

Studi Penyiapan Akar Berkualitas untuk Uji Kromosom dan Penggandaan Kromosom Planlet Hasil Kultur Anter *Anthurium andraeanum* Linden ex Andre) cv. Tropical (Study On Preparing Qualified Roots Suitable for Chromosome Test and Chromosome Doubling of Plantlet Derived from Anther Culture of *Anthurium andraeanum* Linden ex Andre cv. Tropical)

Winarto, B

Balai Penelitian Tanaman Hias, Jl. Raya Ciherang-Pacet, Cianjur 43253

E-mail : budi_winarto67@yahoo.com

Naskah diterima tanggal 19 Agustus 2013 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 26 September 2013

ABSTRAK. Pengakaran berkualitas yang sesuai untuk uji kromosom dan penggandaan kromosom merupakan masalah kritical dalam pengembangan teknologi kultur anter *Anthurium*. Penelitian bertujuan untuk mengetahui (1) pengaruh media dan arang aktif dalam mempersiapkan akar berkualitas yang sesuai untuk uji kromosom dan (2) pengaruh konsentrasi dan waktu aplikasi kolkisin terhadap keberhasilan penggandaan kromosom. Studi penyiapan akar berkualitas dan penggandaan kromosom planlet hasil kultur anter *Anthurium* telah dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan dan Rumah Kaca, Balai Penelitian Tanaman Hias Segunung dari Bulan Februari sampai September 2009. Pembentukan akar berkualitas yang sesuai untuk uji kromosom dipengaruhi oleh media pengakaran dan penambahan arang aktif. MP-7 [medium Winarto-Teixeira (WT) tanpa hormon yang ditambah 1% arang aktif] merupakan medium induksi pembentukan jumlah dan kualitas akar terbaik dengan 4,5 akar per tunas dan 83% nya ialah akar yang sesuai untuk uji kromosom. MPH-1 [Murashige dan Skoog (MS) yang ditambah 0,2 mg/l N6-benzylaminopurin (BAP) dan 0,02 mg/l asam asetat naftalen (NAA)] merupakan medium pengakaran tunas haploid yang sesuai untuk induksi pembentukan akar hingga 2,5 akar per tunas. Konsentrasi kolkisin 0,25% dengan 7 hari waktu aplikasi dan 0,05% dengan 10 hari periode aplikasi merupakan perlakuan yang sesuai untuk mendapatkan tanaman haploid ganda dengan persentase yang tinggi yaitu 80 dan 76,5% secara berurutan. Ini berarti 19–20 tanaman haploid ganda diperoleh dengan perlakuan tersebut. Hasil penelitian ini sangat bermanfaat terutama dalam mempersiapkan akar berkualitas yang sesuai untuk uji kromosom dan mendapatkan tanaman haploid ganda yang optimal melalui perlakuan kolkisin.

Katakunci: Planlet; Penggandaan kromosom; Kultur anter; *Anthurium andraeanum* Linden ex Andre cv. Tropical

ABSTRACT. Obtaining qualified-rooting and chromosome doubling technique are critical problem in developing anther culture system on *Anthurium*. The aim of the study were (1) the effect of media and activated charcoal on preparing qualified roots which suitable for chromosome test, and (2) the effect of concentrations and colchicine application time on succeeded chromosome doubling. Study on preparing qualified-roots and chromosome doubling of plantlets derived from anther culture of *Anthurium* was successfully established. Study was conducted at Tissue Culture Laboratory and Greenhouse of Indonesian Ornamental Crops Research Institute from February until September 2009. Formation of qualified-roots was influenced by rooting media and adding of activated-charcoal. MP-7 [Winarto-Teixeira (WT) medium hormone free] with 1% of activated charcoal was the most appropriate medium in inducing qualified-roots with 4.5 roots per shoot and 83% of qualified-roots suitable for chromosome testing. MPH-1 [Murashige and Skoog (MS) supplemented with 0.2 mg/l N6-benzylaminopurine (BAP) and 0.02 mg/l α -naphthalene acetic acid (NAA)] was the most suitable rooting medium with 2.5 roots per shoot. Colchicine concentration of 0.25% for 7 days dipping period or 0.05% with 10 days of dipping period were suitable treatments in obtaining high percentage of double-haploid plants with 80.0 and 76.5% respectively. Those mean that 19-20 double haploid plants established from 25 haploid plants treated using these treatment. Results of these studies gave high benefit, especially in preparing qualified-roots suitable for chromosome testing and establishing double haploid plants via colchicine treatment.

Keywords: Plantlet; Chromosome doubling; Anther culture; *Anthurium andraeanum* Linden ex Andre cv. Tropical

Kultur anter merupakan salah satu teknologi kultur *in vitro* yang diaplikasikan untuk mendapatkan tanaman homozigot dalam waktu yang lebih cepat yang sangat bermanfaat dalam perakitan hibrida unggul baru. Pada tanaman hias, teknik kultur anter telah berhasil dikembangkan pada lili (Han *et al.* 1997), *Cyclamen* (Ishizaka 1998), dan bunga matahari (Saji & Sujatha 1998). Sementara pada

Anthurium, pengembangan teknologi kultur anter dilakukan sejak tahun 2003 dan berhasil dikembangkan pada 2009 (Winarto & Rachmawati 2007, Winarto 2009).

Pengakaran eksplan bukan masalah serius dalam penyiapan planlet *Anthurium* yang akan diaklimatisasi. Tunas-tunas hasil kultur anter *Anthurium* mudah diinduksi pengakarannya pada medium Winarto-

Teixeira (WT) dengan atau tanpa ZPT (Rachmawati 2005, Winarto 2009, Winarto *et al.* 2011a, Winarto & Teixeira da Silva 2012). Jumlah akar bervariasi dari 1–7 akar per tunas. Akar yang terbentuk umumnya ialah akar udara, yang tumbuh pada ketiak daun, tumbuh ke arah samping atau atas tanpa menyentuh media, sedangkan akar yang tumbuh ke dalam media jumlahnya sangat terbatas. Akar dalam kondisi demikian tidak sesuai untuk bahan pengujian kromosom karena area titik tumbuh aktif yang sangat terbatas, kurang berkualitas, dan menghasilkan hasil uji kromosom yang tidak jelas (Winarto 2011) dan mosaik kromosom (Cavallini & Lupi 2006). Evaluasi ploidi pada level *in vitro* umumnya memiliki tingkat keberhasilan yang rendah (1–15%) sebagai akibat dari kualitas donor yang tidak optimal. Oleh karena itu penyiapan akar yang berkualitas yang sesuai untuk uji kromosom merupakan langkah penting yang harus dilakukan pada pengembangan teknologi kultur anter *Anthurium*, khususnya pada uji kromosom pada level *in vitro*.

Akar berkualitas umumnya ditandai dengan tipe pertumbuhan akar yang masuk ke dalam media tanam, memiliki sedikit bulu akar, daerah aktif tumbuh panjang, serta tumbuh lebih cepat dan vigor dengan ukuran yang lebih besar. Akar ini umumnya ditemukan pada medium yang ditambah dengan arang aktif. Sementara akar yang kurang dan tidak berkualitas ialah akar yang tumbuh tidak ke dalam media tumbuh, memiliki banyak bulu akar, daerah aktif yang tumbuh sedikit, dan tumbuh kurang vigor dengan ukuran yang lebih kecil. Akar ini disebut juga akar udara. Kondisi akar ini sangat berpengaruh terhadap keberhasilan uji kromosom dalam penentuan variasi ploidi tanaman hasil kultur *Anthurium* (Winarto 2009).

Pembentukan akar pada level *in vitro* dipengaruhi oleh genotip, umur eksplan, medium (jenis media dasar, konsentrasi NH_4NO_3 , kandungan garam mineral), hormon, jenis dan konsentrasi agar, serta cahaya (Geier 1986, 1990, Chen *et al.* 1997, Aswath & Biswas 1999, Martin *et al.* 2003, Keatmetha & Suksa-Ard 2004, de Lima *et al.* 2006). Geier (1986) menggunakan medium dasar Nitsch yang mengandung 720 mg/l NH_4NO_3 . Chen *et al.* (1997) memodifikasi medium Murashige & Skoog (1962, MS) yang mengandung 2,2 μM benziladenin (BA) pada cahaya yang rendah. Martin *et al.* (2003) menggunakan $\frac{1}{2}$ medium MS yang ditambah 0,54 mM asam asetat naftalen (NAA) dan 0,93 mM kinetin (Kin). Keatmetha & Suksa-Ard (2004) memanfaatkan $\frac{1}{2}$ medium MS tanpa hormon yang mengandung 8 g/l arang aktif, 30 g/l sukrosa, 12 g/l agar atau 1,5 g/l fitagel. Media tersebut sesuai untuk induksi akar pada tunas hasil regenerasi jaringan

vegetatif, tetapi tidak sesuai digunakan untuk tunas yang berasal dari jaringan generatif. Tunas diploid dan triploid berhasil diinduksi pembentukan akarnya pada medium MW-1 tanpa hormon, tetapi masih belum berhasil pada tunas haploid.

Penggandaan kromosom secara spontan dalam kultur anter merupakan fenomena penting, sering terjadi dan berdampak positif terhadap produksi tanaman haploid ganda. Beberapa peneliti melaporkan kejadian ini dengan variasi keberhasilan. Kahrizi & Mohammadi (2009) melaporkan bahwa frekuensi penggandaan kromosom secara spontan pada kultur anter barley mencapai 65–76%, pada *Brassica rapa* ssp. *chinensis* mencapai lebih dari 70% (Gu *et al.* 2003), pada kentang antara 4–67% (Chauvin *et al.* 2003). Pada kultur anter *Anemone coronaria*, 11 dari 19 planlet yang berhasil diregenerasi (58%) merupakan tanaman haploid ganda yang terjadi secara spontan (Laura *et al.* 2006). Pada tanaman dengan persentase penggandaan kromosom spontan yang tinggi, maka penggandaan kromosom tidak diperlukan lagi. Namun pada studi yang berbeda juga diketahui bahwa teknologi kultur anter dan/atau mikrospora tidak disertai dengan persentase penggandaan kromosom secara spontan yang tinggi. Pada kubis penggandaan kromosom spontan hanya mencapai 15% (Chen *et al.* 1994). Ishizaka (1998) mendapatkan 12 tanaman (28%) dari 43 tanaman *Cyclamen purpurescens* mengganda secara spontan. Sementara pada *Allium cepa* penggandaan kromosom spontan hanya mencapai 1% saja (Campion *et al.* 1995). Pada kultur anter *Anthurium*, penggandaan kromosom secara spontan juga belum pernah dilaporkan. Hasil penelitian sebelumnya dilaporkan bahwa jumlah tanaman haploid yang diperoleh ialah 16 tanaman (8,8%) dari 182 tanaman yang dihasilkan (Rachmawati 2005), 15 tanaman (17%) dari 88 tanaman yang dihasilkan (Winarto *et al.* 2010a), 20 tanaman (29%) dari 68 tanaman yang dihasilkan (Winarto *et al.* 2010b), tanaman (33,5%) dari 76 tanaman yang dihasilkan (Winarto 2011). Pada kondisi demikian, maka penggandaan kromosom menjadi faktor penting penunjang keberhasilan produksi tanaman haploid ganda pada pengembangan teknologi haploid.

Beberapa bahan efektif agen penggandaan kromosom tanaman ialah kolkisin (Currah & Ockendon 1987, Chen *et al.* 1994, Hensen & Andersen 1998, Corredor & Naranjo 2007, Bürün & Emiroğlu 2008, Solmaz *et al.* 2011, Mohammadi *et al.* 2012), orizalin (Chauvin *et al.* 2003, Petersen *et al.* 2003), trifuralin (Rey *et al.* 2002, Hansen & Andersen 2006, Zhao & Simmonds 2006), dan amiprofos-metil (APM) (Ramulu *et al.* 1991, Hansen & Andersen 2006, Wang *et al.* 2006). Di antara bahan tersebut, kolkisin merupakan

bahan antimitosis yang banyak digunakan untuk tujuan penggandaan kromosom. Kolkisin digunakan secara ekstensif sejak tahun 1937 hingga saat ini untuk menghasilkan tanaman poliploid. Diaplikasikan untuk menahan tahap metafase pada pembelahan sel (Ramulu *et al.* 1991) dan menginduksi terjadinya variasi tanaman (Zaffar *et al.* 2003). Keberhasilan aplikasi kolkisin untuk penggandaan kromosom dilaporkan pada *Lilium formolongi* (Ishimori & Niimi 2004), tembakau (Burun & Emiroglu 2008), *Echinacea purpurea* (Nilanthi *et al.* 2009), kubis (Zhao *et al.* 2002, Klíma *et al.* 2008, Mohammadi *et al.* 2012), melon (Solmaz *et al.* 2011), *Torenia fournieri* (Jiranapapan *et al.* 2011), dan *Capsicum annuum* (Luitel & Kang 2012). Kolkisin diaplikasikan dengan berbagai variasi konsentrasi, waktu, dan metode aplikasinya. Tetapi aplikasi kolkisin untuk tujuan penggandaan kromosom pada regenerasi hasil kultur anter *Anthurium* belum pernah dilaporkan.

Penelitian bertujuan untuk mengetahui (1) pengaruh media dan arang aktif dalam mempersiapkan akar berkualitas yang sesuai untuk uji kromosom serta (2) pengaruh konsentrasi dan waktu aplikasi kolkisin terhadap keberhasilan penggandaan kromosom. Minimal terdapat satu medium yang sesuai dan arang aktif berpengaruh nyata terhadap penyiapan akar berkualitas dan satu perlakuan kolkisin yang optimal untuk penggandaan kromosom.

BAHAN DAN METODE

Penyiapan Bahan Tanaman

Tunas-tunas untuk studi penyiapan akar berkualitas diperoleh dengan menanam kalus hasil kultur anter *Anthurium* dengan bakal tunas pada medium Winarto-Teixeira (WT) tanpa penambahan hormon (Winarto *et al.* 2011a). Tujuh hingga delapan kalus dengan bakal tunas ditanam dalam botol jam yang telah diisi dengan medium semi padat dengan volume medium 35 ml per botol untuk meningkatkan keseragaman eksplan. Kultur selanjutnya diinkubasi pada 12 jam fotoperiode di bawah lampu fluoresen dengan intensitas $\sim 13 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ pada suhu $24 \pm 1^\circ\text{C}$ dan 50–60% kelembaban relatif selama ± 3 bulan. Tunas dengan 2–3 daun hasil regenerasi kalus selanjutnya dipanen dan dipersiapkan sebagai sumber donor pada percobaan penyiapan akar berkualitas yang sesuai untuk uji kromosom.

Planlet haploid yang digunakan pada studi penggandaan kromosom berasal dari penelitian sebelumnya (Winarto *et al.* 2010ab, 2011ab). Planlet haploid selanjutnya disubkultur berulang pada medium New Winarto-Teixeira (NWT) yang ditambah

dengan 0,5 mg/l tidiazuron (TDZ) dan 0,5 mg/l N6-benzilaminopurin (BAP) yang ditambah 1% arang aktif untuk tujuan perbanyak planlet haploid. Kultur diinkubasi pada kondisi yang sama dengan uraian sebelumnya selama ± 3 bulan. Planlet selanjutnya digunakan untuk studi penggandaan kromosom.

Media dasar yang digunakan dalam percobaan ini ialah medium WT, NWT, dan MS yang ditambah dengan 30 g/l sukrosa dan 7 g/l agar (Winarto *et al.* 2011b). Hormon TDZ, BAP, Kin, dan NAA merupakan hormon-hormon produk Sigma-Jerman. Kolkisin produksi Merk-Jerman ialah jenis kolkisin yang digunakan dalam studi penggandaan kromosom.

Studi Penyiapan Akar Berkualitas

Konsentrasi arang aktif yang digunakan ialah (1) 0% dan (2) 1%. Media pengakaran (MP) yang digunakan ialah medium (1) NWT + 1,0 mg/l kinetin + 0,2 mg/l NAA (MP-1), (2) WT + 0,05 mg/l TDZ + 1,0 mg/l BAP + 0,02 mg/l NAA (MP-2), (3) WT + 0,05 mg/l TDZ + 1,5 mg/l BAP + 0,02 mg/l NAA (MP-3), (4) WT + 0,05 mg/l TDZ + 2,5 mg/l BAP + 0,02 mg/l NAA (MP-4), (5) WT + 1,0 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA (MP-5), (6) WT + 2,5 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA (MP-6), (7) WT tanpa hormon (MP-7), dan (8) NWT tanpa hormon (MP-8).

Percobaan faktorial disusun menggunakan rancangan acak lengkap dengan empat ulangan. Tiap perlakuan terdiri atas empat botol. Tiap botol berisi empat tunas yang dikultur. Kultur diinkubasi pada kondisi inkubasi yang diuraikan pada penyiapan bahan tanaman.

Peubah yang diamati ialah (1) jumlah akar per tunas (JA) dan (2) persentase akar yang berkualitas (PJAB, %). PJAB dihitung dengan membandingkan jumlah akar yang berkualitas dibagi dengan jumlah total akar yang terbentuk dikalikan dengan 100%. Akar yang berkualitas dinilai dengan cara mengukur panjang daerah aktif tumbuh yang terlihat pada ujung akar, ukuran, dan warna akar. Akar dinilai berkualitas jika daerah aktif tumbuhnya lebih dari 1 mm, berukuran lebih dari 0,5 mm dan berwarna kuning segar. Pengamatan dilakukan $\pm 4,0$ bulan setelah kultur inisiasi.

Studi Pembentukan Akar Pada Tunas Haploid Hasil Kultur Anter *Anthurium*

Pada studi pembentukan akar pada tunas haploid hasil kultur anter *Anthurium*, enam media pengakaran haploid (MPH) yang digunakan pada percobaan ini ialah (1) MS yang ditambah 0,2 mg/l BAP dan 0,02 mg/l NAA (MPH-1), (2) MS yang mengandung 0,1 mg/l BAP dan 0,01 mg/l NAA (MPH-2), (3) MW yang ditambah dengan 0,5 mg/l IAA dan 5,0 mg/l

BAP (MPH-3), (4) medium MS ($\frac{1}{2}$ makro) yang mengandung 0,5 mg/l TDZ, 1,0 mg/l BAP dan 0.01 mg/l NAA (MPH-4), (5) medium MS ($\frac{1}{2}$ makro) ditambah 0,5 mg/l IAA dan 5,0 mg/l BAP (MPH-5), dan (6) medium MS ($\frac{1}{2}$ makro) dengan 1,0 mg/l IAA dan 10 mg/l BAP (MPH-6). Untuk media MPH-3 digunakan untuk dua jenis tunas, yaitu tunas diploid (MPH-3d) dan haploid (MPH-3h).

Percobaan disusun menggunakan rancangan acak lengkap dengan empat ulangan. Tiap perlakuan terdiri dari empat botol. Tiap botol berisi lima tunas haploid.

Peubah yang diamati ialah (1) jumlah akar per tunas (JA) dan (2) persentase akar yang berkualitas (PJAB, %). Pengamatan dilakukan \pm 4,0 bulan setelah kultur inisiasi.

Studi Penggandaan Kromosom

Konsentrasi kolkisin yang diuji dalam percobaan ini ialah (1) 0,05%, (2) 0,1%, (3) 0,25%, dan (4) 0,5%. Lama perendaman kolkisin pada percobaan ini ialah 7 hari, sedangkan lama perendaman kolkisin yang diuji ialah (1) 0 jam, (2) 24 jam, (3) 3 hari, (4) 5 hari, (5) 7 hari, dan (6) 10 hari. Konsentrasi kolkisin yang digunakan ialah 0,05%. Dua percobaan ini tidak digabung mengingat keterbatasan penyiapan planlet haploid yang dapat dilakukan. Bahan yang digunakan pada tahap ini ialah planlet dengan 2–3 daun dan akar. Perlakuan kolkisin diberikan dengan cara merendam seluruh bagian akar planlet dalam larutan kolkisin.

Percobaan disusun menggunakan rancangan acak lengkap dengan tiga ulangan. Tiap perlakuan terdapat 25 planlet haploid yang ditanam.

Peubah yang diamati ialah (1) persentase kematian (%), (2) variasi ploidi tanaman, (3) persentase tanaman haploid ganda (PTHG, %), dan (4) persentase keberhasilan penggandaan kromosom (PKK, %). Persentase kematian dihitung dengan cara membagi jumlah total tanaman yang hidup setelah aklimatisasi dengan jumlah total tanaman yang diaklimatisasi dikalikan dengan 100%. Variasi ploidi dilihat dan dinilai dari variasi jumlah kromosom pada tiap sampel yang berhasil diamati di bawah mikroskop pada pembesaran 400–1.000x. PTHG adalah jumlah tanaman haploid yang jumlah kromosomnya berhasil digandakan dibanding dengan total jumlah tanaman haploid yang diberi perlakuan kolkisin dikalikan dengan 100%. PKK adalah total jumlah tanaman haploid yang kromosomnya berhasil digandakan, baik 2 x lipat atau 3 x lipat dibagi dengan total jumlah tanaman haploid yang diberi perlakuan kolkisin dikalikan dengan 100%. Pengambilan data dilakukan 5 bulan setelah perlakuan.

Deteksi Variasi Ploidi Tanaman

Deteksi variasi ploidi pada tanaman hasil penggandaan dilakukan menggunakan metode pewarnaan aceto-orcein (Sharma & Sharma 1994) yang dimodifikasi (Winarto 2009). Metode tersebut diawali dengan memanen ujung akar yang aktif tumbuh pada pagi hari antara jam 08:00 s/d 10:00 WIB. Tudung akar yang ada di ujung akar dibuang menggunakan pisau kultur, kemudian dipotong \pm 1 mm. Potongan ujung akar ini selanjutnya dimasukkan dalam larutan 1 N HCl dalam penangas air bersuhu 60°C selama 2 menit. Sampel ujung akar kemudian diwarnai dengan merendamnya dalam larutan 2% aceto-orcein selama \pm 1,5 jam pada suhu ruangan. Potongan yang telah diwarnai diambil dan diletakkan di atas gelas obyek, tetesi dengan 1–2 tetes larutan aceto-orcein yang baru, tutup dengan kaca penutup dan tekan menggunakan ibu jari hingga sel-sel ujung akar tersebar merata dan tipis. Spesimen selanjutnya ditutup dengan Entellan agar tidak mudah mengering, diamati di bawah mikroskop pada perbesaran 400 dan 1.000x untuk pengamatan dan pengambilan gambar.

Analisis Data

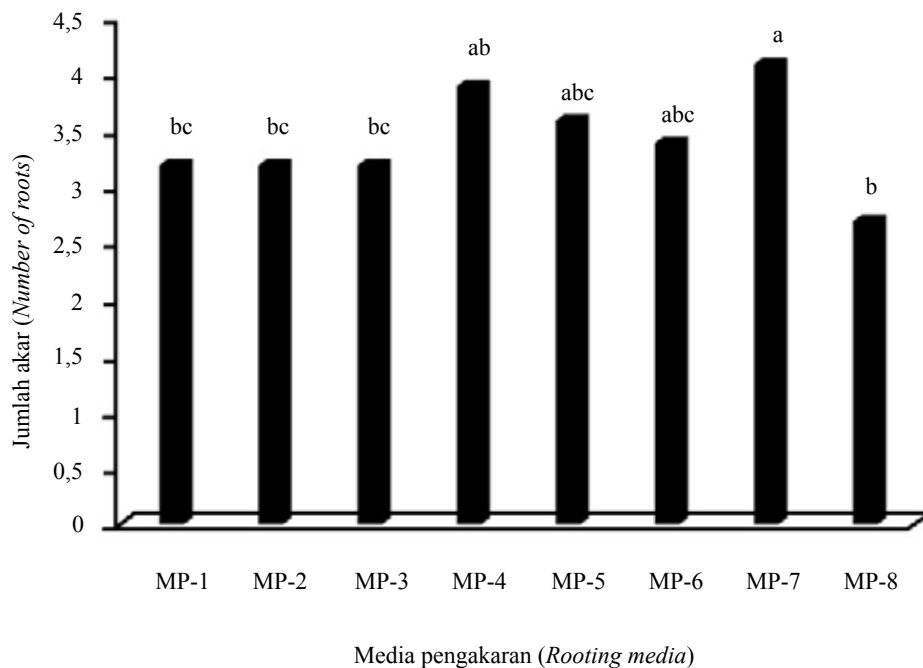
Data pengamatan dianalisis menggunakan analisis varian (ANOVA) dengan program SAS Release Window 9.12. Jika terdapat perbedaan nilai rerata perlakuan, maka diuji lanjut menggunakan uji wilayah berganda Duncan pada taraf kepercayaan 5% (Mattjik & Sumertajaya 2006).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Studi Penyiapan Akar Berkualitas untuk Uji Kromosom

Perlakuan arang aktif dan media pengakaran memberikan pengaruh yang nyata terhadap kualitas akar yang dihasilkan pada tunas-tunas hasil kultur anter. Kedua perlakuan juga memberikan pengaruh interaksi nyata pada semua peubah yang diamati. Jumlah akar yang dihasilkan berkisar 2–6 akar per tunas dengan nilai rerata tertinggi 4,5 akar per tunas ditemukan pada MP-7.

Penggunaan arang aktif pada pembentukan akar tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap jumlah dan kualitas akar yang dihasilkan. Jumlah akar yang dihasilkan ialah 3,3 per tunas pada medium tanpa arang aktif dan 3,5 akar per tunas pada medium yang ditambah 1% arang aktif (Tabel 1). Tetapi persentase jumlah akar berkualitas mencapai 66% dan lebih tinggi dibanding akar yang dihasilkan pada medium tanpa arang aktif yang hanya 41% (Tabel 2). Media



Grafik 1. Pengaruh media pengakaran terhadap jumlah akar. (MP-1) NWT + 1,0 mg/l kinetin + 0,2 mg/l NAA, (MP-2) WT + 0,05 mg/l TDZ + 1,0 mg/l BAP + 0,02 mg/l NAA, (MP-3) WT + 0,05 mg/l TDZ + 1,5 mg/l BAP + 0,02 mg/l NAA, (MP-4) WT + 0,05 mg/l TDZ + 2,5 mg/l BAP + 0,02 mg/l NAA, (MP-5) WT + 1,0 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA, (MP-6) WT + 2,5 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA, (MP-7) WT tanpa hormon, dan (MP-8) NWT tanpa hormon. Histogram yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji wilayah ganda Duncan pada taraf kepercayaan 5% (*Effect of rooting media on number of roots produced per shoot. (MP-1) NWT medium containing 1.0 mg/l kinetin + 0.2 mg/l NAA, (MP-2) WT supplemented with 0.05 mg/l TDZ + 1.0 mg/l BAP + 0.02 mg/l NAA, (MP-3) WT medium augmented with 0.05 mg/l TDZ + 1.5 mg/l BAP + 0.02 mg/l NAA, (MP-4) WT medium added with 0.05 mg/l TDZ + 2.5 mg/l BAP + 0.02 mg/l NAA, (MP-5) WT medium containing 1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA, (MP-6) WT medium supplemented with 2.5 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA, (MP-7) WT medium hormone free, and (MP-8) NWT medium hormone free. Histogram followed by the same letter are not significantly different based on DMRT, $p=0.05$*)

Tabel 1. Pengaruh interaksi arang aktif dan media pengakaran terhadap jumlah akar yang dihasilkan per tunas (*Interaction effect of activated charcoal concentrations and rooting media on number of roots produced per shoot*)

Medium pengakaran (Rooting medium) (MP)	Jumlah akar per tunas (<i>Number of roots produced per shoot</i>)	
	Konsentrasi arang aktif (Activated-charcoal concentration, KAR), %	
	KAR-1 (0%)	KAR-2 (1%)
MP-1	3,4 ab	3,0 bc
MP-2	4,0 a	2,5 c
MP-3	4,1 a	2,3 c
MP-4	3,7 ab	4,0 ab
MP-5	3,4 ab	3,8 ab
MP-6	3,5 ab	3,3 bc
MP-7	3,7 ab	4,5 a
MP-8	2,5 b	3,0 bc
KK (CV) %	10,98	9,74

Angka rerata yang diikuti dengan huruf yang sama pada kolom dan baris yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji wilayah ganda Duncan pada taraf kepercayaan 5% (*Mean followed by the same letter in the same column are not significantly different based on DMRT, $p=0,05$*)

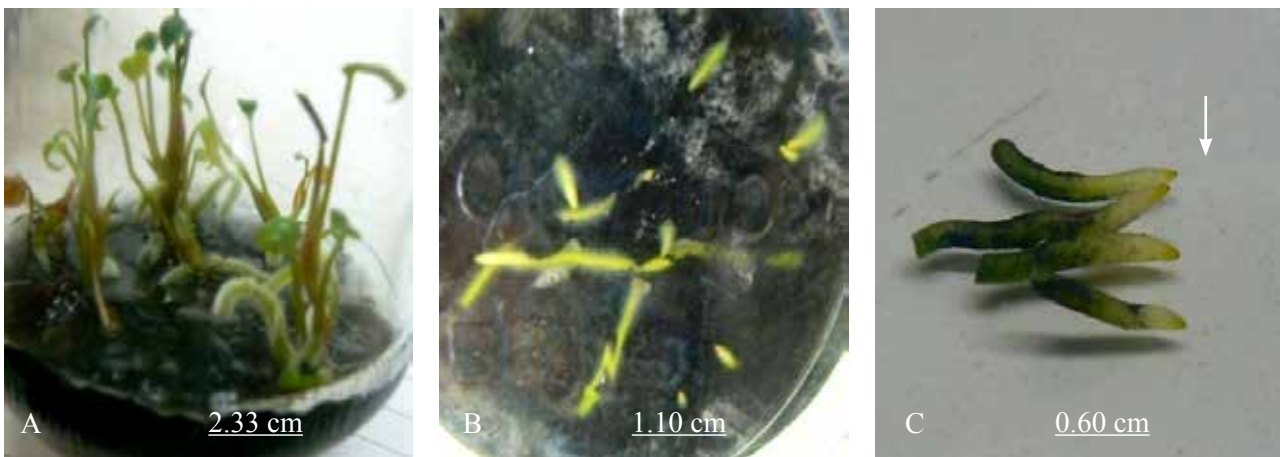
Tabel 2. Pengaruh interaksi arang aktif dan media pengakaran terhadap persentase akar berkualitas (*Interaction effect of activated charcoal concentrations and rooting media on percentage of qualified roots*)

Medium pengakaran (<i>Rooting medium</i>) (MP)	Persentase akar berkualitas (<i>Percentage of qualified roots, PAB</i>), %	
	Konsentrasi arang aktif (<i>Activated charcoal concentrations, KAR</i>), %	
	KAR-1 (0%)	KAR-2 (1%)
MP-1	45,8 a	54,2 b
MP-2	46,3 a	58,4 ab
MP-3	30,2 a	66,7 ab
MP-4	45,7 a	56,7 ab
MP-5	45,5 a	79,2 ab
MP-6	29,6 a	75,0 ab
MP-7	43,6 a	82,5 a
MP-8	54,2 a	58,4 ab
KK (<i>CV</i>), %	15,67	10,57

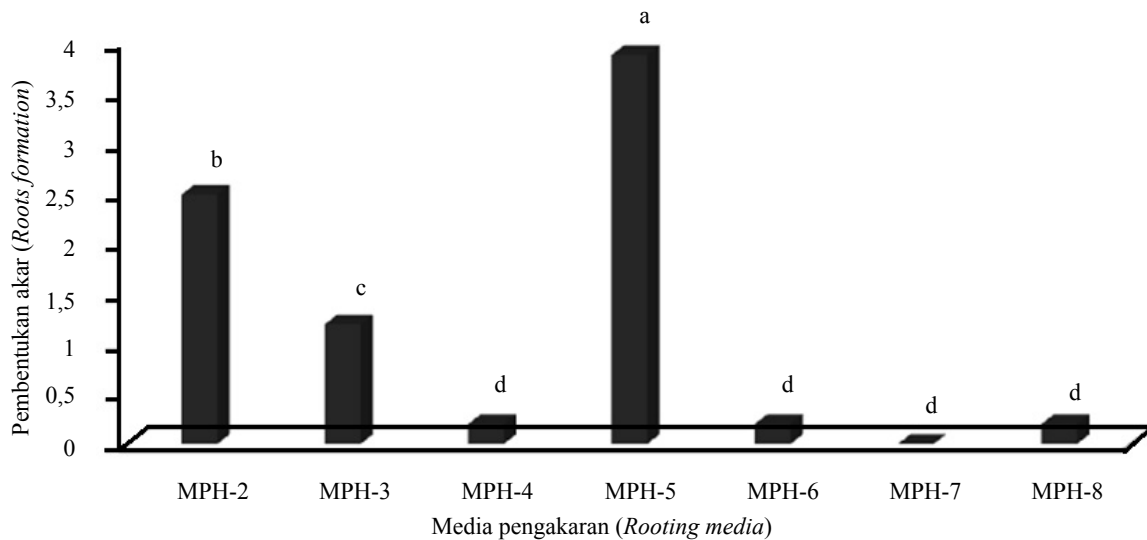
pengakaran berpengaruh terhadap jumlah akar yang dihasilkan, meskipun tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap kualitasnya. MP-7 merupakan medium terbaik dalam menginduksi jumlah dan kualitas akar tertinggi dengan 4,1 akar per tunas dimana 63%-nya merupakan akar yang berkualitas untuk uji kromosom (Gambar 1).

Kombinasi perlakuan arang aktif dengan media pengakaran memberikan pengaruh yang nyata terhadap penyiapan akar yang berkualitas. MP-3 merupakan medium pengakaran yang maksimal dalam pembentukan akar, meski tidak berbeda nyata dengan MP-2 (Tabel 2). Penggunaan 1% arang aktif mengubah kemampuan medium dalam menginduksi

pembentukan akar dan MP-7 merupakan medium terbaik dengan jumlah akar mencapai 4,5 akar per tunas (Grafik 1 dan Tabel 1). Penggunaan 1% arang aktif memberikan pengaruh yang maksimal terhadap persentase akar berkualitas yang dihasilkan oleh tunas-tunas yang dikultur di atasnya. Pada media pengakaran tanpa pemberian arang aktif, persentase akar berkualitas berada pada kisaran angka 30–54% (Tabel 3). Persentase akar berkualitas pada media pengakaran yang ditambah dengan 1% arang aktif mencapai 100%. Hal ini berarti semua akar yang dihasilkan dapat digunakan sebagai donor eksplan yang sesuai untuk pewarnaan kromosom. Persentase akar berkualitas tertinggi ditemukan pada tunas yang dikultur pada MP-7 yang mencapai 83% (Tabel 2).



Gambar 1. Jumlah dan kualitas akar yang maksimal pada MP-7 yang mengandung 1% arang aktif. (A) akar dominan tumbuh ke bawah menembus medium, (B) akar berkualitas dengan titik aktif tumbuh yang lebih panjang dan berada di dasar medium, dan (C) akar berkualitas yang sesuai untuk uji kromosom (*Maximal number and quality of roots on MP-7 medium containing 1% of activated charcoal. (A) dominant roots growth into the medium, (B) qualified roots with longer active growth point in the base of medium, and (C) qualified roots suitable for chromosome testing*)



Grafik 2. Pengaruh media pengakaran haploid terhadap pembentukan akar pada tunas haploid. Histogram yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji wilayah berganda Duncan pada taraf kepercayaan 5% (*Effect of haploid rooting media on root formation of haploid shoots. Histogram followed by the same letter are not significantly different based on DMRT, $p=0.05$*)

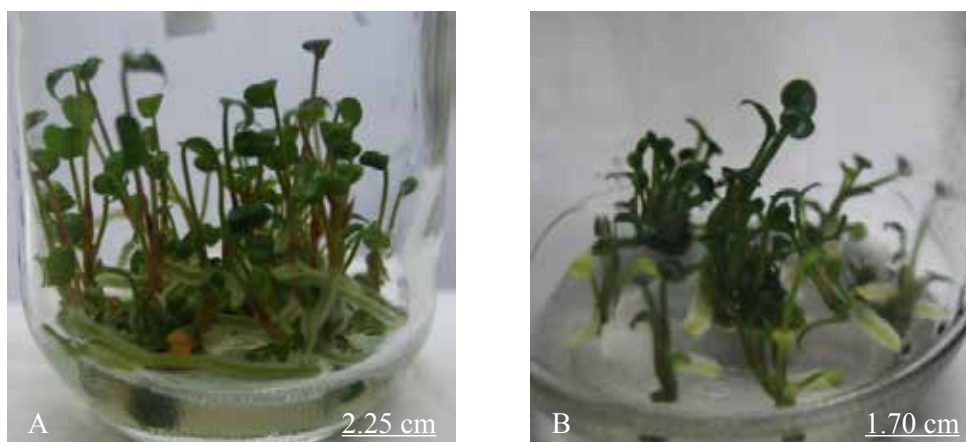
Penggunaan arang aktif pada media pengakaran memberikan pengaruh yang positif terhadap peningkatan kualitas akar. Kondisi medium yang gelap akibat pemberian arang aktif menyebabkan akar tumbuh ke arah bawah, menembus medium (Gambar 1A) dan memiliki ujung akar yang aktif tumbuh lebih panjang (Gambar 1B). MP-7 yang mengandung 1% arang aktif paling sesuai untuk pembentukan jumlah dan kualitas akar yang terbaik.

Studi Pembentukan Akar Tunas Haploid Hasil Kultur Anter Anthurium

Pembentukan akar pada tunas haploid berlangsung lebih lambat dibanding tunas lain hasil dari kultur anter Anthurium (tunas diploid dan triploid yang

tumbuh lebih baik dengan jumlah dan ukuran batang dan daunnya). Akar yang dihasilkan pun berada pada jumlah yang lebih sedikit. Pembentukan akar mulai terlihat 2,5 bulan setelah kultur inisiasi, sementara tunas lain hasil kultur anter Anthurium mulai 1,5 bulan setelah kultur. Akar tumbuh lambat, dengan panjang akar yang hanya mencapai 0,5–1,0 cm. Jika jumlah akar diploid berkisar antara 2–6 akar per tunas dengan 3,9 akar rerata per tunas (MPH-3d), sedangkan pada tunas haploid hanya berkisar antara 1–4 akar dengan 2,5 rerata per tunas (MPH-1).

Media pengakaran berpengaruh nyata terhadap pembentukan akar pada tunas haploid. MPH-1 merupakan medium yang paling sesuai untuk pembentukan akar. Medium tersebut mampu



Gambar 2. Pembentukan akar tunas haploid pada MPH-3d dan MPH-1. (A) akar tunas diploid pada MPH-3d dan (B) akar tunas haploid pada MPH-1 (*Root formation on haploid shoots on MPH-3d and MPH-1 medium. (A) roots of diploid shoots on MPH-3d and (B) roots of haploid shoots on MPH-1*)



Gambar 3. Pertumbuhan tanaman haploid setelah aklimatisasi, (A) 10 hari setelah aklimatisasi, penguningan ditepi daun mulai terlihat, (B) 1 bulan setelah aklimatisasi, seluruh daun menguning dan berubah menjadi coklat dan busuk, dan (C) 1 bulan setengah setelah aklimatisasi, seluruh daun telah luruh dan tinggal sisa tangkai dan batang yang terus membusuk dan akhirnya mati (*Growth of haploid plant after acclimatization, (A) 10 days after acclimatization, yellowing the edge of leaves was observed initially, (B) 1 month after acclimatization complete yellowing leaf occurred, changed to brown and rot, and (C) 1 and half month after acclimatization, all leaves were fall and left leaf petiole and stem that were continually to rot and then die*)

membentuk akar hingga 2,5 akar per tunas (Grafik 2 dan Gambar 2B). MPH-3d mampu membentuk akar lebih banyak hingga 3,9 akar per tunas pada tunas diploid (Gambar 2A), namun tidak mampu menginduksi pembentukan akar yang maksimal pada tunas haploid (MPH-3h). Media lain memberikan hasil yang lebih rendah, bahkan pada MPH-4 tidak terdapat pembentukan akar.

Hasil percobaan kedua juga menunjukkan bahwa perbedaan level ploidi tunas hasil kultur anter *Anthurium* memberikan respons pembentukan akar yang berbeda. Medium yang maksimal untuk satu jenis tunas, tidak selalu memberikan hasil yang maksimal juga pada jenis tunas yang lain. Tunas-tunas haploid umumnya memberikan respons pembentukan akar lama dan pertumbuhan yang lambat dengan jumlah akar yang sedikit.

Studi Penggandaan Kromosom

Penggunaan kolkisin berpengaruh terhadap keberhasilan penggandaan kromosom planlet haploid hasil kultur anter *Anthurium* dan pertumbuhannya. Sebagian tanaman yang diberi perlakuan mengalami perubahan jumlah kromosomnya. Tanaman berubah dari haploid menjadi haploid ganda/dihaploid dan triploid dengan variasi keberhasilan. Aplikasi kolkisin juga menyebabkan terjadinya kematian planlet. Kematian tersebut berkisar 8–44% dengan nilai rerata mencapai 22%. Planlet yang gagal tumbuh ditandai dengan munculnya penguningan di tepi daun (Gambar 3A). Daun kemudian menguning, selanjutnya berubah menjadi coklat yang diikuti dengan pembusukan (Gambar 3B) dan akhirnya mati (Gambar 3C).

Tabel 3. Rasio ploidi hasil perlakuan konsentrasi kolkisin yang berbeda pada planlet haploid (*Ploidy ratio derived from different concentration treatments of colchicine on haploid plantlets*)

Konsentrasi kolkisin (Concentration of colchicine), %	Jumlah tanaman hidup (Survive plants)	Persentase kematian (Percentage of mortality), %	Variasi ploidi tanaman (Varied plant ploidy)			PTHG (%)	PPK (%)
			Haploid	HG	Triploid		
0,05	17,7 ab	29,3 ab	12,7 a	4,7 c	0,0 c	26,1 c	26,1 d
0,1	18,7 a	25,3 b	8,0 b	10,7 b	0,0 c	57,2 b	57,2 c
0,25	19,3 a	22,7 b	3,7 c	13,3 a	2,0 b	68,9 a	79,2
0,5	16,7 b	33,3 a	0,0 d	10,3 b	6,3 a	61,8 ab	100,0
KK (CV) %	4,78	12,52	9,87	10,39	13,63	9,75	7,29

HG = haploid ganda (*double haploid*), PTHG = persentase tanaman haploid ganda (*percentage of double haploid plants*), PPK = persentase penggandaan kromosom (*percentage of chromosome doubling*)

Tabel 4. Rasio ploidi hasil perlakuan 0,05% kolkisin pada waktu perendaman yang berbeda (*Ploidy ratio derived from 0.05% colchicine treatment on different dipping periods*)

Periode perendaman (<i>Dipping period</i>)	Jumlah tanaman hidup (<i>Survive plants</i>)	Persentase kematian (<i>Percentage of mortality</i>), %	Variasi ploidi tanaman (<i>Varied plant ploidy</i>)			PTHG (%)	PPK (%)
			Haploid	HG	Triploid		
0 jam (<i>Hour</i>)	22,0 a	12,0 c	22,0 a	0,0 e	0	0,0 e	0,0 e
24 jam (<i>Hour</i>)	19,7 b	21,3 b	19,7 ab	0,0 e	0	0,0 e	0,0 e
3 hari (<i>Days</i>)	18,0 b	28,0 b	15,3 b	2,7 d	0	14,8 d	14,8 d
5 hari (<i>Days</i>)	21,3 a	14,7 c	11,3 c	5,3 c	0	25,1 c	25,1 c
7 hari (<i>Days</i>)	19,3 b	22,7 b	11,3 c	8,0 b	0	43,7 b	43,7 b
10 hari (<i>Days</i>)	16,0 c	36,0 a	4,0 d	13,0 a	0	81,3 a	81,3 a
KK (<i>CV</i>), %	4,58	15,82	11,91	14,62	-	13,30	13,30

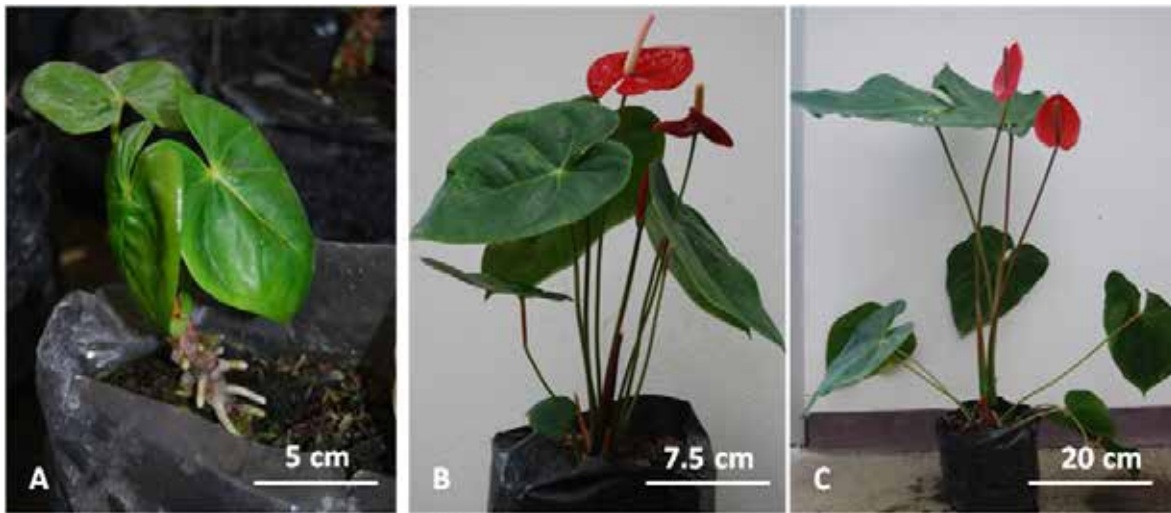
Variasi konsentrasi kolkisin memberikan pengaruh yang nyata terhadap penggandaan kromosom. Semakin besar konsentrasi kolkisin, maka semakin besar peluang terjadinya penggandaan kromosom. Pada konsentrasi 0,5% yang diaplikasikan selama 7 hari, seluruh planlet mengganda kromosomnya (Tabel 3). Tetapi berdasarkan tujuan yang ingin dicapai, yaitu mendapatkan tanaman haploid ganda, maka konsentrasi 0,25% merupakan konsentrasi yang maksimal dalam mendapatkan tanaman haploid

ganda. Perlakuan ini mampu menghasilkan tanaman haploid ganda hingga 68,9% atau 13 tanaman dari 19,3 tanaman yang berhasil tetap hidup. Sementara kolkisin pada konsentrasi tinggi menghasilkan tanaman dengan kromosom mengganda hingga membentuk tanaman triploid, yang jumlahnya mencapai 6,3 tanaman.

Sementara waktu aplikasi kolkisin 0,05% yang berbeda memberikan pengaruh yang lebih rendah dalam penggandaan kromosom. Makin lama periode perendaman planlet haploid dalam kolkisin, makin



Gambar 4. Respons pertumbuhan tanaman akibat perlakuan kolkisin. Panah kuning ialah tanaman yang mengalami penggandaan kromosom. Panah putih ialah tanaman yang tetap haploid, yang sebagian mati (*Plant growth response derived from colchicine treatment. Yellow arrows are plants overcoming chromosome doubling. White arrows are plants keeping in haploid condition and some of them death due to colchicine treatment*)



Gambar 5. Variasi penampilan tanaman hasil penggandaan kromosom. A. Tanaman haploid, B. Tanaman haploid ganda, C. Tanaman triploid. (Varied plant performance derived from chromosome doubling. A. Haploid plant, B. Double haploid plant, and C. Triploid plant)

tinggi keberhasilan penggandaan kromosomnya. Meskipun periode perendaman yang optimal belum ditemukan, namun periode perendaman planlet dalam 0,05% kolkisin selama 10 hari merupakan periode perendaman terbaik dan menghasilkan penggandaan kromosom yang tertinggi. Perlakuan ini mampu menghasilkan tanaman haploid ganda hingga 81,3% atau 13 tanaman dan nilai tersebut juga berbeda nyata dibanding perlakuan yang lain (Tabel 4).

Tanaman yang tetap dalam kondisi haploid umumnya memiliki pertumbuhan yang terhambat, tidak normal, dan mudah mati (Gambar 4, panah putih). Sementara tanaman yang mengganda kromosomnya memiliki pertumbuhan yang sehat, vigor dengan ukuran yang lebih besar (Gambar 4, panah kuning). Hasil ini menunjukkan bahwa keterbatasan daya tumbuh dan adaptasi tanaman haploid berubah saat kromosom yang ada di dalam selnya mengganda. Selanjutnya tanaman haploid yang mengganda membentuk tanaman haploid ganda (Gambar 5B) maupun tanaman triploid (Gambar 5C) dapat tumbuh dengan baik dan berbunga. Tanaman triploid yang dihasilkan umumnya memiliki pertumbuhan dan penampilan yang lebih besar, lebih tinggi, dan vigor. Sementara tanaman haploid yang mampu tumbuh dan membesar umumnya tumbuh kurang bagus dengan perakaran yang tidak tumbuh maksimal dan tidak berbunga (Gambar 5A).

Secara keseluruhan penelitian ini menghasilkan komponen teknologi penyiapan akar berkualitas dan penggandaan kromosom yang optimal untuk tunas dan planlet hasil kultur anter *Anthurium* berhasil dikembangkan. Pada penyiapan akar berkualitas yang sesuai untuk uji kromosom dipengaruhi oleh

penggunaan arang aktif, media, dan jenis hormon. Sementara penggandaan kromosom dipengaruhi oleh konsentrasi dan periode perendaman kolkisin.

Penambahan arang aktif dalam medium kultur memiliki beberapa manfaat terkait dengan respons pertumbuhan eksplan yang dikultur. Menurut van Winkle & Pullman (1995) arang aktif tidak hanya memperbaiki kualitas dan kesegaran tanaman, tetapi juga meningkatkan kemampuan hidup, pertumbuhan eksplan/tanaman, dan berat basah eksplan (Moraes *et al.* 2003, 2005, Idris *et al.* 2006, Pacek-Bieniek *et al.* 2010, Benmahiouel *et al.* 2012, Bodhipadma *et al.* 2011, de Santana *et al.* 2011). Manfaat positif arang aktif dalam morfogenesis terutama berkaitan erat dengan pertumbuhan jumlah dan pembentukan akar (de Faria *et al.* 2002, Prizão *et al.* 2012, Widiastoety *et al.* 2012), kemampuannya menjaga keseimbangan pH medium (Wann *et al.* 1997, Pan & Staden 1999), menyerap senyawa-senyawa penghambat dan menurunkan metabolit yang bersifat racun, seperti fenol yang menjadi penyebab terjadinya pencoklatan eksplan (Idris *et al.* 2006, Thomas 2008). Meskipun di sisi lain arang aktif juga menyebabkan reduksi penyerapan mikro elemen medium, khususnya ion Cu dan Zn karena diserap oleh bahan ini.

Penggunaan arang aktif dalam pembentukan akar pada tunas hasil kultur anter *Anthurium* tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap jumlah akar yang dihasilkan. Arang aktif tersebut memberikan pengaruh yang nyata terhadap kualitas akar yang dihasilkan, seperti yang juga dilaporkan pada *Picea abies* (van Winkle & Pullman 1995). Penggunaan arang aktif (8 g/l) yang dikombinasikan dengan 30 g/l sukrosa dan 1,5 g/l fitagel meningkatkan

kecepatan pembentukan akar pada *Anthurium* hingga 93,3% dengan 3,0 akar per tunas dan 11,7 mm rerata panjang akar (Keatmetha & Suksa-Ard 2004), 11 akar dihasilkan dalam waktu 29 hari pada medium MS yang ditambah 0,5 mg/l IAA dan 2 g/l arang aktif (Gantait *et al.* 2008), 98% tunas berakar pada medium ½ MS yang ditambah 1 mg/l IBA dan 0,04% arang aktif (Atak & Çelik 2009). Seratus persen pengakaran *Lilium morfolongi* berhasil diinduksi pada medium MS yang mengandung 0,5 g/l arang aktif dan 0,25 mg/l NAA (Thão *et al.* 2006). Pada pengakaran *Dendrobium*, aplikasi 2 g/l arang aktif menginduksi pembentukan akar hingga 4,6 akar per tunas dengan 8,6 cm rerata panjang akar (Widiastoety *et al.* 2012), 15,4 akar per tunas pada *Cattleya walkeriana* (de Faria *et al.* 2002), sementara aplikasi hingga 6 g/l arang aktif menstimulasi pembentukan akar pada *Cattleya bicolor* hingga 7,7 akar per tunas (Prizao *et al.* 2012). Pada percobaan ini 1% arang aktif yang ditambahkan pada MP-7 menginduksi pembentukan akar hingga 4,5 akar per tunas dan 83% akarnya sesuai untuk pewarnaan kromosom. Hasil ini memperbaiki hasil penelitian sebelumnya (Rachmawati 2005), dimana sebagian besar akar memiliki kualitas yang rendah untuk pewarnaan kromosom.

Pemberian hormon sangat berpengaruh terhadap pembentukan akar. Hormon dari kelompok auksin (IAA, NAA, dan IBA) pada konsentrasi yang bervariasi diketahui memiliki pengaruh yang besar dalam pembentukan akar. Pada *Anthurium*, pemberian hormon untuk pembentukan akar juga dilaporkan oleh Kuehnle *et al.* (1992) dan Martin *et al.* (2003) menggunakan medium MS yang mengandung 0,2 mg/l BA dan 2% sukrosa. Hamidah *et al.* (1997) memodifikasi medium MS dengan menambah 4,5 µM 2,4-D, dengan/atau tanpa 0,44 µM BA, medium Nitsch yang mengandung 1,0 mg/l IBA dan 0,04% arang aktif (Puchoo & Sookun 2003), medium ½ MS yang ditambah dengan 0,54 µM NAA dan 0,93 µM Kin (Martin *et al.* 2003), medium MS ditambah 5,71 µM NAA dan medium cairnya menginduksi pembentukan akar hingga 6,5 akar per tunas (de Lima *et al.* 2006), medium ½ MS yang ditambah dengan 1,0 mg/l IBA (Jahan *et al.* 2009), pada tunas kultur anter *Anthurium*, terutama tunas diploid dan triploid, aplikasi hormon untuk induksi pengakaran tunas tidak diperlukan dan tunas mudah berakar pada MP-7 (WT tanpa hormon). Hasil menunjukkan bahwa pemanfaatan hormon untuk pembentukan akar pada tunas-tunas tersebut tidak mutlak diperlukan.

Hasil yang berbeda terlihat pada tunas haploid. Enam media pengakaran diuji, tetapi sebagian besar media tidak sesuai untuk pembentukan akar. MPH-

3 yang sesuai untuk tunas diploid/triploid, tidak memberikan hasil yang baik pada tunas haploid. Tunas tidak menunjukkan pertumbuhan dan perkembangan yang baik. Hasil penelitian ini juga makin memberi bukti bahwa eksplan haploid memiliki respons pertumbuhan dan perkembangan yang rendah, baik pada level *in vitro* maupun *ex vitro*. Selanjutnya MPH-1 (medium MS yang mengandung 0,2 mg/l BAP dan 0,02 mg/l NAA) merupakan medium yang paling sesuai untuk pengakaran *in vitro* tunas haploid. Ini berarti penambahan hormon pada medium sangat dibutuhkan untuk pengakaran tunas haploid. Ini juga berarti bahwa penggunaan hormon dalam medium yang berpengaruh besar terhadap pengakaran *Anthurium* secara *in vitro* seperti yang dilaporkan oleh Kuehnle *et al.* (1992), Chen *et al.* (1997), Hamidah *et al.* (1997), Martin *et al.* (2003), Rachmawati (2005), de Lima *et al.* (2006), dan Jahan *et al.* (2009) juga berpengaruh besar terhadap pengakaran tunas haploid hasil kultur anter *Anthurium*.

Akar yang terinduksi pada dua percobaan umumnya ialah akar lateral yang tumbuh dari ketiak daun. Akar ini memiliki bulu akar yang banyak dengan titik tumbuh ujung akar yang terbatas. Ketika akar ini tumbuh menembus medium, bulu akar menurun jumlahnya dan beberapa bagian pucuknya tidak aktif tumbuh lagi pada ukuran tertentu. Menurut Keatmetha & Suksa-Ard (2004) akar tersebut tidak dapat berfungsi secara maksimal untuk menunjang pertumbuhan tunas. Tetapi pemberian 1% arang aktif terlihat mengubah kondisi dan pertumbuhan akar udara menjadi akar yang sesuai untuk pewarnaan kromosom dan meningkatkan kualitasnya (Gantait *et al.* 2008, Atak & Çelik 2009, Jahan *et al.* 2009).

Kondisi haploid merupakan kondisi yang rentan terhadap berbagai perlakuan eksternal yang diaplikasikan maupun kondisi *ex vitro* di sekitarnya. Tanaman haploid *Anthurium* memiliki kemampuan tumbuh dan adaptasi yang rendah. Daun tanaman mudah menguning, kecoklatan, busuk, dan akhirnya mati. Selain karena kondisi yang haploid, kematian tanaman haploid *Anthurium* pada percobaan penggandaan kromosom ini diduga dipengaruhi oleh pemberian kolkisin. Kematian dan kerusakan tanaman akibat perlakuan kolkisin juga dilaporkan pada kubis Brussel (Currah & Ockendon 1987). Kolkisin bersifat toksik (Petersen *et al.* 2003), menyebabkan terjadinya penurunan viabilitas, penundaan pembelahan, dan pertumbuhan sel-sel tanaman (Zeng *et al.* 2006).

Konsentrasi dan waktu aplikasi kolkisin berpengaruh terhadap keberhasilan penggandaan kromosom. Setiap tanaman memerlukan konsentrasi dan waktu aplikasi kolkisin yang berbeda. Konsentrasi kolkisin 0,25% yang diaplikasikan selama 7 hari sesuai untuk

mendapatkan tanaman haploid ganda pada persentase yang tinggi mencapai 68,9% atau 13,3 tanaman (Tabel 3). Sementara konsentrasi kolkisin 0,05% yang diaplikasikan selama 10 hari persentase tanaman haploid ganda mencapai 81,3% atau 13 tanaman (Tabel 4). Konsentrasi dan waktu tersebut merupakan konsentrasi dan waktu aplikasi yang sesuai untuk *Anthurium*. Persentase keberhasilan, konsentrasi, dan waktu aplikasi kolkisin yang berbeda juga dilaporkan pada tanaman lain. Pada *Capsicum annuum*, aplikasi 0,5% kolkisin 3 dalam 1 hari menghasilkan 28,6% atau dua tanaman haploid ganda (Luitel & Kang 2012). Aplikasi 0,2% kolkisin selama 7 jam menghasilkan tanaman haploid ganda hingga 42,3% (8,7 tanaman) pada tembakau (Burun & Emiroglu 2008). Pada kubis keberhasilan penggandaan mencapai 88% (45 tanaman) dengan 500 mg/l kolkisin yang diaplikasikan selama 15 jam (Zhao *et al.* 2002), 66,6% (9 tanaman) diperoleh dengan 500 mg/l kolkisin yang diaplikasikan selama 36 jam (Mohammadi *et al.* 2012), dan 30,7% (23 tanaman) melon dengan 0,5% kolkisin selama 2 jam (Solmaz *et al.* 2011).

Variasi ploidi yang dihasilkan dalam kegiatan penggandaan kromosom menjadi indikator keberhasilan aplikasi kolkisin pada berbagai konsentrasi dan waktu aplikasinya. Pada tunas haploid hasil kultur anter *Anthurium*, aplikasi kolkisin menghasilkan 40 tanaman haploid ganda dan delapan triploid dengan 0,25% kolkisin yang diaplikasikan selama 7 hari. Sementara aplikasi 0,05% kolkisin selama 10 hari hanya menghasilkan 29 tanaman haploid ganda. Pada kubis aplikasi 500 mg/l kolkisin selama 15 jam menghasilkan 45 tanaman haploid ganda dan tiga tanaman triploid/tetraploid (Zhao *et al.* 2002), 123 tanaman haploid ganda dengan 0,05% selama 5 hari (Klima *et al.* 2008), 44 tanaman tetraploid pada *Echinacea purpurea* dengan 120 mg/l kolkisin selama 28 hari (Nilanthi *et al.* 2009). Selanjutnya pada tembakau aplikasi 0,2% kolkisin selama 48 jam menghasilkan variasi ploidi tanaman dengan 20 tanaman haploid, 33 haploid ganda, 6,6 triploid, 23 aneuploid dan 6,6 mixoploid (Burun & Emiroglu 2008), 15 $\mu\text{mol/mol}$ kolkisin selama 2 hari menghasilkan 8% (4 tanaman) tetraploid pada *Torenia fournieri* (Jiranapapan *et al.* 2011).

Perlakuan kolkisin memengaruhi pertumbuhan dan perubahan penampilan tanaman. Tanaman menjadi lebih segar, vigor, berdaun lebih besar, dan tebal dengan ukuran tanaman yang lebih besar. Perubahan-perubahan morfologi ini, baik yang berdampak positif maupun negatif, juga dilaporkan pada penelitian lain. Pada *Crocus sativus*, perlakuan kolkisin menyebabkan daun menjadi lebih tebal, ukuran lebih kecil, jumlah daun berkurang, penundaan masa berbunga, jumlah

dan ukuran yang berubah (Zaffar *et al.* 2003). Pembungkus bakal buah yang lebih tebal, bunga dan biji yang lebih besar ditemukan pada lavender (Urwin *et al.* 2007). Tanaman yang lebih pendek, batang yang lebih tebal, dan daun yang lebih lebar ditemukan pada *Lespedeza formosa* (Wei *et al.* 2007). Pertumbuhan yang lebih kompak dan melebar dengan daun yang lebih tebal ditemukan pada *Platanus acerifolia* (Liu *et al.* 2007). Pertumbuhan kubis terhambat dan jumlah biji yang tereduksi ditemukan pada tanaman yang diberi perlakuan kolkisin (Chen *et al.* 1994). Meskipun tidak setiap perubahan morfologi tanaman membawa dampak positif bagi tanaman, tetapi perlakuan kolkisin pada tanaman hasil kultur anter *Anthurium* memberikan dampak yang positif. Tanaman yang tumbuh lebih baik umumnya ialah tanaman yang fertil (Hensen & Andersen 1998) dan telah mengganda kromosomnya.

Perlakuan kolkisin menginduksi terjadinya penggandaan kromosom pada planlet haploid hasil kultur anter *Anthurium*, meskipun hasil yang optimal belum dapat ditunjukkan melalui penelitian ini karena keterbatasan lahan tanaman. Perlakuan kolkisin disamping bersifat racun dan merusak pada beberapa planlet haploid, namun perlakuan tersebut menghasilkan tanaman yang lebih sehat dan vigor dengan ukuran yang lebih besar. Keberhasilan perlakuan terlihat dari jumlah dan pertumbuhan tanaman yang tetap hidup dan variasi ploidi yang ditunjukkan.

KESIMPULAN DAN SARAN

1. MP-7 (medium WT tanpa hormon) yang ditambah dengan 1% arang aktif merupakan medium induksi pembentukan jumlah dan kualitas akar terbaik dengan 4,5 akar per tunas dan 83% nya ialah akar yang sesuai untuk uji kromosom. MPH-1 (medium MS yang ditambah 0,2 mg/l BAP dan 0,02 mg/l NAA) merupakan medium pengakaran yang sesuai untuk induksi pembentukan akar pada tunas haploid dengan 2,5 akar per tunas.
2. Konsentrasi kolkisin 0,25% dengan 7 hari waktu perendaman dan 0,05% dengan 10 hari periode perendaman merupakan perlakuan yang sesuai untuk mendapatkan tanaman haploid ganda dengan persentase yang tinggi masing-masing 80 dan 76,5%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Euis Rohayati dan Dedi Rusnandi yang telah

membantu dalam penyiapan media di laboratorium dan pemeliharaan tanaman di rumah kaca selama percobaan berlangsung.

PUSTAKA

1. Aswath, C & Biswas, B 1999, 'Anthurium', in Biotechnology of Horticultural Crops, Parthasarathy, VA, Bose, TK, Das, P (eds.), Naya Prokash, India, vol. 3, pp. 198-213.
2. Atak, C & Celik, O 2009, 'Micropropagation of *Anthurium andraeanum* from leaf explants', *Pak. J. Bot.*, vol. 41, pp. 1155-61.
3. Benmahioul, B, Kaïd-Harche, M, & Daguin, F 2012, 'Influence of activated charcoal on *in vitro* embryo germination and growth of planlets of Pistachio (*Pistacia vera* L.)', *I.J.S.N.*, vol. 3, no. 3, pp. 613-6.
4. Bodhipadma, K, Noichinda, S, Wachirabongkoth, P, Pukpoomin, E, Punnakanta, L & Nathalang, K 2011, 'In vitro propagation of *Nymphaea nouchali* var. *versicolor* Bua Phuean', *J. App. Sci.*, vol. 10, no. 2, pp.7-11.
5. Burun, B & Emiroglu, U 2008, 'A comparative study on colchicine application methods in obtaining doubled haploids of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)', *Turk. J. Biol.*, vol. 32, pp. 105-11.
6. Campion, BE, Perri, MT, Azzimonti, Vicini, E & Schiavi, M 1995, 'Spontaneous and induced chromosome doubling in gynogenic lines of onion (*Allium cepa* L.)', *Plant Breed.*, vol. 114, no.3, pp. 243-46.
7. Cavallini, A & Lupi, MC 2006, 'Cytological study of callus and regenerated plants of sunflower (*Helianthus annuus* L.)', *Plant Breed.*, vol. 99, pp. 203-38.
8. Chauvin, JE, Souchet, C, Dantec, JP & Ellissèche, D 2003, 'Chromosome doubling of 2x *Solanum* species by oryzalin: method development and comparison with spontaneous chromosome doubling *in vitro*', *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, vol. 73, no. 1, pp. 65-73.
9. Chen, FC, Kuehnle, AR & Sugii, N 1997, '*Anthurium* roots for micropropagation and *Agrobacterium* mediated gene transfer', *Plant Cell, Tiss. Organ Cult.*, vol. 49, pp. 71-4.
10. Chen, ZZ, Snyder, S, Fan, ZG & Loh, WH 1994, 'Efficient production of doubled haploid plants through chromosome doubling of isolated microspores in *Brassica napus*', *Plant Breed.*, vol. 113, no. 3, pp. 217-21.
11. Corredor, E & Naranjo, T 2007, 'Effect of colchicine and telocentric chromosome conformation on centromere and telomere dynamics at meiotic prophase I in wheat-rye additions', *Chrom. Res.*, vol. 15, no. 2, pp. 231-45.
12. Currah, L & Ockendon, DJ 1987, 'Chromosome doubling of mature haploid Brussels sprout plants by colchicine treatment', *Euphytica*, vol. 36, no. 1, pp. 167-73.
13. de Faria, RT, Santiago, DC, Saridakis, DP, Albino, UB & Araújo, R 2002, 'Preservation of the brazilian orchid *Cattleya walkeriana* Gardner using *in vitro* propagation', *Crop Breed. App. Biotechnol.*, vol. 2, no 3, p. 489-92.
14. de Lima, FC, Ulisses, C, Camara, TR, Cavalvante, UMT, Albuquerque, CC & Willadino, L 2006, '*Anthurium andraeanum* Lindl. cv. Eidibel *in vitro* rooting and acclimatization with arbuscular mycorrhizal fungi', *AGRARIA, Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, vol. 1, pp. 13-6.
15. de Santana, JRF, Paiva, R, de Souza, AV & de Oliveira, LM 2011, 'Effect of different culture tube caps and concentrations of activated charcoal and sucrose on *in vitro* growth and budding induction of *Annona glabra* L. *Ciênc., Agrotec., Lavras*, vol. 35, no. 5, pp. 916-23.
16. Gantait, S, Mandal, N, Bhattacharyya, S & Das, PK 2008, '*In vitro* mass multiplication with pure genetic identity in *Anthurium andraeanum* Lindl', *Plant Tiss. Cult Biotech.*, vol. 18, pp.113-22.
17. Geier, T 1986, 'Factor affecting plant regeneration from leaf segments of *Anthurium scherzerianum* Schott (*Araceae*) cultured *in vitro*', *Plant Cell, Tiss. Organ Cult.*, vol. 6, pp. 115-25.
18. Geier, T 1990, 'Anthurium', in: Aminirato, PV, Evans, DA, Sharp, WR, Bajaj, YPS (eds.), Handbook of Plant Cell Culture, Ornamental Species, McGraw-Hill, New York. vol. 5, pp. 228-52,
19. Gu, HH, Zhou, WJ & Hagberg, P 2003, 'High frequency spontaneous production of doubled haploid plants in microspore cultures of *Brassica rapa* ssp. *Chinensis*', *Euphytica*, vol. 134, pp. 239-45.
20. Hamidah, M, Karim, AGA & Debergh, P 1997, 'Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium scherzerianum*', *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, vol. 48, pp. 189-93.
21. Han, DS, Niimi, Y & Nakano, M 1997, 'Regeneration of haploid plants from anther cultures of the Asiatic Irbid lily connecticut king', *Plant. Cell. Tiss Organ. Cult.*, vol. 47, pp. 153-8.
22. Hansen, NJP & Andersen, SB 1998, '*In vitro* chromosome doubling with colchicine during microspore culture in wheat (*Triticum aestivum* L.)', *Euphytica*, vol. 102, no. 1, pp. 101-8.
23. Hensen, NJP & Andersen SB 2006, 'Efficient production of doubled haploid wheat plants by *in vitro* treatment of microspores with trifluralin or APM', *Plant Breed.*, vol. 117, no. 5, pp. 401-5.
24. Hamidah, M, Karim, AGA & Debergh, P 1997, 'Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium scherzerianum*', *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, vol. 48, pp. 189-93.
25. Idris, TIM, Mahdi, EFM & Said, AE 2006, 'Enhancement of growth and control of browning of tissue cultures of guava (*Psidium guajava* L.)', *J. Sci. Tech.*, vol. 7, no. 1, pp. 1-10
26. Ishimori, T & Niimi, Y 2004, 'Similar effects of colchicine and low temperature on initiation and elongation of stems in bulblets developed on scales of 'white aga' (*Lilium x formolongi*) cultured *in vitro*', *ISHS Acta Horticulturae 673: IX International Symposium on Flower Bulbs*, viewed 8 July 2009, < www.actahort.org/members/showpdf?booknrarmr=673_51>.
27. Ishizaka, H 1998, 'Production of microspore-derived plants by anther culture of an interspecific F1 hybrid between *Cyclamen persicum* and *C. purpurascens*', *Plant Cell, Tiss. Organ Cult.*, vol. 54, pp. 21-8.
28. Jiranapapan, J, Kikuchi, S, Manochai, B, Taychasinpitak, T, Tanaka, H & Tsujimoto, H 2011, 'A simple method of chromosome doubling using colchicine in *Torenia* (Linderniaceae), and the behavior of meiotic chromosomes in amphidiploids', *Chrom. Sci.*, vol. 14, pp. 29-32.

29. Jahan, MT, Islam, MR, Khan, R, Mamun, ANK, Ahmed, G & Hakim, L 2009, 'In vitro clonal propagation of Anthurium (*Anthurium andraeanum* L.) using callus culture', *Plant Tiss. Cult. Biotech.*, vol. 19, pp. 61-9.
30. Joseph, D, Martin, KP, Madassery, J & Philip, VJ 2003, 'In vitro propagation of three commercial cut flower cultivars of *Anthurium andraeanum* L. Hort.', *Indian J. Exp. Biol.*, vol. 41, pp. 154-9.
31. Kahrizi, D & Mohammadi, R 2009, 'Study of androgenesis and spontaneous chromosome doubling in barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes using isolated microspore culture', *Acta Agron. Hungarica*, vol. 57, no. 2, pp. 155-64.
32. Keatmetha, W & Suksa-Ard, P 2004, 'Effects of rooting substrates on in vitro rooting of *Anthurium andraeanum* L. cv. Avanti', *Walailak J. Sci & Tech.*, vol. 1, no.2, pp. 49-55.
33. Klíma, M, Vyvadilová, M & Kučera, V 2008, 'Chromosome doubling effects of selected antimetabolic agents in *Brassica napus* microspore culture', *Czech J. Genet. Plant Breed.*, vol. 44, no. 1, pp. 30-6.
34. Kuehnle, AR, Chen, FC & Sugii, N 1992, 'Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium andraeanum* L. hybrids', *Plant Cell Rep.*, vol. 11, pp. 438-42.
35. Kuehnle, AR & Sugii, N 1991, 'Callus induction and plantlet regeneration in tissue cultures of Hawaiian Anthuriums', *HortSci.*, vol. 26, no. 7, pp. 919-21.
36. Laura, M, Safaverdi, G & Allavena, A 2006, 'Androgenetic plants of *Anemone coronaria* derived through anther culture', *Plant Breed.*, vol. 125, no. 6, pp. 629-34.
37. Luitel, BP & Kang, WH 2012, 'In-vivo chromosome doubling with colchicine in haploid plants of minipaprika (*Capsicum annuum* L.)', *J. Agric. Life Env. Sci.*, vol. 24, no.3, pp. 1-8.
38. Liu, G, Li, Z & Bao, M 2007, 'Colchicine-induced chromosome doubling in *Platanus acerifolia* and its effect on plant morphology', *Euphytica*, vol.157, no.1-2, pp. 145-54.
39. Nilanthi, D, Chen, XL, Zhao, FC, Yang, YS & Wu, H 2009, 'Induction of tetraploids from petiole explants through colchicine treatments in *Echinacea purpurea* L.', *J. Biomed. Biotech.* Article ID 343485, 7 pp.
40. Martin, KP, Joseph, D, Madassery, J & Philip, VJ 2003, 'Direct shoot regeneration from lamina explants of two commercial cut flower cultivars of *Anthurium andraeanum* L. Hort.', *In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant.*, vol. 39, no. 5, pp. 500-04.
41. Mattjik, AA & Sumertajaya, IM 2006, *Experimental design with application of SAS and minitab*, IPB Press, Bogor.
42. Mohammadi, PP, Moieni, Ebrahimi, A & Javadfar, F 2012, 'Doubled haploid plants following colchicine treatment of microspore-derived embryos of oilseed rape (*Brassica napus* L.)', *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, vol. 108, no. 2, pp. 251-6.
43. Moraes, LM, Faria, RT & Cuquel, FL 2003, 'Activated charcoal for in vitro propagation of brazilian orchids', *ISHS Acta Horticulturae 683: V International Symposium on New Floricultural Crops*, viewed 14 July 2009, <www.actahort.org/members/showpdfbooknrnr=683_50>.
44. Moraes, L, de Faria, RT & Cuquel, FL 2005, 'Activated charcoal for in vitro propagation of brazilian orchids', *Acta Hort.*, vol. 683, pp. 1-10
45. Murashige, T & Skoog, F, 1962, 'A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures', *Physiol. Plant.*, vol. 15, pp. 473-97.
46. Ockendon, DJ 2008, 'The ploidy of plants obtained from anther culture of cauliflowers (*Brassica oleracea* var. botrytis)', *Ann. App. Biol.*, vol. 113, no. 2, pp. 319-25.
47. Pacek-Bieniek, A, Dydach-Siemińska, M & Rudaś, M 2010, 'Influence of activated charcoal on seed germination and seedling development by the asymbiotic method in *Zygostates grandiflora* (Lindl.) Mansf. (Orchidaceae)', *Folia Hort. Ann.*, vol. 22, no. 2, pp. 45-50.
48. Pan, MJ & Staden, JV 1999, 'Effect of activated charcoal, autoclaving and culture media on sucrose hydrolysis', *Plant Growth Regul.*, vol. 29, no. 3, pp. 135-41.
49. Petersen, KK, Hagberg, P & Kristiansen, K 2003, 'Colchicine and oryzalin mediated chromosome doubling in different genotypes of *Miscanthus sinensis*', *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, vol. 73, no. 2, pp.137-46.
50. Prizao, EC, de Menezes Goncalves, L, Gutierrez, MAM, Mangolin, CA & da Silva Machado, MFP 2012, 'Activated charcoal and graphite for the micropropagation of *Cattleya bicolor* Lindl. and an orchid double-hybrid 'BLC Pastoral Innocence'', *Acta Sci. Maringa*, vol. 34, no. 2, pp. 157-61.
51. Puchooa, D & Sookun, D 2003, 'Induced mutation and in vitro culture of *Anthurium andraeanum*', AMAS, Food and Agricultural Research Council, Reduit, Mauritius, pp. 17-27.
52. Rachmawati, F 2005, 'Kultur Anter pada Anthurium (*Anthurium andraeanum* Linden ex André)', Thesis, Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
53. Ramulu, KS, Verhoeven, HA & Dijkhuis, P 1991, 'Mitotic blocking, micronucleation, and chromosome doubling by oryzalin, amiprofos-methyl, and colchicine in potato', *Protoplasma*, vol 160, no. 2-3, pp.65-71.
54. Rey, HY, Sansberro, PA, Collavino, MM, Daviña, JR, Gonzalez, AM & Mroginski, LA 2002, 'Colchicine, trifluralin, and oryzalin promoted development of somatic embryos in *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae)', *Euphytica*, vol. 123, no. 1, pp. 49-56.
55. Saji, KV & Sujatha, M 1998, 'Embryogenesis and plant regeneration in anther culture of sunflower (*Helianthus annuus* L.)', *Euphytica*, vol. 103, pp.1-7.
56. Sharma, AK & Sharma, A 1994, *Chromosome techniques – A Manual*, Harwood Academic Publisher, Australia.
57. Solmaz, I, Sari, N, Gürsoy, I & Kasapoglu, S 2011, 'Comparison of in vivo and in vitro colchicine application for production of dihaploid 'Kirkagac' and 'Yuva Hasanbey' Melons', *Afr. J. Biotechnol.*, vol. 10, no. 70, pp. 15717-24.
58. Thao, NTP, Hoang, NQT & Mai, T 2006, 'Rapid propagation of *Lilium formolongi* by in vitro culture technique', *TC Công nghệ sinh học* ., vol. 4, no. 1, pp. 117-23.
59. Thomas, TD 2008, 'The role of activated charcoal in plant tissue culture', *Biotechnol. Adv.*, vol. 26, no. 6, pp. 618-31.
60. Urwin, NAR, Horsnell, J & Moon, T 2007, 'Generation and characterisation of colchicine-induced autotetraploid *Lavandula angustifolia*', *Euphytica.*, vol.156, no.1-2, pp. 257-66.
61. van Winkle, SC & Pullman, GS 1995, 'The role of activated carbon in tissue culture medium', *Res. Energiea.*, vol. 6, no. 6, pp. 1-6.

62. Wang, ZY, Zou, LZ, Fan, BL & Peng, YK 2006, 'Abnormal metaphase cell division induced by microtubules depolymerization and photosystem ii inhibiting herbicides', *Cytologia*, vol. 71, no. 3, pp. 289-95.
63. Wann, SR, Veazey, RL & Kaphammer, J 1997, 'Activated charcoal does not catalyze sucrose hydrolysis in tissue culture media during autoclaving', *Plant Cell, Tiss. Organ Cult.*, vol. 50, no. 3, pp. 221-4.
64. Wei, L, Dong-nan, H, Hui, L & Xiao-yang, C 2007, 'Polyploid induction of *Lespedeza formosa* by colchicine treatment', *Forest. Studies in China*, vol. 9, no. 4, pp. 283-6.
65. Widiastoety, D., Santi, A & Solvia, N 2012, 'Pengaruh myoinositol dan arang aktif terhadap pertumbuhan planlet anggrek *Dendrobium* dalam kultur *in vitro*', *J. Hort.*, vol. 22, no. 3, hlm. 205-9.
66. Winarto, B & Rachmawati, F 2007, 'Teknik kultur anther pada pemuliaan *Anthurium*', *J. Hort.*, vol. 17, no. 2, hlm. 127-37.
67. Winarto, B 2009, 'Androgenesis: a breakthrough effort for preparing haploid or double haploid plants in *Anthurium*', PhD Dissertation, Department of Agronomy and Horticulture, Faculty of Agriculture, Bogor Agriculture Institute.
68. Winarto, B, Mattjik, NA, Purwito, A & Marwoto, B 2010a, 'Improvement of selected induction culture media on callus induction in anther culture of *Anthurium* and a histological study on its callus formation', *J. Nat. Ind.*, vol. 12, pp. 93-101.
69. Winarto, B, Mattjik, NA, Purwito, A & Marwoto, B, 2010b, 'Application of 2,4-D and TDZ in formation and regeneration of callus in anther culture of *Anthurium*', *J. Hort.*, vol. 20, hlm. 1-9.
70. Winarto, B 2011, 'Studi pewarnaan kromosom dan level ploidi eksplan hasil kultur anter *Anthurium*', *J. Hort.*, vol. 21, no. 2, hlm. 113-23.
71. Winarto, B, Rachmawati, F, Pramanik, D & Teixeira da Silva, JA 2011a, 'Morphological and cytological diversity of regenerants derived from *Anthurium* half-anther culture', *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, vol. 105, pp. 375-82.
72. Winarto, B, Rachmawati, F & Teixeira da Silva, JA, 2011b, 'New basal media for half-anther culture of *Anthurium andraeanum* Linden ex Andre' cv. Tropical', *Plant Growth Regul.*, vol. 65, pp. 513-29.
73. Winarto, B & Teixeira da Silva, JA 2012, 'Influence of isolation technique of half-anters and of initiation culture medium on callus induction and regeneration in *Anthurium andraeanum*', *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, vol. 110, no. 3, pp. 401-11.
74. Zaffar, G, Wani, SA, Anjum, T & Zeerak, NA 2003, 'Colchicine induced variability in saffron', *ISHS Acta Horticulturae 650: I International Symposium on Saffron Biology and Biotechnology*, viewed 8 July 2009, <www.actahort.org/books/650/650_31.htm>.
75. Zeng, SH, Chen, CW, Hong, L, Liu, JH & Deng, XX 2006, 'In vitro induction, regeneration and analysis of autotetraploids derived from protoplasts and callus treated with colchicine in *Citrus*', *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, vol. 87, no. 1, pp. 85-93.
76. Zhao, WJ, Tang, GX & Hagberg, P 2002, 'Efficient production of doubled haploid plants by immediate colchicine treatment of isolated microspores in winter *Brassica napus*', *Plant Growth Regul.*, vol. 37, pp. 185-92.
77. Zhao, J & Simmonds, DH 2006, 'Application of trifluralin to embryogenic microspore cultures to generate doubled haploid plants in *Brassica napus*', *Physiol. Plant.*, vol. 95, no. 2, pp.304-9.