem tiga titisan padi hibrid di negara China disebabkan prestasi kacuk-silangnya yang baik.

Titisan CMS yang diperkenalkan dari pelbagai tempat mungkin tidak sesuai untuk ditanam di kawasan tertentu dan adalah penting untuk memindahkan sistem CMS sedia ada kepada titisan penyenggara elit yang beradaptasi dengan baik dengan keadaan sekitarannya. Pemindahan sistem CMS kepada latar belakang genetik titisan-titisan penyenggara elit mungkin boleh dijalankan dengan menggunakan kaedah kacuk semula (*back-crossing*) dan lazimnya 5 – 6 kacuk semula (BC_1 – BC_6) diperlukan bagi mendapatkan titisan penyenggara yang stabil.

Beberapa titisan CMS seperti IR58025A/B dan IR62829A/B telah diimpot dari *International Rice Research Institute* (IRRI) dan digunakan dalam program pembaikbakaan padi hibrid MARDI. Walau bagaimanapun, kedua-dua CMS ini mempunyai tempoh matang yang awal iaitu kurang dari 110 hari dan kemandulan biji debunganya adalah tidak stabil. MARDI juga telah membangunkan beberapa titisan CMS seperti MR283A/B,

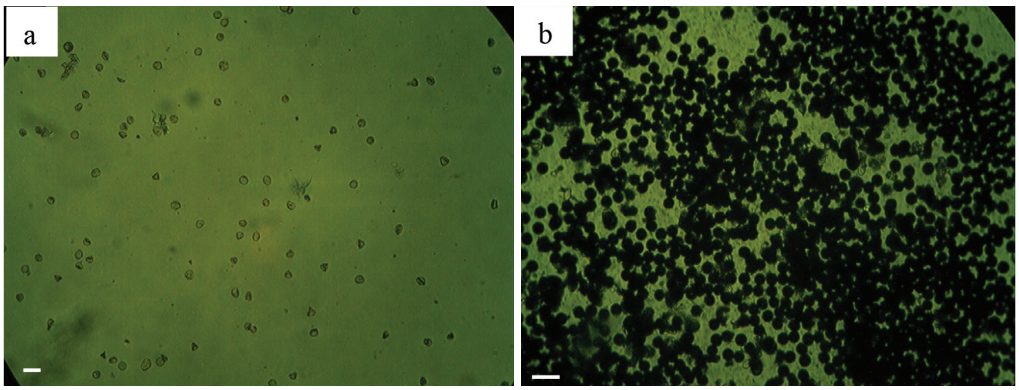
MR122A/B, RU2340A/B, MH805A/B dan MH813A/B. Namun, kesemua titisan CMS ini tidak dapat digunakan dalam pengeluaran benih generasi pertama (F_1) disebabkan kadar kacuk silang yang rendah dan kemandulan biji debunga yang tidak stabil. Sehingga kini, dua titisan CMS tempatan telah dikenal pasti sebagai titisan penyenggara setelah titisan-titisan ini dikacuk uji dengan titisan CMS dari IRRI. Titisan-titisan ini dikenali sebagai P519 dan MR243 dan kedua-duanya diklasifikasikan sebagai titisan separa penyenggara disebabkan kadar fertiliti 6.4% dan 7.2% apabila masing-masing dikacukkan dengan titisan CMS impot IR78374A dan 1A. Sebagai keputusannya, kombinasi titisan CMS dan penyenggara ini dikenali sebagai 0025A/0025B dan 0047A/0047B dan berjaya dihasilkan selepas masing-masing melalui 5 – 6 kacuk semula IR78374A dengan P159 dan 1A dengan MR243.

Artikel ini membincangkan dengan lebih mendalam tentang morfologi biji debunga serta proses pendebungaan yang berlaku antara titisan CMS dan penyenggara tempatan (0025A/0025B) yang telah berjaya dibangunkan oleh ahli baik baka MARDI sebagai rujukan dan maklumat umum.

Kemandulan biji debunga dan klasifikasinya

Sistem sitoplasma mandul jantan telah digunakan secara meluas dalam industri padi hibrid dan dikenal pasti sebagai kaedah yang paling berkesan dan terbukti dalam menghasilkan benih padi hibrid secara komersial. Sistem yang dikenali sebagai sistem tiga titisan ini melibatkan tiga titisan induk iaitu CMS, penyenggara dan pemulih. Langkah pertama dalam sistem ini adalah aktiviti penggandaan benih CMS di mana titisan induk CMS dikacukkan dengan induk penyenggaranya bagi menghasilkan benih CMS. Benih CMS yang dihasilkan kemudiannya dikacukkan dengan induk pemulih bagi mendapatkan benih padi hibrid F_1. Dalam sistem tiga titisan ini, induk CMS yang ideal harus mempunyai sifat mandul jantan yang stabil.

Kemandulan biji debunga bagi kedua-dua titisan induk CMS dan penyenggaranya diklasifikasikan berdasarkan kaedah Virmani et al. (1997) dengan menggunakan tompokan 1% iodine potassium iodide (I-KI) dan hasil pemerhatian adalah seperti dalam *Gambar 1*. Biji debunga induk CMS tidak terkesan dengan tompokan I-KI, berbentuk sfera dan kemandulan debunga (*pollen sterility*) ialah 100% yang boleh diklasifikasikan sebagai mandul sepenuhnya (*completely sterile*) (*Jadual 1*). Biji debunga penyenggara, 0025B menunjukkan tompokan biru gelap, berbentuk bulat dan peratus kemandulan adalah sifar dan boleh diklasifikasikan sebagai subur sepenuhnya (*fully fertile*). Ini menunjukkan bahawa CMS yang digunakan mempunyai sifat mandul jantan yang stabil. Sifat mandul jantan CMS menjadikannya tidak berfungsi dan pada keadaan ini, peranan induk penyenggara adalah amat penting.



Gambar 1. Biji debunga induk (a) CMS 0025A dan (b) induk penyenggara 0025B dilihat di bawah mikroskop cahaya. Biji debunga ditompokkan dengan 1% iodine potassium iodide di mana biji debunga yang menunjukkan tompokan biru gelap diklasifikasikan sebagai subur dan biji debunga yang menunjukkan tompokan kuning diklasifikasikan sebagai mandul berdasarkan kepada Virmani et al. (1997). Penunjuk skala: A: 50 µm dan B: 60 µm

Jadual 1. Kemandulan biji debunga titisan induk sitoplasma mandul jantan dan induk penyenggara tempatan

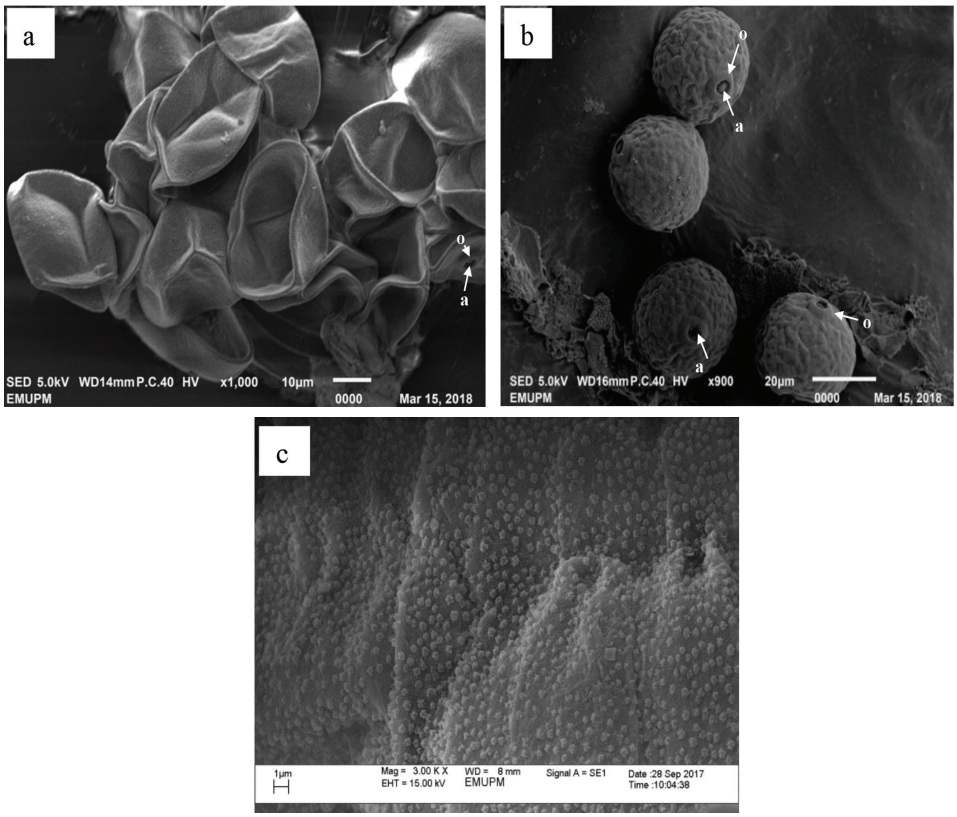
Titisan	Kemandulan debunga (%)
0025A	100
0025B	0

n = 10

Bijirin debunga subur yang dibekalkan oleh induk penyenggara boleh digunakan semasa proses pendebungaan antara induk CMS dan induk penyenggara bagi mendapatkan hasil yang baik.

Biji debunga kedua-dua titisan induk dikumpulkan sebelum anter terbuka, diproses dan diperhati di bawah mikroskop pengimbas elektron. Biji debunga induk CMS 0025A dan penyenggaranya, 0025B mempunyai satu liang (*porate*), dikelilingi oleh *annulus* dan dilitupi oleh *operculum* dan sifat ini merupakan ciri pokok padi yang dimiliki oleh keluarga Poaceae [*Gambar* 2(*a*) dan (*b*)]. Biji debunga induk CMS kelihatan mengecut [*Gambar* 2(*a*)] manakala biji debunga penyenggaranya, 0025B berbentuk bulat [*Gambar* 2(*a*)]. Keadaan biji debunga yang mengecut, berbentuk tidak sekata dan tidak terkesan dengan larutan I-KI menyokong kenyataan Yuan dan Fu (1995) yang menyatakan bahawa biji debunga induk CMS mengalami keguguran (*abortion)* semasa peringkat permulaan pembentukan mikrospora. Diameter biji debunga 0025B ialah 20.1 – 24.3 µm (*Jadual* 2) manakala diameter biji debunga CMS 0025A tidak diukur kerana bentuk yang tidak rata dan strukturnya yang runtuh. Biji debunga ini dikategorikan sebagai bersaiz kecil jika dibandingkan dengan saiz biji debunga kebanyakan genus *Oryza sativa* yang mempunyai julat 36 – 56 µm. Adalah dijangkakan bahawa lebih banyak biji debunga dapat ditempatkan di dalam anter titisan induk penyenggara disebabkan saiznya yang kecil. Justeru, lebih banyak biji debunga yang dilepaskan oleh anter dapat meningkatkan kadar kacuk-silang semasa aktiviti pendebungaan.

Permukaan biji debunga kedua-dua titisan induk CMS 0025A dan penyenggara, 0025B boleh diklasifikasikan sebagai berbutir jarang-jarang (*sparsely granulated*) jika dirujuk kepada Chaturvedi dll. (1998) [*Gambar 2(c)*]. Justeru, adalah dijangkakan biji debunga mudah dibawa oleh angin bagi meningkatkan kebarangkalian berlakunya aktiviti pendebungaan. Spesies *anemophilous* seperti Asteraceae dan Poaceae mempunyai permukaan debunga yang hampir sama dan lazimnya bersaiz kecil, tidak menarik, boleh mengeluarkan nektar dan kurang melekat.



Gambar 2. Biji debunga induk sitoplasma mandul jantan 0025A (CMS) dan penyenggara 0025B yang disampel sebelum anter terbuka dan diperhatikan di bawah mikroskop pengimbas elekron. Biji debunga (a) CMS 0025A (10 µm, 1000 x) dan (b) penyenggara 0025B (20 µm, 900 x) seperti ditunjukkan oleh anak panah menunjukkan ciri monoporate dengan kehadiran liang operculate-annulate dan (c) biji debunga yang diperhatikan di bawah skala pembesaran tinggi menunjukkan permukaan bersifat berbutir jarang-jarang (sparsely granulated) (1 µm, 3000 x) Singkatan simbol: a = annulus, o = operculum

Jadual 2. Diameter biji debunga induk penyenggara 0025B

	Diameter biji debunga (μm ± S.D.)
Min	22.2 ± 2.1

S.D. = sisihan piawai
n = 10

Proses pendebungaan induk sitoplasma mandul jantan dan induk penyenggara tempatan

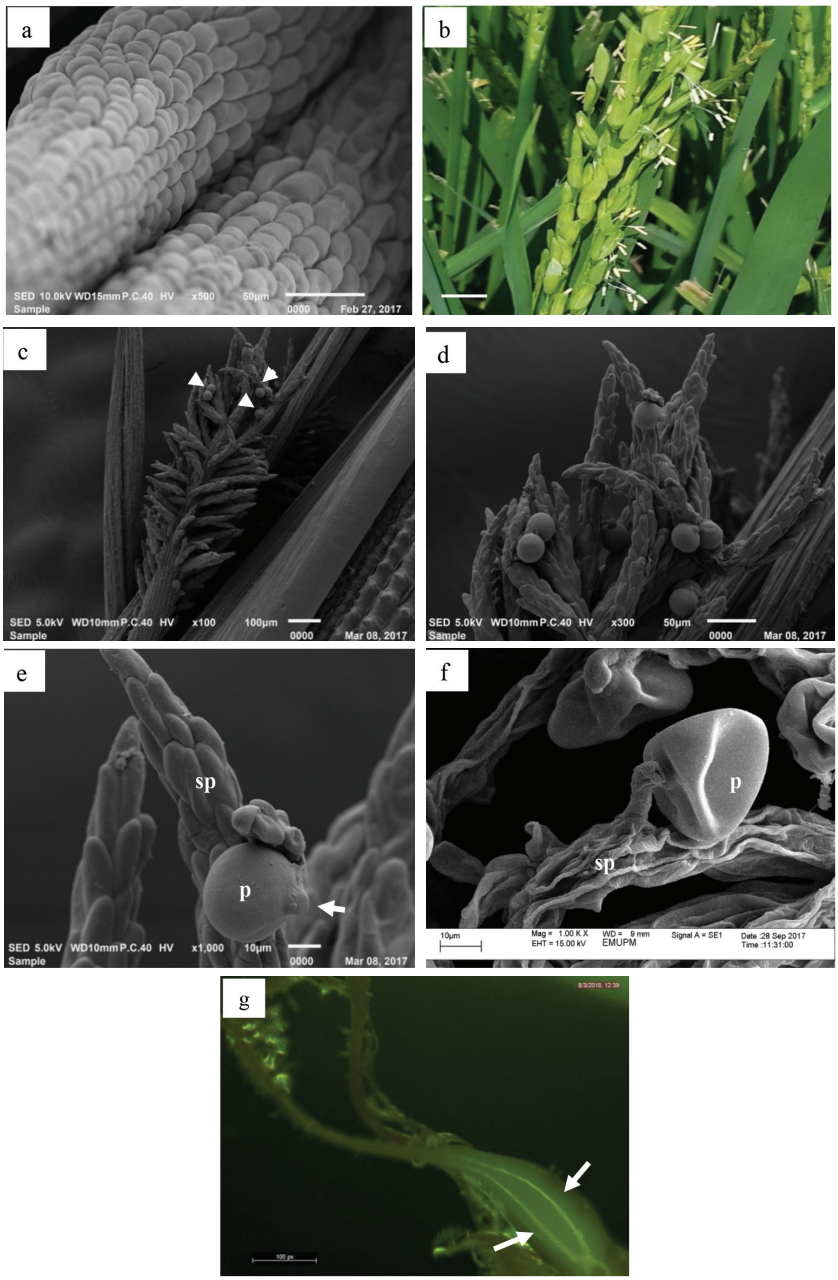
Adalah diketahui bahawa dalam pengeluaran benih padi hibrid tempatan, sistem kemandulan induk jantan dipraktikkan di mana biji debunga CMS bersifat mandul. Justeru, biji debunga subur yang dilepaskan daripada anter induk penyenggara berkenaan digunakan bagi mendapatkan hasil melalui kacuk-silang. Sebelum antesis atau proses pembungaan bermula, tiada biji debunga diperhatikan di sekeliling *thecae* pada anter induk penyenggara [*Gambar 3*(*a*)]. Selepas satu minit floret terbuka, anter mula terjuntai keluar daripada floret dengan bantuan filamen [*Gambar 3*(*b*)]. Biji-biji debunga yang dilepaskan oleh anter induk penyenggara kemudiannya dijatuhkan ke atas stigma induk CMS 0025A seperti dalam *Gambar 3*(*c*). Berdasarkan pemerhatian terdapat 15 – 21 biji debunga kelihatan melekat di atas papilla stigma dan 13 – 15 biji debunga bercambah (*Jadual 3*). Kato dan Namai (1987) mengandaikan bahawa kehadiran 3 – 4 biji debunga sudah memadai bagi proses persenyawaan dan seterusnya pembentukan hasil (*seed set*) pada induk CMS.

Secara amnya, mana-mana spesies tumbuhan biji debunganya adalah bersifat statik dan terhidrat apabila dikeluarkan daripada anter. Bagi spesies seperti *Oryza sativa* L., stigmanya bersifat kering dan berbulu sama seperti genus Poaceae yang lain dan juga Brassicaceae. Biji debunga yang ringan dan kering ini mudah dibawa oleh angin. Biji debunga yang pada awalnya kelihatan mengecut bertukar kepada bentuk bulat dan penuh selepas mendarat/melekat di stigma [*Gambar 3*(*d*)] dan kemudiannya mula bercambah [*Gambar 3*(*e*)]. Ini menunjukkan biji debunga telah menyerap lembapan daripada papilla stigma. Lazimnya, setelah biji debunga melekat di stigma, langkah pertama dalam proses pendebungaan adalah pengembangan biji debunga melalui penyerapan air, nutrien dan molekul-molekul kecil yang lain secara pantas ke dalamnya daripada papilla stigma. Proses hidrasi ini dimudahkan dengan kehadiran aluran air ke membran plasma sel-sel stigma. Dua jam selepas antesis, kebanyakan biji debunga dan papilla stigma mengecut [*Gambar 3*(*f*)] dan kelihatan tiub debunga menembusi stigma melalui liang percambahan (*germ pore*) [*Gambar 3*(*g*)]. Dua puluh empat jam selepas antesis, tiub-tiub debunga kelihatan di dalam ovari CMS 0025A selepas diberi larutan biru anilin dan pemerhatian ini juga selari dengan laporan Virmani (1994) terhadap padi inbred. Ini menunjukkan bahawa proses pembungaan induk CMS dan induk penyenggaranya adalah sama seperti varieti padi inbred yang lain.

Jadual 3. Bilangan biji debunga di atas stigma semasa pembungaan

	Bilangan debunga (min ± S.D.)
Mean	18 ± 2.5

S.D. = Sisihan piawai
n=10



Gambar 3. Interaksi biji debunga-stigma semasa pendebungaan induk CMS 0025A dan induk penyenggara. (a) Tiada biji debunga kelihatan di sekitar thecae anter sebelum antesis (50 µm, 500 x), (b) ada antara anter induk penyenggara 0025B terjuntai daripada floret (10 mm), (c) biji debunga kelihatan melekat di stigma seperti ditunjukkan oleh anak panah (100 µm, 100 x), (d) biji debunga kelihatan mengembang disebabkan penyerapan lembapan daripada papilla stigma dalam masa sejam selepas antesis (50 µm, 300 x), (e) biji debunga mula bercambah seperti ditunjukkan oleh anak panah (10 µm, 1000 x), (f) biji debunga dan papilla stigma kelihatan mengecut dan runtuh dua jam selepas antesis (10 µm, 1000 x) dan (g) anak panah menunjukkan tiub debunga kelihatan 24 jam selepas antesis dengan menggunakan mikroskop floresen (100 µm, 160 x)
Singkatan simbol: p = biji debunga, sp = papilla stigma

Kesimpulan

Ciri-ciri biji debunga antara induk CMS dan penyenggara tempatan adalah berbeza di mana induk CMS menunjukkan bentuk tidak sekata dan tidak terkesan dengan larutan I-KI. Justeru, ini menunjukkan induk CMS tempatan mempunyai sifat kemandulan yang stabil dan sesuai dijadikan induk betina dalam sistem tiga titisan padi hibrid. Proses pendebungaan antara kedua-dua induk adalah dramatik bermula daripada biji debunga daripada anter sehinggalah kepada proses persenyawaan. Kejayaan kadar kacuk-silang antara induk CMS dan induk penyenggara adalah bergantung juga kepada ciri bunga serta proses pendebungaan selain daripada faktor-faktor sekitaran yang lain bagi membentuk biji benih padi hibrid.

Bibliografi

Chaturvedi, M., Datta, K., & Nair, K. K. (1998). Pollen morphology of *Oryza* (Poaceae). *Grana,* 37(2), 79–86.

Kato, H., & Namai, H. (1987). Floral characteristics and environmental factors for increase natural outcrossing rate for F_1 hybrid seed production of rice (*Oryza sativa* L.). *Japanese Journal of Biology,* 37, 318–330.

Virmani, S. S. (1994). Heterosis and hybrid rice breeding. Dalam: *Monographs on theoretical and applied genetics* (Vol. 22). (Frankes, R., Grossman, B. M., Linsken, W. H. F., Muliga, N.P. & Riley, P.R., ed.). Germany: Springer-Verleg

Virmani, S. S., Viraktamath, B. C., Casal, C. L., Toledo, R. S., Lopez, M. T., & Manalo, J. O. (1997). *Hybrid rice breeding manual*. Manila: IRRI Press

Yuan, L. P. & Fu, X. (1995). Technology of hybrid rice production. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Ringkasan

Padi hibrid merupakan tanaman padi komersial yang ditanam daripada benih generasi pertama hasil kacukan dua induk yang mempunyai ciri genetik berbeza. Padi hibrid yang dibangunkan di China sedang diguna pakai di tempat lain dan telah terbukti selama bertahun-tahun di mana padi hibrid merekodkan peningkatan hasil melebihi 20% berbanding dengan varieti padi inbred. Teknologi pengeluaran benih padi hibrid adalah berbeza sekali dengan pengeluaran benih padi inbred di mana sistem sitoplasma mandul jantan (CMS) telah digunakan secara meluas. Dalam sistem ini, biji debunga CMS bersifat mandul digunakan. Oleh itu, biji debunga subur yang dilepaskan oleh anter induk penyenggara digunakan untuk menghasilkan benih CMS melalui kejadian kacuk-silang atau pendebungaan silang. Kefahaman tentang sifat morfologi biji debunga dan proses pendebungaan antara titisan induk adalah penting dan maklumat ini dijelaskan dalam artikel ini untuk rujukan pada masa hadapan.

Summary
Hybrid rice is a commercial rice crop cultivated from first filial generation seeds of a cross between two genetically dissimilar parents. The hybrid rice that developed in China is being adopted elsewhere and it has been proven for many years where hybrid rice has achieved 20% more yield than improved inbred varieties. The technology of hybrid rice seed production is totally different from the inbred rice seed production where cytoplasmic male sterility (CMS) system has been used widely. In this system, sterile or unviable CMS pollen grain is used. Hence, fertile pollen grain released from the anther of its respective maintainer is used to produce CMS seed via out-crossing or cross-pollination. Understanding the morphology of pollen grain and pollination process between parental lines is crucial and these informations are explained in this article for future reference.

Pengarang
Shahida Hashim (Dr.)
Pusat Penyelidikan Padi dan Beras
MARDI Seberang Perai
13200 Kepala Batas, Pulau Pinang
E-mel: shahida@mardi.gov.my

Phebe Ding (Dr.)
Fakulti Pertanian
Universiti Putra Malaysia
43400 Serdang, Selangor

Asfaliza Ramli (Dr.)
Pejabat Ketua Pengarah
Ibu Pejabat MARDI
43400 Serdang, Selangor

Elixon Sunian (Dr.)
Pusat Penyelidikan Padi dan Beras
MARDI Seberang Perai
13200 Kepala Batas, Pulau Pinang