Perubahan Viabilitas Pollen dan Anatomi Stomata pada Dua Mutan Tomat, *iaa9-3* dan *iaa9-5*, akibat Cekaman Suhu Tinggi

Fitrianti Widya Lestari¹, Erni Suminar², Anne Nuraini², Hiroshi Ezura³,
dan Syariful Mubarak^{2*}

¹Program Pascasarjana Agronomi Fakultas Pertanian Universitas Padjadjaran, Indonesia

²Departemen Agronomi Fakultas Pertanian Universitas Padjadjaran, Indonesia

³Faculty Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, Japan

*Alamat korespondensi: syariful.mubarak@unpad.ac.id

ABSTRACT

Changes of pollen viability and stomatal anatomy in two tomato mutant of *iaa9-3* and *iaa9-5*, as a result of heat stress

High temperature is one of the main abiotic stresses (*heat stress*) that limit the growth and development of tomato plants. *Heat stress* causes the failure of pollen development and low pollen viability. Heat stress also causes anatomic changes, including stomata on the leaves. In this study, *iaa9-3* and *iaa9-5* tomato mutants were tested, and *WT-MT* as control with two different temperature conditions. *iaa9-3* and *iaa9-5* are the mutant of tomato plant cv Micro-Tom with a genetic mutation in specific IAA9 genes, that act as a negative regulator of auxin responses. Plants were treated with a maximum temperature of 30-35 °C and 40-45 °C for 3 hours every day. The results showed that the number of viable pollen and semi-viable pollen were increased in *iaa9-3* and *iaa9-5* mutants whereas the number of dead pollen was reduced, compared to *WT-MT* when grown at 30-35 °C and 40-45 °C. The number of viable pollen and semi-viable pollen in *iaa9-3* mutants, *iaa9-5* mutants and *WT-MT* grown at 40-45 °C was less than when they were grown at 30-35 °C, while the number of dead pollen was increased. The number of leaf stomata (abaxial) at the *iaa9-5* and *iaa9-3* mutants increased compared to *WT-MT* at temperatures of 30-35 °C and 40-45 °C. The number of stomata on *iaa9-3* and *iaa9-5* mutant and *WT-MT* at a temperature of 30-35 °C was more than the number of stomata on the *iaa9-3* and *iaa9-5* mutant and *WT-MT* at a temperature of 40-45 °C. This indicated that heat stress causes the number of stomata to decrease.

Keywords: Mutation, Pollen, Stomata

ABSTRAK

Cekaman suhu tinggi merupakan salah satu cekaman abiotik utama yang membatasi pertumbuhan dan perkembangan tanaman tomat. Hal tersebut menyebabkan kegagalan perkembangan serbuk sari dan rendahnya viabilitas polen. *Heat stress* juga menyebabkan perubahan anatomi salah satunya stomata pada daun. Pada penelitian ini diuji dua tanaman tomat mutan *iaa9-3* dan *iaa9-5*, serta *WT-MT* sebagai kontrol dengan dua kondisi suhu yang berbeda. Mutan *iaa9-3* dan *iaa9-5* merupakan tanaman tomat kultivar Micro-Tom yang mengalami mutasi genetik pada gen spesifik *IAA9* yang berperan sebagai regulator respons auksin negatif. Tanaman dipaparkan pada suhu maksimum 30-35°C dan 40-45°C selama 3 jam setiap harinya. Hasilnya menunjukkan bahwa pada mutan *iaa9-3* dan *iaa9-5* jumlah polen viabel dan polen semiviabel meningkat, serta jumlah polen mati menurun dibandingkan *WT-MT* baik pada suhu 30-35°C maupun suhu 40-45°C. Perbandingan jumlah polen viabel dan polen semiviabel pada mutan *iaa9-3*, mutan *iaa9-5* dan *WT-MT* pada suhu 40-45 °C lebih sedikit dibandingkan pada suhu 30-35 °C, sedangkan jumlah polen mati lebih banyak. Mutan *iaa9-5* dan *iaa9-3* memiliki jumlah stomata daun (abaxial) yang lebih banyak dibandingkan dengan *WT-MT* baik pada suhu 30-35 °C maupun 40-45 °C. Jumlah stomata mutan *iaa9-3* dan *iaa9-5* serta *WT-MT* pada suhu 30-35 °C lebih banyak dibandingkan jumlah

stomata mutan *iaa9-3* dan *iaa9-5* serta *WT-MT* pada suhu 40-45 °C. Cekaman suhu tinggi menyebabkan penurunan jumlah stomata.

Kata kunci: mutasi, polen, stomata

PENDAHULUAN

Tomat (*Solanum lycopersicum*) merupakan komoditas hortikultura dari famili *Solanaceae* yang sangat penting dan banyak diminati masyarakat. Tomat umumnya dimanfaatkan sebagai bahan pangan sumber nutrisi dan antioksidan. Menurut Pusat Data dan Informasi Pertanian (2017) proyeksi konsumsi tomat tahun 2017 hingga 2021 diperkirakan naik dengan rata-rata pertumbuhan 5,32% per tahunnya, sedangkan produksi tomat di Indonesia pada tahun 2018 hanya mengalami peningkatan sebesar 1,45% dari tahun 2017 (BPS, 2019). Rendahnya peningkatan produksi dapat disebabkan oleh keterbatasan budidaya tomat yaitu faktor eksternal (lingkungan tumbuh) dan faktor internal (aktivitas hormon dan genetika) yang mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan tomat (Shibasaki & Rahman, 2013).

Suhu merupakan faktor eksternal yang membatasi budidaya tanaman tomat. Menurut *Intergovernmental Panel on Climatic Change* (2014) rata-rata suhu dunia meningkat 0,3°C di setiap negara akibat adanya *global warming* dan diprediksikan akan meningkat 3°C dari temperatur biasanya pada tahun 2100. Menurut Ariizumi *et al.* (2013) suhu lingkungan yang melebihi 4°C dari suhu optimal, akan menyebabkan aborsi perkembangan polen. Peningkatan suhu mempengaruhi percepatan pembungaan, terbentuknya bunga jantan yang mandul, menghambat perkembangan gamet dan embrio, serta menghambat kemampuan bunga yang diserbuki untuk berkembang menjadi buah (Solanki *et al.*, 2015). Kegagalan perkembangan polen dan rendahnya viabilitas polen merupakan penyebab utama kegagalan pembentukan buah pada tanaman tomat saat berada pada suhu tinggi (Hoshikawa, 2017). Perubahan anatomis tanaman seperti perkembangan stomata juga dipengaruhi oleh suhu tinggi. Ontogenesis stomata merupakan elemen kunci adaptasi tanaman yang bertujuan untuk mengendalikan efisiensi fotosintesis dan pengelolaan air dalam lingkungan yang berfluktuasi (Samakovli *et al.*, 2018).

Tanaman tomat mutan *iaa9-3* dan *iaa9-5* berasal dari tanaman *Wild-Type* Micro-Tom (*WT-MT*) yang dibentuk melalui mutasi dengan

mutagenesis *ethyl methyl sulfonate* (EMS) (Just *et al.*, 2013). Mutan *iaa9-3* dan *iaa9-5* mengalami mutasi genetik pada gen spesifik *IAA9* (Saito *et al.*, 2011). *IAA9* merupakan family dari gen *Aux/IAA* yang memiliki peran sebagai penekan transkripsi jalur sinyal auksin endogen yaitu *Indole Acetic Acid* (IAA) (Guilfoyle & Hagen, 2007). Proteolisis pada family gen *Aux/IAA*, akan menyebabkan ARF (*Auxin Respons Factors*) dan *IAA9* saling berikatan sehingga terjadi peningkatan respons auksin endogen (Saito *et al.*, 2011). Maka saat terjadi gangguan yang diperoleh dari mutasi pada *IAA9* akan memicu respons auksin diberbagai tempat (Wang *et al.*, 2005).

Auksin berperan dalam adaptasi tanaman terhadap cekaman suhu tinggi. Keberadaan auksin dapat menghasilkan produksi polen yang normal, dan meningkatkan viabilitas polen pada kondisi *heat stress* (Higashitani, 2013). Secara anatomis auksin yang terkandung dalam tanaman dapat mempengaruhi jumlah dan pola stomata (Le *et al.*, 2014). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui respon mutan tomat *iaa9-3* dan *iaa9-5* terhadap viabilitas polen dan anatomis stomata akibat cekaman suhu tinggi (*heat stress*).

BAHAN DAN METODE

Penanaman dilaksanakan di Lahan Percobaan Ciwidey, Kabupaten Bandung. Pengamatan jumlah stomata dan viabilitas polen dilaksanakan di Laboratorium Analisis Tanaman dan Pasca Panen Hortikultura Fakultas Pertanian Universitas Padjadjaran. Tanaman dipindahkan secara keseluruhan beserta pot dari lapangan menuju laboratorium. Rancangan penelitian yang digunakan yaitu single plant yang terdiri dari 6 perlakuan dengan 4 ulangan. Rancangan analisis data hasil pengamatan menggunakan analisis *Student's T-Test*. Pada penelitian ini digunakan dua mutan tomat *iaa9* yaitu mutan *iaa9-3* dan *iaa9-5* serta *WT-MT* sebagai kontrol yang diberi perlakuan kondisi suhu normal dan cekaman suhu tinggi. Mutan *iaa9-3* dan *iaa9-5* berasal dari tanaman *Wild-Type* Micro-Tom (*WT-MT*) dibentuk melalui mutasi dengan mutagenesis *ethyl methyl sulfonate* (EMS) (Just *et al.*, 2013). Perlakuan suhu yang digunakan yaitu suhu normal

dengan kisaran suhu maksimum 30-35°C selama 3 jam yaitu pada pukul 11.00 hingga 14.00 WIB, dan suhu *heat stress* dengan kisaran suhu maksimum 40-45 °C selama 3 jam yaitu pada pukul 11.00 hingga 14.00 WIB. Penanaman dilakukan pada musim kemarau, sehingga suhu tersebut merupakan rata-rata kisaran suhu pada waktu tersebut.

Setting perlakuan untuk uji suhu pada lahan percobaan menggunakan dua meja modifikasi dengan ukuran 1 x 1,5 m yang dibuat untuk tempat penyimpanan tanaman. Modifikasi meja plastic perlakuan suhu normal atau 30-35 °C yaitu memiliki atap plastik *Polyethylene* dan dinding tanpa plastik. Pada perlakuan suhu *heat stress* atau 40-45 °C meja perlakuan memiliki dinding dan atap plastic *Polyethylene* serta pada permukaannya dilapisi seng alumunium. Perlakuan suhu dimulai pada saat pindah tanam hingga akhir masa panen. Benih *iaa9-3* dan *iaa9-5*, serta *WT-MT* disemai selama 14 hari. Pindah tanam dilakukan pada pot plastik dengan diameter 15 cm, dengan media arang sekam dan cocopeat 1:1.

Analisis anatomis stomata dilakukan dengan menggunakan metode *Whole Mount* (Saas, 1951) yaitu mengambil bagian epidermis bawah daun ke empat, pewarnaan safranin 1% lalu ditempatkan pada *one cell counter* untuk mempermudah

perhitungan luas bidang untuk perhitungan stomata, kemudian diamati dengan mikroskop cahaya *Optima H-903*. Analisis viabilitas pollen dilakukan dengan mengumpulkan pollen dari bunga 1 DAF (*day after anthesis*) sebanyak 3 bunga per ulangan. Anter pada bunga diambil kemudian direndam pada larutan TTC (1% TTC) dan sukrosa 50% dan dibiarkan di ruangan gelap pada 38 °C selama 3 jam untuk mewarnai pollen. Supernatan sebanyak 2 µl diambil dan dimasukkan ke dalam *cell counter*. Pollen kemudian diamati di bawah mikroskop. Kriteria pollen *viabile* yaitu pollen yang menyerap warna merah dari larutan TTC. Perhitungan pollen dilakukan per 1 mm² *cell counter*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Viabilitas Pollen

Viabilitas pollen diamati secara mikroskopik. Hasil pengamatan terhadap viabilitas pollen secara mikroskopik terdapat tiga kategori warna pada pollen diantaranya (1) merah hingga merah kehitaman menunjukkan pollen viabel, (2) warna merah pudar atau orange menunjukkan pollen semi viabel, dan (3) pollen tidak berwarna atau transparan menunjukkan pollen mati (Gambar 1).

Gambar 1. Hasil mikroskopik analisis viabilitas pollen per 1 mm preparat (a) suhu 30-35°C (b) suhu 40-45°C. Ket. panah merah menunjukkan pollen viabel, panah biru menunjukkan pollen semiviabel, panah kuning menunjukkan pollen mati.

Hasil pengamatan menunjukkan jumlah pollen viable pada mutan *iaa9-3* dan *iaa9-5* lebih tinggi (Gambar 2a), sementara jumlah pollen semiviabel lebih rendah (Gambar 2b) dan demikian

pula dengan jumlah pollen mati (Gambar 2c). Hal tersebut ditemukan pada dua kondisi percobaan baik pada suhu 30-35°C maupun suhu 40-45°C. Menurut Aloni *et al.* (2006) auksin endogen atau IAA

berperan dalam pertumbuhan tabung polen yang akan menuju ovula, dibuktikan dengan peningkatan konsentrasi IAA pada putik setelah terjadi penyerbukan. Pengaplikasian auksin dapat meningkatkan panjang anter, mencegah aborsi serbuk sari dan memperbaiki viabilitas serbuk sari dewasa (Sakata *et al.*, 2010). Auksin dapat memblokir perubahan transkripsional, yang menghasilkan produksi polen yang normal dan mencegah sterilitas polen pada kondisi cekaman suhu (Higashitani,

2013). Menurut Pan *et al.* (2018) IAA dapat meningkatkan berat segar stamen dan pistils pada bunga tomat saat terpapar cekaman suhu. Pada suhu 40-45 °C, *WT-MT* memiliki jumlah polen viabel dan semiviabel paling rendah dan jumlah polen mati tertinggi dibandingkan mutan *iaa9-3* dan *iaa9-5*. Hal tersebut menunjukkan bahwa *WT-MT* memiliki potensi kemandulan bunga jantan tertinggi.

Gambar 2. Jumlah polen (a) viabel, (b) semiviabel, dan (c) polen mati dua tomat mutan pada suhu 30-35 °C dan 40-45 °C.

- Nilai rata-rata $\pm$ Standar Error (SE) ($n = 4$) yang diikuti dengan lambang bintang (*) menunjukkan berbeda nyata dibandingkan kontrol (*WT-MT*) pada suhu 30-35 °C dan 40-45 °C menurut uji *Student's T-Test* pada taraf $p < 0,05$.
- Nilai rata-rata $\pm$ Standar Error (SE) ($n = 4$) yang diikuti dengan lambang pagar (#) menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan setiap mutan antar dua kondisi suhu menurut uji *Student's T-Test* pada taraf $p < 0,05$.

Viabilitas polen pada mutan *iaa9-3*, mutan *iaa9-5* dan *WT-MT* menurun seiring dengan peningkatan suhu, sedangkan polen mati meningkat seiring dengan peningkatan suhu. Cekaman suhu tinggi berdampak terhadap peningkatan risiko kemandulan bunga jantan, aborsi serbuk sari hingga gagalnya pembuahan (Higashitani, 2013). Menurut Wang *et al.* (2017) cekaman suhu tinggi

menyebabkan viabilitas polen menurun lebih dari 50%, dan berpengaruh terhadap penurunan female atau ovule fertility serta penerimaan stigma. Menurut Faruq *et al.* (2012) cekaman suhu tinggi berdampak negatif terhadap proses meiosis (premature), perkecambahan polen, perkembangan ovula dan peningkatan viabilitas embrio. Pada tanaman tomat, suhu lingkungan yang tinggi dapat

mempengaruhi meiosis pada organ jantan dan betina, degradasi dinding sel anter, polen germinasi dan perkembangan tabung polen, viabilitas ovula, jumlah polen pada stigma dan fertilisasi (Zargar & Zargar, 2018).

Jumlah Stomata

Jumlah stomata pada daun (abaxial) tanaman tomat mutan *iaa9-5* dan *iaa9-3* lebih tinggi dibandingkan dengan *WT-MT* baik pada suhu 30-35 °C maupun 40-45 °C (Gambar 3). Hal ini disinyalir karena terjadinya mutasi pada gen *IAA9* yang dialami kedua tomat mutan tersebut.

Balcerowicz & Hoecker (2014) menyatakan bahwa pembentukan dan distribusi stomata dipengaruhi oleh jalur persinyalan auksin. Pembentukan stomata terdiri dari *unequal division* yaitu pembelahan sel *meristemoid* (Ms) secara asimetris kemudian *equal division* yaitu pembelahan *guard mother cells* (GMCs) secara simetris yang berkembang menjadi dua sel penjaga stomata, peningkatan level auksin terlihat selama fase transisi Ms ke GMC (Le *et al.*, 2014). Auksin dapat mengontrol pembelahan dan diferensiasi sel-sel jalur pembentukan stomata (Balcerowicz & Hoecker, 2014).

Gambar 3. Jumlah stomata pada suhu 30-35 °C dan 40-45 °C.

- Nilai rata-rata ± Standar Error (SE) (n = 4) yang diikuti dengan lambang bintang (*) menunjukkan berbeda nyata dibandingkan kontrol (*WT-MT*) pada suhu 30-35 °C dan 40-45 °C menurut uji *Student's T-Test* pada taraf $p < 0,05$.
- Nilai rata-rata ± Standar Error (SE) (n = 4) yang diikuti dengan lambang pagar (#) menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan setiap mutan antar dua kondisi suhu menurut uji *Student's T-Test* pada taraf $p < 0,05$.

Gambar 4. Kondisi stomata per 0.5 mm² pada daun tanaman tomat yang ditumbuhkan pada (a) suhu 30-35°C, dan (b) suhu 40-45°C.

Jumlah stomata mutan *iaa9-3* dan *iaa9-5* serta *WT-MT* pada suhu 30-35°C ditemukan lebih banyak dibandingkan jumlah stomata pada tomat mutan *iaa9-3* dan *iaa9-5* serta *WT-MT* yang ditumbuhkan pada kondisi suhu 40-45°C. Kehilangan air terus menerus akan menimbulkan efek dehidrasi pada tanaman, sehingga tanaman akan mengurangi kepadatan, dimensi serta luas stomata pada daun untuk mempertahankan potensi air jaringan (Kusvuran *et al.*, 2010). Regulasi stomata terhadap transpirasi merupakan strategi dari tanaman untuk mengurangi kehilangan air dengan menutup atau mengurangi jumlah stomata sebagai respon terhadap cekaman abiotik (Anosheh *et al.*, 2018). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang diperoleh yang menunjukkan pada kondisi tercekam (suhu tinggi) stomata akan menutup (Gambar 4). Adaptasi tanaman terhadap suhu tinggi suhu 40-45°C salah satunya mengurangi jumlah stomata dan kepadatan stomata.

SIMPULAN

Pada tomat mutan *iaa9-3* dan *iaa9-5* viabilitas polen dan jumlah stomata lebih tinggi dibandingkan *WT-MT* pada suhu 30-35°C maupun 40-45°C. Sementara viabilitas polen dan jumlah stomata pada mutan *iaa9-3*, *iaa9-5* dan *WT-MT* yang ditanam pada suhu 40-45°C lebih rendah dibandingkan mutan *iaa9-3*, *iaa9-5* dan *WT-MT* yang ditanam pada suhu 30-35 °C. Cekaman suhu tinggi disinyalir dapat menurunkan viabilitas polen dan jumlah stomata pada mutan *iaa9-3*, *iaa9-5* dan *WT-MT*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kami sampaikan ke semua pihak yang telah membantu penyelesaian penelitian, dan kepada Ditjen Dikti untuk mendukung pekerjaan ini melalui hibah pada skema Hibah Thesis. Kami juga berterima kasih kepada Gene Research Center, University of Tsukuba Jepang, yang telah menyediakan benih *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom, *iaa9-3* dan *iaa9-5*. Kami juga berterima kasih kepada semua anggota laboratorium kami untuk diskusi bermanfaat selama bekerja.

DAFTAR PUSTAKA

Aloni, R, E Aloni, AEM Langhans, and CI Ullrich.

2006. Role of auxin in regulating Arabidopsis flower development. *Planta*. 223: 315–328.
- Anosheh, HP, AS Moucheshi, H Pakniyat, and M Pessarakli. 2018. Stomatal responses to drought stress. Pp. 24–40 *in* Water Stress and Crop Plants: A Sustainable Approach, Volume 1, First Edition. (John Willey & Sons). Wiley Blackwell.
- Ariizumi, T, Y Shinozaki, and H Ezura. 2013. Genes that influence yield in tomato. *Breeding Science*. 63: 3–13.
- Badan Pusat Statistik. 2019. Statistik Tanaman Sayuran dan Buah-buahan Semusim Indonesia. Badan Pusat Statistik Direktorat Jendral Hortikultura.
- Balcerowicz, M, and U Hoecker. 2014. Auxin – a novel regulator of stomata differentiation. *Trends in Plant Science*. 19: 747–749.
- Faruq, G, A Nezhadahmadi, and Z Prodhan. 2012. Heat tolerance in tomato. *Life Science Journal*. 9: 1936–1950.
- Guilfoyle, J, and G Hagen. 2007. Auxin response factors. *Plant Cell and Environment*. 39: 1014–1028.
- Higashitani, A. 2013. High temperature injury and auxin biosynthesis in microsporogenesis. *Frontiers in Plant Science*. 4: 2007–2010.
- Hoshikawa, K, H Ezura, S Fukumoto, S Ooshima, and M Aiba. 2017. Heat-tolerant tomato mutant and method for producing the same. Patent Application Publication. 1: 1–59.
- IPCC. 2014. Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. IPCC WGII AR5. 1: 1–44.
- Just, D, V Garcia, L Fernandez, C Bres, JP Mauxion, J Petit, and C Rothan. 2013. Micro-Tom mutants for functional analysis of target genes and discovery of new alleles in tomato. *Plant Biotechnology*. 30: 225–231.
- Kusvuran, S, HY Dasgan, and C Paper. 2010. Relationship between drought tolerance and stomata density in melon relationship between drought tolerance and stomata density in melon. *Acta Hort*. 871: 290–301.
- Le, J, X Liu, and X Chen. 2014. Auxin transport and activity regulate stomatal patterning and development. *Nature Communication*. 1: 1–9.
- Pan, C, C Jiao, A Lamin-samu, and Z Fei. 2018. Tomato stigma exsertion induced by high temperature is associated with the jasmonate signaling pathway. *Plant Cell and Environment*. 1: 1–56.

- Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian. 2017. Outlook Tanaman Pangan dan Hortikultura. Retrieved from <https://aplikasi2.pertanian.go.id/bdsp/id/komoditas>
- Saas, J. 1951. Botanical Microtechnique. Iowa, The Iowa State Collage Press.
- Sakata, T, T Oshino, S Miura, M Tomabechi, Y Tsunaga, N Higashitani, and A Higashitani, A. 2010. Auxins reverse plant male sterility caused by high temperatures. PNAS. 107 :8569–8574.
- Samakovli, D, T Tichá, M Ovečka, I Luptovčiak, V Zapletalová, Y Krasylenko, And J Šamaj. 2018. Environment and HSP90 modulate MAPK stomatal developmental pathway. Biorxiv. 1: 1–15.
- Shibasaki, K, and A Rahman. 2013. Auxin and temperature stress: Molecular and cellular perspectives. Springer. 17: 295–310.
- Solankey, SS, RK Singh, DK Baranwal, DK Singh, SS Solankey, RK Singh, and DK Singh. 2015. Genetic expression of tomato for heat and drought stress tolerance: An overview. International Journal of Vegetable Science. 21: 496–515.
- Wang, H, B Jones, Z Li, P Frasse, C Delalande, F Regad, S Chaabouni, and A Latche. 2005. The Tomato *Aux/IAA* transcription factor *IAA9* is involved in fruit development and leaf morphogenesis. The Plant Cell. 17: 2676–2692.
- Wang, X, C Xu, X Cai, Q Wang, and S Dai. 2017. Heat-responsive photosynthetic and signaling pathways in plants: Insight from proteomics. International Journal of Molecular Sciences. 18: 1–19.
- Zargar, SM, and MY Zargar. 2018. Plants: An Omics and Signaling in Mediated Sensing Perspective. Springer Sciences. 229 pp.