

## **Kultur akar rambut *in vitro* serta pemanfaatan kultur ganda untuk pertumbuhan dan perkembangan endomikoriza (*Gigaspora* sp. dan *Acaulospora* sp.)**

*Hairy root culture in vitro and the application of dual culture for growth and development of endomycorrhiza (Gigaspora sp. and Acaulospora sp.)*

Nurita TORUAN-MATHIUS<sup>1)</sup>, SITI-CHALIMAH<sup>2)</sup>, MUHADIONO<sup>3)</sup>,  
Latifah AZNAM<sup>3)</sup> & Said HARAN<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> SEAMEO BIOTROP, Bogor, Indonesia

<sup>2)</sup> Fakultas MIPA, Jurusan Biologi. Universitas PGRI, Tuban, Jawa Timur, Indonesia

<sup>3)</sup> Fakultas MIPA, Jurusan Biologi, Institut Pertanian Bogor, Bogor, Indonesia

### **Summary**

Arbuscular mycorrhizal (AM) fungi are ecologically important for most vascular plants for their growth and survival. AM fungi are obligate symbions, and conventionally propagated by pot culture with a certain host plants. This paper describes the establishment of monoxenic cultures of *Gigaspora* sp. and *Acaulospora* sp. in association with excised Ri T-DNA transformed carrot roots and tomato in vitro plants. Spores of *Gigaspora* sp. and *Acaulospora* sp. was cultured in monoxenic tomato, carrot and hairy root of carrot in vitro cultures. The objectives of these studies were to obtain dual culture (axenic and hairy root) for germination, sporulation, and infection of *Gigaspora* sp. and *Acaulospora* sp. The research consisted of (i) host plant selection with high compatibility for hairy root formation, (ii) media selection for potato and carrot hairy root culture, (iii) hairy root of Granola potato and carrot in dual culture, and (iv) germination, sporulation, and infection of *Gigaspora* sp. and *Acaulospora* sp. in vitro culture. The results showed that hairy roots induction were obtained from Granola, Atlantik potato and carrot in MS, B5 and White media. Granola, Atlantik potato and carrot hairy root grow well in MS and White medium, respectively. In dual culture media (MM media) hairy root of carrot grow well, but

*hairy root of Granola potato were inhibited. Germination, sporulation of Gigaspora sp. and Acaulospora sp. and root infection by both CMA could be maintained in dual culture with host carrot, tomato plants and carrot hairy root culture in MM media.*

[Key words: Arbuscular-mycorrhizal fungi, in-vitro culture, hairy root, *Gigaspora* sp., *Acaulospora* sp., dual culture].

### **Ringkasan**

Cendawan Arbuskular Mikoriza (CMA) secara ekologi berperan penting untuk kelangsungan hidup tanaman. CMA adalah simbiosis obligat, dan secara konvensional diperbanyak dengan kultur pot menggunakan tanaman inang tertentu. Tulisan ini menjelaskan kultur monoksenik *Gigaspora* sp. dan *Acaulospora* sp. berasosiasi dengan kultur akar rambut tanaman wortel dan tomat yang diinokulasi dengan Ri T-DNA. Spora dari *Gigaspora* sp. dan *Acaulospora* sp. dikulturkan secara monoksenik *in vitro* dengan tanaman tomat, wortel dan kultur akar rambut wortel. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan kultur ganda (aksenik dan akar rambut) untuk perkecambahan, sporulasi, dan infeksi *Gigaspora* sp. dan *Acaulospora* sp.

Penelitian terdiri atas (i) seleksi tanaman inang dengan tingkat kompatibilitas tinggi untuk pembentukan akar rambut, (ii) seleksi medium untuk kultur akar rambut wortel, (iii) akar rambut kentang Granola dan kultur ganda wortel, dan (iv) perkecambahan, sporulasi, serta infeksi *Gigaspora* sp. dan *Acaulospora* sp. dalam kultur *in vitro*. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa induksi kultur akar rambut diperoleh dari kentang Granola, Atlantik dan wortel dalam medium MS, B5 dan White. Akar rambut kentang Granola, Atlantik dan wortel tumbuh baik dalam medium MS dan White. Akar rambut kentang dapat tumbuh baik dalam medium kultur ganda, yaitu medium MM. Sebaliknya pertumbuhan kultur akar rambut kentang dalam medium yang sama mengalami hambatan. Perkecambahan, sporulasi *Gigaspora* sp. maupun *Acaulospora* sp. serta infeksi akar oleh kedua jenis CMA dapat dilakukan dalam kultur ganda dengan tanaman inang wortel, tanaman kentang serta dengan kultur akar rambut wortel dalam medium MM.

### Pendahuluan

Cendawan mikoriza arbuskular (CMA) adalah mikroorganisme yang bersifat simbiosis obligat, karena tanpa tanaman inang (asimbiotik) pertumbuhan hifanya sangat sedikit dan hanya mampu bertahan hidup 20-30 hari. CMA juga bersifat simbiosis mutualistik terhadap inangnya. CMA berperan penting dalam siklus hara, yang berperan dalam memperbaiki struktur tanah dan menyalurkan unsur karbon dari akar ke organisme tanah lainnya. Di samping itu CMA mampu mengeluarkan enzim fosfatase dan asam organik. Pada tanah yang kahat fosfat (P) CMA dapat melepas P yang terikat sehingga membantu penyediaan unsur P (Smith *et al.*, 2003).

Dalam proses perkecambahan spora yang merupakan titik awal terjadinya

simbiosis mutualistik antara inang dan CMA, dimulai dengan adanya eksudat akar dan CO<sub>2</sub> yang dihasilkan tanaman inang. CMA segera berubah ke perkembangan yang baru (presimbiotik) yang ditandai dengan percabangan hifa secara intensif (Tamasloukht *et al.*, 2003). Menurut Juge *et al.* (2002) peranan inang adalah menyediakan eksudat akar untuk mempercepat pecahnya tabung perkecambahan dan sumber karbon untuk kelangsungan hidup CMA.

Perbanyakan CMA umumnya dilakukan menggunakan kultur pot mengingat sifatnya yang simbiosis obligat. Namun kelemahan cara ini adalah kurang efektif karena spora yang dihasilkan tidak steril, dan besar kemungkinan terjadi kontaminasi dengan jamur hiperparasitik, atau bakteri yang berasosiasi dengan dinding spora yang sangat sukar disterilkan. Kesulitan yang dihadapi dalam mempelajari simbiosis obligat dan tujuan praktis untuk memproduksi inokulum CMA secara massal, telah memberikan motivasi yang sangat kuat untuk mengkulturkan CMA secara aksenik.

Kultur *in vitro* CMA untuk pertama kali berhasil dilakukan pada tahun 1960-an (Mosse, 1962). Sejak itu keberhasilan kultur aksenik atau monoksenik CMA menggunakan berbagai sumber inokulum dilaporkan. Kemajuan dalam pemahaman biologi dari CMA sangat terbatas pada beberapa spesies yang dapat diperbanyak dan dipelajari secara *in vitro*. Sistem untuk mengkulturkan potongan akar dari berbagai spesies tanaman inang dan berbagai formulasi medium sudah dikembangkan untuk mengkulturkan CMA secara aksenik. Namun kurang dari 5% spesies CMA di antaranya *Gigaspora margarita* (Becard & Fortin, 1988), *Glomus fasciculatum* (Declerck *et al.*, 1998), *G. intraradices*

(St-Arnaud *et al.*, 1996), *G. macrocarpum* (Declerck *et al.*, 1998) dan *G. versiforme* yang telah berhasil ditumbuhkan dan bersporulasi dalam asosiasi dengan kultur hairy root (akar rambut) tomat dan wortel. Pembentukan jaringan hifa dengan akar, dan appresoria pada permukaan akar juga dilaporkan untuk spora *Glomus etunicatum* yang berkecambah dekat dengan akar rambut wortel (Schreiner & Koide, 1993). Pawlowska *et al.* (1999) telah berhasil memperbanyak secara *in vitro* *Glomus etunicatum* menggunakan spora istirahat yang dikulturkan dengan koloni potongan akar dalam medium White yang dimodifikasi.

*Gigaspora* sp. adalah salah satu CMA yang telah berhasil dikembangkan melalui kultur *in vitro*, efisien terhadap pertumbuhan tanaman perkebunan, diantaranya tanaman kelapa sawit (Widiastuti, 2004), kakao, jambu mete (Trisilawati, 2001). Sedang *Acaulospora* sp. sejauh ini merupakan salah satu CMA yang belum berhasil dikembangkan secara *in vitro*. Pada kenyataannya *Acaulospora* sp. mampu meningkatkan pertumbuhan tanaman kelapa sawit (Widiastuti, 2004), tanaman manggis (Lucia, 2005). Schulz *et al.* (1999) menyatakan bahwa *Acaulospora* sp adalah CMA yang cocok dan efektif meningkatkan daya hidup planlet kelapa sawit dari 40% (tidak diinokulasi) menjadi 91% (diinokulasi). Upaya untuk pengembangan kedua CMA tersebut masih mengalami kendala khususnya untuk perbanyakannya secara masal yang masih menggunakan teknik kultur pot.

Tujuan penelitian adalah untuk mendapatkan (i) tanaman inang yang mampu membentuk akar rambut, (ii) medium terbaik untuk pertumbuhan akar rambut kentang dan wortel, (iii) medium kultur ganda terbaik untuk pertumbuhan akar

rambut kentang jenis Granola dan wortel, dan (iv) perkecambahan, sporulasi dan infeksi *Gigaspora* sp. dan *Acaulospora* sp. dalam kultur *in vitro*.

### **Bahan dan Metode**

Penelitian ini terdiri dari beberapa percobaan, yaitu (i) seleksi tanaman inang yang mampu membentuk akar rambut, (ii) seleksi medium pertumbuhan akar rambut kentang dan wortel, (iii) pertumbuhan akar rambut dan kentang jenis Granola dan Wortel pada medium kultur ganda, dan (iv) perkecambahan, sporulasi dan infeksi *Gigaspora* sp. dan *Acaulospora* sp. dalam kultur *in vitro*.

#### *(i) Seleksi tanaman inang yang mampu membentuk akar rambut*

Bahan tanaman yang digunakan adalah jagung, sorgum, kentang Granola dan Atlantik serta wortel. Benih jagung, sorghum dan wortel disterilkan dengan alkohol 70% dan bayclean 30%, masing-masing selama 15 menit kemudian dicuci dengan akuades steril. Benih dikecambahkan di dalam cawan Petri berisi kertas saring yang dilembabkan, sampai berumur dua minggu. Selanjutnya sebanyak lima kecambah dari masing-masing tanaman dikulturkan dalam botol berisi medium Murashige & Skoog (1962) tanpa zat pengatur tumbuh ( $MS_0$ ). Kultur diinkubasi dalam ruang bercahaya 12 jam/hari dengan Rh 80-90%. Bahan tanam kentang Granola dan Atlantik yang digunakan berupa planlet berumur 1-2 bulan berasal dari Lab. Kultur Jaringan Jurusan. Agronomi IPB. Secara rutin kultur diremajakan melalui penggandaan tunas aksiler dalam medium MS dengan penambahan 0,1 mg/L kinetin.

Inokulasi dilakukan menurut metode Toruan-Mathius *et al.* (2004). Sebelum diinokulasikan pada potongan tanaman uji, *Agrobacterium rhizogenes* galur LBA 9457 dikulturkan dalam medium suspensi YMB dan dikocok dengan mesin pengocok pada kecepatan 100 rpm (12 jam/hari). Kultur ditempatkan dalam ruang kultur bercahaya 12 jam/hari dengan Rh 80-90%. Kultur berumur 48 jam siap digunakan untuk inokulasi. Inokulasi *A. rhizogenes* terhadap tanaman uji dilakukan dengan cara melukai potongan batang tanaman dan eksplan dengan pisau bedah steril, kemudian dipotong-potong sepanjang 2 cm dan dikokultivasi selama satu jam dalam suspensi bakteri. Setelah dikeringkan di atas kertas saring steril, sebanyak lima potong dari masing-masing tanaman dikulturkan dalam medium MS, B5 Gamborg, dan White, dengan penambahan 100 mg/L ampisilin. Respons tanaman terhadap *A. rhizogenes* ditentukan berdasarkan terbentuk tidaknya akar rambut.

(ii) *Seleksi medium pertumbuhan akar rambut kentang dan wortel*

Untuk pertumbuhan akar rambut yang lebih baik dari percobaan (i), sepanjang 2 cm potongan ujung akar rambut kentang Granola, kentang Atlantik dan wortel dikulturkan dalam medium MS. Pengaruh medium dan jenis tanaman terhadap pertumbuhan akar rambut diamati berdasarkan berat kering akar rambut pada 0, 3, dan 6 minggu setelah dikulturkan, serta penampakan akar rambut.

(iii) *Pertumbuhan akar rambut kentang Granola dan wortel pada medium kultur ganda*

Bahan tanam yang digunakan adalah akar rambut yang pertumbuhannya terbaik

dari percobaan (ii). Potongan ujung akar rambut sepanjang 2 cm dikulturkan dalam medium White (Minimal medium, MM) (Beard & Fortin, 1988) dan medium Strullu dan Romand (MSR medium) (Strullu & Romand 1986). Akar rambut yang dihasilkan selanjutnya digunakan untuk mengkulturkan *Gigaspora* sp. dan *Acaulospora* sp. Pertumbuhan akar rambut dari kedua tanaman uji ditentukan berdasarkan berat kering akar rambut pada umur 0, 3, dan 6 minggu setelah dikulturkan.

(iv) *Perkecambahan, sporulasi dan infeksi Gigaspora sp. dan Acaulospora sp. dalam kultur in vitro*

Untuk perkecambahan, sporulasi serta infeksi *Gigaspora* sp. dan *Acaulospora* sp. dalam kultur *in vitro* digunakan tanaman inang berupa kecambah tanaman wortel, tomat dan akar rambut yang pertumbuhannya terbaik dalam kultur ganda. Kecambah wortel dan tomat ditumbuhkan dalam medium MS, dan setelah berumur empat minggu dipindahkan ke dalam medium kultur ganda, yaitu MM dan MSR. Satu potong akar rambut wortel sepanjang 7 cm dikulturkan dalam cawan Petri yang berisi medium yang sama untuk kecambah wortel dan tomat.

Spora dari *Gigaspora* sp. dan *Acaulospora* sp. yang sudah disterilkan menurut Buce *et al.* (2000), diinokulasikan dengan cara memipet masing-masing sebanyak 10  $\mu$ L yang berisi 10-15 butir spora, dan menyemprotkannya secara perlahan-lahan dekat ujung akar baik pada kecambah wortel dan tomat (umur empat minggu) serta akar rambut wortel (umur satu minggu). Kultur tanaman wortel dan tomat diinkubasi dalam ruang kultur bercahaya 12 jam/hari dan Rh 80-90%,

sedangkan kultur akar rambut wortel diinkubasikan dalam ruang gelap. Peubah yang diamati adalah persentase spora yang berkecambah, jumlah spora yang dibentuk (sporulasi) dan infeksi akar, yang diamati tiga bulan setelah diinokulasi. Perkembangan infeksi akar dipelajari dengan membuat histologi akar.

Rancangan percobaan yang digunakan untuk percobaan (i), (ii) dan (iii) adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Untuk percobaan (i) RAL faktorial 3x3, sebagai faktor pertama adalah jenis tanaman (kentang Granola, kentang Atlantik dan wortel). Sebagai faktor kedua adalah jenis medium (MS, B5 dan White). Untuk percobaan (ii) RAL satu faktor yaitu jenis tanaman asal akar rambut (kentang Granola, kentang Atlantik dan wortel), serta satu jenis medium (MM). Untuk percobaan (iii) RAL faktorial 2x2x3. faktor pertama adalah jenis medium (MM dan MSR), faktor kedua adalah jenis inokulum, yaitu *Gigaspora* sp. dan *Acaulospora* sp., dan jenis inang (kecambah wortel, tomat dan akar rambut wortel).

Data hasil penelitian dari masing-masing percobaan yang diperoleh dianalisis dengan analisis varians, sedang kesimpulan diambil berdasarkan uji F (*Fisher test*). Apabila hasil uji F tersebut menunjukkan beda nyata atau beda sangat nyata antar perlakuan, maka pengujian dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan (DMRT) dengan tingkat kepercayaan 95% ( $P < 0,05$ ).

### **Hasil dan Pembahasan**

#### **(i) Seleksi tanaman inang yang mampu membentuk akar rambut**

Kelima jenis eksplan menunjukkan respons yang berbeda terhadap inokulasi

*A. rhizogenes*. Tidak terjadi induksi pembentukan akar rambut pada kecambah jagung dan sorghum pada ketiga jenis medium yang diuji. Sebaliknya pada eksplan kentang Granola, kentang Atlantik dan wortel terjadi induksi pembentukan akar rambut terjadi pada ketiga medium yang diuji. (Tabel 1). Induksi pembentukan akar rambut tumbuh terjadi pada bagian yang dilukai tanpa didahului pembentukan kalus.

Pada eksplan jagung dan sorgum tidak terjadi induksi pembentukan akar rambut. Hal ini kemungkinan disebabkan kedua tanaman tersebut tergolong dalam Monokotiledon, yang apabila jaringannya dilukai tidak mengeluarkan senyawa polifenol. Sebaliknya pada kentang Granola, kentang Atlantik dan wortel yang tergolong dalam dikotiledon memiliki kemampuan untuk memproduksi senyawa fenolik pada saat terjadi pelukaan. Menurut Douglas *et al.* (1985) apabila jaringan tanaman dilukai secara alami akan mengeluarkan senyawa di antaranya asam amino, gula, dan senyawa fenolik. Christey & Braun (2004) menjelaskan bahwa pelepasan senyawa kimia tersebut dari jaringan tanaman yang terluka terjadi secara kemotaksis yang akan memberikan sinyal terhadap gen virulen *A. rhizogenes* dan terjadilah langkah awal dari infeksi. Menurut Christey & Braun (2004) dan Sheng & Citovsky (1996) *A. rhizogenes* memiliki gen virulen yang tersusun dalam lokus utama, yaitu *vir A*, *vir B*, *vir C*, *vir D*, *vir E*, *vir G* dan *vir H*. *Agrobacterium* merupakan bakteri tanah gram-negatif yang termasuk dalam kelompok *Rhizobiaceae*, dan mempunyai kemampuan untuk mentransfer sebagian bahan genetiknya (DNA) pada sel tanaman melalui pelukaan. DNA yang ditransfer disebut dengan T-DNA, merupakan potongan

Tabel 1. Respons eksplan sorgum, jagung, kentang Granola, kentang Atlantik dan wortel terhadap *A. rhizogenes* galur LBA 9457, yang dikulturkan dalam medium MS, B5 dan White

Table 1. Respons of sorghum, Granola and Atlantik potato and carrot explants on *A. rhizogenes* var. LBA 9457, cultured in MS, B5 and White media.

Bahan tanam <i>Plant materials</i>	Medium <i>Media</i>		
	MS	B5	White
Sorgum ( <i>Sorghum</i> )	-*)	-	-
Jagung ( <i>Corn</i> )	-	-	-
Kentang Granola <i>Granola potato</i>	+	+	+
Kentang Atlantik <i>Atlantik potato</i>	+	+	+
Wortel ( <i>Carrot</i> )	+	+	+

Keterangan \*): - Tidak terjadi pembentukan akar rambut (*No formation of hairy root*)

Explanation : + Terjadi pembentukan akar rambut (*The formation of hairy root happened*)

beberapa ratus kilo basa dari plasmid yang dikenal dengan Ri plasmid (*root inducing plasmid*) (Nillson & Olsson 1997). T-DNA akan terintegrasi pada kromosom tanaman dan akan meng-ekspresikan gen-gen untuk mensintesis senyawa opin, di samping itu T-DNA juga mengandung onkogen yaitu gen-gen yang berperan untuk menyandi hormon pertumbuhan auksin dan sitokinin. Apabila onkogen tereksresi maka akan terjadi pertumbuhan cepat dari sel. Ekspresi onkogen pada plasmid Ri mencirikan pembentukan akar adventif secara besar-besaran pada tempat yang diinfeksi dan dikenal dengan 'hairy root' atau akar rambut.

(ii) *Seleksi medium pertumbuhan akar rambut kentang dan wortel*

Berdasarkan bobot kering akar rambut diperoleh adanya interaksi antara jenis medium dan jenis eksplan terhadap berat kering akar rambut. Berat kering akar rambut tertinggi diperoleh dari tanaman wortel yang dikulturkan dalam medium White. Sedang untuk kentang pertumbuhan akar rambut terbaik diperoleh dari kentang Granola yang ditumbuhkan dalam medium MS (Tabel 2). Tampak bahwa akar rambut kentang tumbuh baik pada medium MS yang memiliki komposisi nutrisi hara yang lebih lengkap dibandingkan dengan medium B5 dan medium White. Sebaliknya, akar rambut wortel tumbuh lebih baik dalam medium White dengan komposisi nutrisi hara yang lebih sederhana khususnya untuk hara makro.

Christey & Braun (2004) melaporkan bahwa wortel adalah salah satu spesies yang rentan untuk memproduksi akar rambut. Ridgway *et al.* (2004) menemukan bahwa potongan akar rambut wortel yang diinokulasi dengan *A. rhizogenes* A4T dapat tumbuh baik dalam medium Lauria-Bertoni (+/- asetosiringon) atau dalam medium Yeast Mannitol.

Untuk pengujian lebih lanjut antara akar rambut dari kedua jenis kentang yang diuji, akar rambut dari kentang Granola dan kentang Atlantik disubkultur ke dalam medium MS. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa pertumbuhan akar rambut kentang Granola lebih baik dibandingkan dengan pertumbuhan akar rambut kentang Atlantik (Gambar 1). Berdasarkan hasil tersebut maka untuk percobaan kultur ganda digunakan akar rambut kentang Granola dan wortel.

*Kultur akar rambut in vitro serta pemanfaatan kultur ganda...*

Tabel 2. Berat kering akar rambut kentang Granola, kentang Atlantik, dan wortel yang dikulturkan dalam medium B5, MS, dan White umur enam minggu setelah dikulturkan.

Table 2. Dry weight hairy roots of Granola and Atlantik potato, and carrot cultured in B5, MS, and White media six-week-old after cultured.

Medium Media	Kentang Atlantik Atlantik potato	Kentang Granola Granola potato	Wortel Carrot
	mg		
B5	5,80 e*)	8,44 d	5,26 f
MS	8,86 c	13,94 b	3,40 h
White	4,66 g	4,50 g	36,02 a

Keterangan\*): Huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT ( $P < 0,05$ ).

Explanation \*): The same letters in the same coloumn are not significantly different base on DMRT ( $P < 0.05$ ).

(iii) *Pertumbuhan akar rambut kentang Granola dan wortel pada medium kultur ganda*

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa dalam medium kultur ganda MM pertumbuhan akar rambut kentang Granola mengalami hambatan, sedang pertumbuhan akar rambut wortel tidak mengalami hambatan (Gambar 1). Medium kultur ganda MM memiliki komposisi dengan konsentrasi hara P sangat rendah, yaitu 4,4 mg/L sedang medium MS 4170mg/L. Tampaknya komposisi medium asal dari akar rambut mempengaruhi keberhasilan akar rambut untuk beradaptasi di dalam medium kultur ganda. Pawlowska *et al.* (1999) melaporkan bahwa akar rambut wortel tumbuh baik dalam medium White yang ditambah bufer 10 mM MES (pH 6,0) atau MOPSO (pH 6,5).

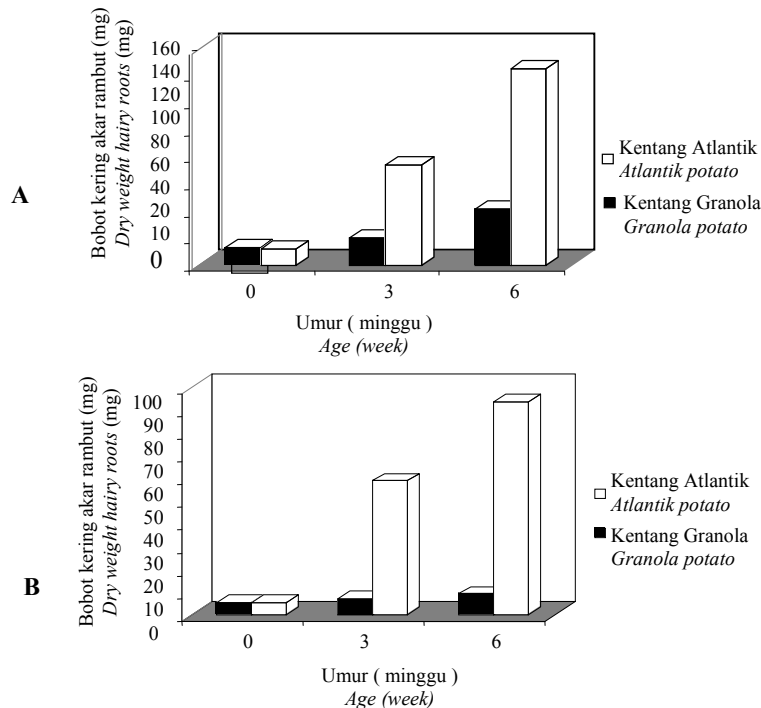
(iv) *Perkecambahan, sporulasi dan infeksi Gigaspora sp. dan Acaulospora sp. dalam kultur in vitro.*

Hasil yang diperoleh menunjukkan adanya interaksi yang nyata antar inang, jenis medium dan jenis CMA terhadap

jumlah spora yang berkecambah, sporulasi, dan infeksi akar oleh kedua CMA tersebut (Tabel 3, 4 & 5). Tampak bahwa medium MM adalah yang terbaik untuk kultur ganda ketiga inang yang diuji baik untuk perkecambahan, sporulasi dan daya infeksi *Gigaspora* sp. maupun *Acaulospora* sp. dibandingkan dengan kultur ganda dalam medium MSR.

Kultur ganda antara *Gigaspora* sp. dengan inang tanaman wortel, tomat, dan akar rambut tomat memberikan perkecambahan spora dan sporulasi yang sama baiknya. Sedang untuk infeksi akar terbanyak diperoleh dalam kultur ganda dengan inang tanaman wortel dan tomat. Ketiga inang yang diuji memberikan perkecambahan spora *Acaulospora* sp. yang sama baiknya. Namun untuk sporulasi dan banyaknya infeksi akar yang terjadi diperoleh dalam kultur ganda menggunakan inang tanaman wortel.

Perkecambahan *Gigaspora* sp. mulai terlihat 15 - 20 hari setelah inokulasi, sedang untuk *Acaulospora* sp. terjadi lebih lambat yaitu 30 - 50 hari setelah inokulasi. Perkecambahan selalu terjadi melalui pembentukan hifa-hifa seperti benang ang tumbuh ke segala arah (Gambar 2a & b),



Gambar 1. Pertumbuhan akar rambut dalam medium MS (A) dan MM (B) umur 0, 3 dan 6 minggu setelah tanam.

Figure 1. The growth of hairy root in MS (A) and MM (B) media 0, 3, and 6 weeks after cultured.

Perkembangan selanjutnya terbentuk hifa eksternal dan melakukan infeksi akar (Gambar 2c dan d). Setelah tiga bulan kemudian tampak bahwa hifa mengalami proliferasi sangat cepat dan pada lapisan epidermis tanaman inang membentuk apresoria, hifa internal (Gambar 2g), arbuskula (Gambar 2h), hifa koil dan vesikula (Gambar 2i).

Pada medium MM dengan akar rambut wortel, waktu perkecambahan terjadi hampir sama dengan kultur akar aksenik. Lebih dari 70% spora berkecambah (Tabel 3). *Gigaspora* sp. dan *Acaulospora* sp. membentuk koloni di dekat ujung akar rambut. Setiap koloni fungi tersebut selalu diawali dengan beberapa percabangan dari satu hifa yang akan berproliferasi dekat dengan akar. Penetrasi hifa ke dalam

jaringan epidermal dan sel kortikal segera terjadi melalui titik infeksi yang berbentuk spiral. Arbuskular dibentuk dalam lapisan yang lebih dalam dari kortikal sel dan akhirnya terjadi percabangan (Gambar 2d).

Kolonisasi akar selanjutnya diikuti dengan pembentukan spora baru atau sporulasi. Sporulasi sangat jelas terlihat berdasarkan penampakan pada beberapa bagian akar tanaman inang wortel dan tomat maupun akar rambut yang pecah atau terbelah, dan tampak beberapa spora ekstraradikal (Gambar 2e & f). Jumlah sporulasi yang diperoleh dalam waktu tiga bulan setelah inokulasi relatif rendah. Tampaknya sporulasi dalam kultur *in vitro* khususnya menggunakan akar rambut memerlukan waktu inkubasi yang relatif



*Kultur akar rambut in vitro serta pemanfaatan kultur ganda...*

Tabel 3. Pengaruh inang tanaman wortel, tomat, dan akar rambut wortel yang dikulturkan dalam medium MM dan MSR terhadap jumlah spora *Gigaspora* sp. dan *Acaulospora* sp. yang berkecambah, tiga bulan setelah diinokulasi.

Table 3. Effect of carrot, tomato, and carrot hairy root as a host cultured in MM and MSR media on the number of spores germinated of *Gigaspora* sp. and *Acaulospora* sp., three month after inoculation.

Medium kultur ganda Dual culture media	<i>Gigaspora</i> sp.			<i>Acaulospora</i> sp.		
	Wortel Carrot	Tomat Tomato	Akar rambut Hairy root	Wortel Carrot	Tomat Tomato	Akar rambut Hairy root
MM	78,7 a	54,4b	70,7a	76,5a	67,6a	73,7 a
MSR	24,0de	12,0f	30,8cd	19,3ef	10,3f	41,3c

Keterangan : Huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT ( $P < 0,05$ )

Explanation: The same letters in the same coloumn are not significantly different base on DMRT ( $P < 0.05$ )

Tabel 4. Pengaruh inang tanaman wortel, tomat, dan akar rambut wortel yang dikulturkan dalam medium MM dan MSR terhadap sporulasi *Gigaspora* sp. dan *Acaulospora* sp., tiga bulan setelah diinokulasi.

Table 4. Effect of carrot, tomato and carrot hairy root as a host, cultured in MM and MSR media on the number of sporulation of *Gigaspora* sp. and *Acaulospora* sp., three months after inoculation.

Medium kultur ganda Dual culture media	<i>Gigaspora</i> sp.			<i>Acaulospora</i> sp.		
	Wortel Carrot	Tomat Tomato	Akar rambut Hairy root	Wortel Carrot	Tomat Tomato	Akar rambut Hairy root
MM	3,6c	3,6c	3,6c	12,00a	9,0b	10,2b
MSR	1,4 d	1,4d	2,0cd	2,0cd	1,8cd	1,4d

Keterangan: Huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT ( $P < 0,05$ )

Explanation: The same letters in the same coloumn are not significantly different base on DMRT ( $P < 0.05$ )

Tabel 5. Pengaruh inang tanaman wortel, tomat, dan akar rambut wortel yang dikulturkan dalam medium MM dan MSR terhadap infeksi akar oleh *Gigaspora* sp. dan *Acaulospora* sp., tiga bulan setelah diinokulasi.

Table 5. Effect of carrot, tomato and carrot hairy root as a host cultured in MM and MSR media on roots infection of *Gigaspora* sp. and *Acaulospora* sp., three months after inoculation.

Medium Media	<i>Gigaspora</i> sp.			<i>Acaulospora</i> sp.		
	Wortel Carrot	Tomat Tomato	Akar rambut Hairy root	Wortel Carrot	Tomat Tomato	Akar rambut Hairy root
Kultur ganda Dual culture	60,2b	60,8b	56,2b	72,0a	58,0b	57,8b
SR	30,0c	15,8d	13,00d	31,00c	30,2c	34,6c

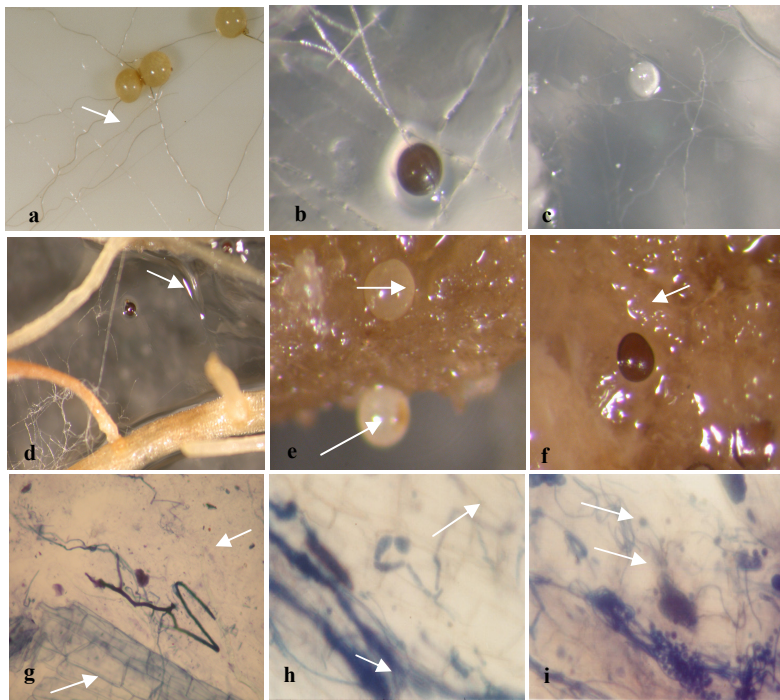
Keterangan: Huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT ( $P < 0,05$ )

Explanation : The same letters in the same coloumn are not significantly different base on DMRT ( $P < 0.05$ )

lebih lama. Menurut Diop *et al.* (1992) simbiosis *Gigaspora margarita* yang diinokulasikan pada akar rambut tanaman wortel, sporulasi terjadi empat bulan setelah diinokulasi dan berlangsung relatif lambat. Sporulasi lebih aktif dimulai 6-12 bulan setelah inokulasi. Perkembangan spora *Gigaspora* sp. dimulai dengan penebalan dinding spora, yang diikuti dengan peningkatan pigmentasi dinding spora sebelah dalam. Spora yang masih muda ditandai dengan warna putih susu sampai bening, sedang sitoplasma penuh dengan struktur granular. Isi spora akan

berubah menjadi lebih pekat diikuti dengan pigmentasi dinding sel sebelah dalam yang berlangsung sangat cepat, hal ini menyebabkan spora yang sudah tua sangat mudah dilihat. Spora *Acaulospora* sp. yang masih muda berwarna cokelat muda, dan dengan perkembangan lebih lanjut terjadi pigmentasi yang sangat aktif di dalam spora, menyebabkan warna spora berubah menjadi cokelat tua (Gambar 2a s/d i).

Medium MM lebih sesuai untuk perkecambahan, sporulasi, dan infeksi akar tanaman inang oleh CMA yang diuji, hal



Gambar 2. Perkembangan dan perubahan struktur *Gigaspora* sp. dan *Acaulospora* sp. dalam akar inang umur tiga bulan setelah tanam; (a). *Gigaspora* sp. yang berkecambah; (b). *Acaulospora* sp. yang berkecambah; (c). hifa eksternal *Gigaspora* sp.; (d). hifa eksternal *Acaulospora* sp.; (e). sporulasi dari *Gigaspora* sp.; (f). sporulasi *Acaulospora* sp.; (g). hifa internal dan sekunder; (h). hifa koil vesikula dan (i). hifa koil arbuskula.

Figure 2. The development and the changes of *Gigaspora* sp. and *Acaulospora* sp. structures in hosts plant, three month old after cultured; (a). germination of *Gigaspora* sp.; (b). germination of *Acaulospora* sp.; (c). external hypha of *Gigaspora* sp.; (d). external hypha of *Acaulospora* sp.; (e). sporulation of *Gigaspora* sp.; (f). sporulation of *Acaulospora* sp.; (g). external and secondary hypha; (h). hypha coil vesicular hypha, and (i). hypha coil arbuscular.

hal ini disebabkan kandungan fosfatnya lebih rendah (4,4 mg/L) dibandingkan dengan medium MSR yang kandungan fosfatnya sebanyak 68 mg/L. Labor *et al.* (2003) menyatakan bahwa konsentrasi fosfat yang tinggi dalam medium dapat menghambat proses sporulasi dan kolonisasi akar oleh CMA. Konsentrasi P yang rendah, merangsang pembentukan eksudat akar lebih banyak.

Menurut Tamasloukht *et al.* (2003) simbiosis antara CMA dengan akar tanaman inang dimulai setelah spora berkecambah yang ditandai dengan percabangan hifa yang aktif dan pembentukan hifa eksternal. Setelah melakukan kontak dengan akar, akan membentuk appresorium, dan membentuk hifa internal, hifa interseluler, arbuskula dan vesikula untuk *Acaulospora* sp., sedang *Gigaspora* sp. tidak membentuk vesikula. Akar yang terinfeksi selanjutnya dapat membentuk spora baru (sporulasi). Jadi akar yang terinfeksi dengan pewarnaan triplan biru akan terlihat hifa eksternal, apresorium, hifa internal, arbuskula, vesikula dan kadang-kadang adanya spora baru. Hal tersebut juga dinyatakan oleh Jane *et al.* (1998) bahwa spora yang berkecambah akan melakukan kontak dengan akar membentuk apresorium dan berkembang membentuk hifa internal, hifa intrasel, arbuskula, vesikula dan hifa koil.

### Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa:

1. Eksplan tanaman wortel, kentang Granola dan kentang Atlantik mampu membentuk akar rambut setelah diinokulasi dengan *A. rhizogenes* galur LBA 9475, yang dikulturkan dalam medium MS, B5 dan White.
2. Medium MS adalah yang terbaik untuk pertumbuhan akar rambut kentang Granola dan kentang Atlantik, sedang medium White baik untuk pertumbuhan akar rambut wortel.

3. Dalam medium MM yang digunakan untuk kultur ganda, akar rambut wortel dapat berkembang dengan baik, sedang pertumbuhan akar rambut kentang Granola mengalami hambatan.
4. Kultur ganda antara akar rambut dan CMA menggunakan medium MM dapat dimanfaatkan untuk perkecambahan, sporulasi dan infeksi *Gigaspora* sp. maupun *Acaulospora* sp. secara *in vitro*

### Daftar Pustaka

- Buce, M., M. Rossignol, A. Jauneau, R. Ranjeva & G. Becard (2000). The presymbiotic growth of arbuscula mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified plant root exudates. *Mol. Plant.*, **13**, 693 -698.
- Bécard, G., & J.A. Fortin (1988). Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol.*, **108**,211-218.
- Christey, M.C. & R.H. Braun (2004). Production of hairy root and transgenic plants by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation. In Pena, L (ed) *Methods in Molecular Biology*. Vol. 268, Transgenic Plants. p.47-60.
- Declerck, S.D., G. Strullu & C. Plenchette (1998). Monoxenic culture of the intraradical forms of *Glomus* sp. Isolated from a tropical ecosystem: a proposed methodology for germplasm collection. *Mycologia*, **90**, 579-585.
- Diop, T.A., G. Becard & Y. Piche (1992). Long term *in vitro* culture of an endomycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*, on Ri-TDNA transformed root of carrot. *University Laval. Balapan, Philadelphia*, p 249 – 259.
- Douglas, C.J., R.J. Stanlioni R.J., R.A. Rubin & E.W. Nester (1985). Identification and genetic analysis of an *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence region. *J. Bacteriol.*, **161**,850-860.

- Jane, B.S. & T.D.G. Delp (1998). Regulation of root and fungal morphogenesis in *Mycorrhizal Symbioses*, **116**,1201-1207.
- Juge, C., J. Samson, C. Bestien, H.Vierheilig, A. Coughlan & Y. Piche (2002). Breaking dormancy in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*: a critical cold-storage period. *Mycorrhiza*, **12**, 37-42.
- Labour, K., Mario Jolicea, S.T. Marc & Arnaud (2003). Arbuscular mycorrhizae responsiveness of *in vitro* tomato root lines is not related to growth and nutrient uptake. *Plant Physiol.*, **124**,943-953.
- Lucia, Y. (2005). Cendawan mikoriza arbuskula di bawah tegakan tanaman manggis dan peranannya dalam pertumbuhan bibit manggis (*Garcinia mangostana*), Tesis. Bogor, Sekolah Pascasarjana IPB.
- Mosse, B. (1962). The establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza under aseptic conditions. *J. Gen. Microbiol.*, **27**,500-520.
- Nillson, O. & O.Olsson (1997). Getting to the root : The role of the *Agrobacterium rhizogenes rol* genes in the formation of hairy roots. *Physiol Plant.*, **100**, 463-473.
- Pawloska, T. E., D. D. Douds Jr & I. Charvat (1999). *In vitro* propagation and life cycle of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus etunicatum*. *Mycol. Res.*, **103** (12), 1549-1556.
- Ridgway, H.J., J. Kandula & A. Stewart (2004). Optimising production of carrot hairy roots. In 57<sup>th</sup> Conf. Proc. The New Zealand Plant Protection Soc. Inc. p.77-80.
- Strullu, D.G. & C. Romand (1986). Methode axenique de vesicules a partir d'endomycorrhizae et re-association in vitro a' des racines de Tomate. C.R. *Acad Sci. Paris*, **303**, 245-250.
- Schreiner, R. P. & R.T. Koide (1993). Stimulation of vesicular-arbuscular fungi by mycotrophic and non mycotrophic plant root system. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**,2750-2752.
- Schultz, C., Subronto, Sjafrul Latif, A.M. Moawad & P.L.G. Vlek (1999). Peranan mikoriza vesikuler-arbuskuler (MVA) dalam meningkatkan penyesuaian diri plantlet kelapa sawit terhadap kondisi lingkungan tumbuh alami. *Jurnal Penelitian Kelapa Sawit*, **7**(3),145-156.
- Sheng, J. & V. Citovsky (1996). *Agrobacterium* plant cell DNA transport : have virulence proteins, will travel. *Plant Cell*, **8**, 1699-1710.
- Smith, S.E., F.A. Smith & I. Jacobsen (2003). Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to pints irrespective of growth responses. *Plant Physiol.*, **133**,6-20.
- St-Arnaud, M., C.Hamel, B. Vimard, M. Caron & J.A. Fortin (1996). Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an *in vitro* system in absence of host roots. *Mycol Res.*, **100**, 328-332.
- Tamasloukht, M., A.N.Sejalon-Delmas, A. Kluever, J.C. Roux, G. Becard & P. Franken (2003). Root factors induce mitochondrial-related gene express fungal respiration during the developmental switch for asymbiosis to presymbiosis in the arbuscular mycorrhiza *Gigaspora rosea*. *Plant Physiol.*, **131**(3),1468-1478.
- Toruan-Mathius, N., Reflini, Nurhaimi-Haris, Joko-Santoso & A. Priangani-Roswiem (2004). Kultur akar rambut *Cinchona ledgeriana* dan *C. Succirubra* dalam kultur *in vitro*. *Menara Perkebunan*, 2004, **72**(2), 69-84.
- Trisilawati, O., T. Supriatun & I. Indrawati (2001). Pengaruh mikoriza arbuskula dan pupuk fosfat terhadap pertumbuhan jambu mete pada tanah podsolik merah kuning. *J. Biol.* **3**(2), 91-98.
- Widiastuti, H. (2004). Biologi interaksi cendawan mikoriza arbuskula kelapa sawit pada tanah masam sebagai dasar pengembangan teknologi aplikasi dini. *Desertasi* Sekolah Pascasarjana, IPB, Bogor.