

Pengaruh Glutamin dan Serin terhadap Kultur Anter *Anthurium andraeanum* cv. Tropical

Winarto, B.

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

Naskah diterima tanggal 2 Agustus 2011 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 7 Oktober 2011

ABSTRAK. Kultur anter merupakan salah satu teknologi haploid penting dalam produksi tanaman haploid ganda dan berhasil diaplikasikan pada berbagai jenis tanaman, namun aplikasi pada *Anthurium* belum pernah dilaporkan. Penelitian dan pengembangan kultur anter *Anthurium* yang difokuskan untuk mempelajari pengaruh glutamin dan serin terhadap induksi, pertumbuhan, dan regenerasi kalus dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Balai Penelitian Tanaman Hias dari bulan Januari sampai dengan September 2008. Tujuan penelitian ialah mengetahui pengaruh kombinasi konsentrasi glutamin dan serin terhadap induksi, pertumbuhan, dan regenerasi kalus pada kultur anter *Anthurium*. Spadik *Anthurium andraeanum* cv. Tropical, kalus hasil kultur anter serta medium Winarto dan Teixeira digunakan dalam studi ini. Glutamin dan serin pada konsentrasi 0, 250, 500, dan 750 mg/l diuji dalam percobaan ini. Percobaan disusun menggunakan rancangan acak lengkap pola faktorial dengan empat ulangan. Hasil studi menunjukkan bahwa penambahan glutamin dan serin pada medium terseleksi belum memberikan pengaruh yang signifikan terhadap induksi, pertumbuhan, dan regenerasi kalus. Glutamin pada konsentrasi 250 mg/l menginduksi potensi tumbuh anter hingga 48% dengan 21% anter beregenerasi dan 1,3 anter per perlakuan membentuk kalus. Sementara serin pada 500 mg/l merupakan konsentrasi yang paling potensial dalam induksi kalus dengan 55% potensi tumbuh anter, 24% anter beregenerasi, dan 1,4 anter per perlakuan membentuk kalus. Glutamin 250 mg/l merupakan konsentrasi terbaik dibanding konsentrasi yang lain dalam mendukung pertumbuhan dan regenerasi kalus. Perlakuan tersebut tanpa serin mampu menginduksi potensi pertumbuhan kalus hingga 77% dengan volume kalus mencapai 237 mm³ dan empat tunas dihasilkan per eksplan. Sementara perlakuan serin justru mereduksi pertumbuhan dan regenerasi kalus dan menstimulasi senescensi kalus yang berdampak pada pencoklatan dan kematiannya. Dari hasil penelitian ini dapat disarankan penggunaan glutamin dibanding serin dalam meningkatkan keberhasilan kultur anter *Anthurium*.

Katakunci: *Anthurium andraeanum* Linden ex Andre cv. Tropical; Kultur anter; Glutamin; Serin; Kalus; Regenerasi;

ABSTRACT. Winarto, B. 2011. Effect of Glutamine and Serine on Anther Culture of *Anthurium andraeanum* cv. Tropical. Anther culture is one of important haploid technologies in producing double haploid lines and successfully applied in many plants, while the application in *Anthurium* is not reported yet. Research and development in anther culture of *Anthurium* focusing on studying the effect of glutamine and serine on callus induction, growth, and its regeneration was conducted at Tissue Culture Laboratory of Indonesian Ornamental Crops Research Institute from January until September 2008. Objective of this study was to know the effect of glutamine and serine on callus induction, growth, and its regeneration in anther culture of *Anthurium*. Spadix of *Anthurium andraeanum* cv. Tropical, callus derived from anther and Winarto and Teixeira medium were utilized in the study. Glutamine and serine of 0, 250, 500, and 750 mg/l were tested in the experiments. Factorial experiment was arranged by completely randomized design with four replications. Results of the study indicate that addition of glutamine and serine in selected culture medium gave moderate significant effect on induction, growth, and regeneration of callus. Glutamine in 250 mg/l induced potential growth of anther up to 48% with 21% regenerated anthers and 1.3 anthers per treatment producing calli, while 500 mg/l of serine was better concentration in callus formation with 55% potential growth of callus, 24% regenerated anthers and 1.4 anthers per treatment producing calli. In growth and regeneration of callus, supplementation of serine reduced callus capacity in growth and production of shoots and stimulated callus senescence causing browning and death of it, while 250 mg/l glutamine exhibited positive effect on them. The treatment without serine was able to induce potential growth of callus up to 77% with 237 mm³ per callus and four shoots produced per explants. Results of the study suggest application of glutamine rather than serine in improving anther culture of *Anthurium*.

Keywords: *Anthurium andraeanum* cv. Tropical; Anther culture; Glutamine; Serine; Callus; Regeneration.

Asam amino merupakan salah satu faktor penunjang keberhasilan kultur jaringan tanaman (George *et al.* 2007). Bahan ini merupakan salah satu sumber nitrogen yang berperan dalam induksi pembentukan kalus, regenerasi tunas adventif, embriogenesis, dan androgenesis eksplan (Saunders *et al.* 1997, Masaaki *et al.*

2000, Ogita *et al.* 2001, Vasudevan *et al.* 2004, Vasanth *et al.* 2006, Pola *et al.* 2007, Patil *et al.* 2009, Das dan Mandal 2010). Beberapa jenis asam amino seperti alanin, arginin, asparagin, sistein, glutamin, glisin, leusin, isoleusin, lisin, metionin, ornitin, fenilalanin, prolin, serin, treonin, triptofan, tirosin, dan valin (Ogita *et al.*

1997 dan 2001, Ashok-Kumar dan Murthy 2004, Wang *et al.* 2007) telah diaplikasikan dalam embriogenesis pada *Medicago sativa* (Stuart dan Strickland 1984), *Daucus carota* (Kamada dan Harada 1984), *Picea jezoensis* (Ogita *et al.* 1997), *Cryptomeria japonica* (Ogita *et al.* 2001), *Phoenix dactylifera* (Sidky dan Zaid 2011), induksi kalus dan proliferasi tunas pada *Colocasia esculenta* var. *Esulenta* (Yam *et al.* 1991), *Beta vulgaris* (Saunders *et al.* 1997), *Anacardium occidentale* L. (Thimmappaiah *et al.* 2002), *Juniverus excelsa* (Shanjeni 2003), *Gossypium hirsutum* L. (Ganesan dan Jayabalan 2005), *Cucumis sativus* L. (Ashok-Kumar dan Murthy 2004, Vasudevan *et al.* 2004), *Arachis hypogaea* L. (Vasanth *et al.* 2006), *Shorgum bicolor* (Pola *et al.* 2007), dan *Brassica chinensis* L. (Wang *et al.* 2007) dengan tingkat keberhasilan dan dampak yang bervariasi pada tiap tanaman tersebut.

Glutamin merupakan salah satu jenis asam amino yang paling banyak digunakan pada kultur jaringan tanaman untuk berbagai tujuan, baik untuk induksi pembentukan maupun pertumbuhan kalus embriogenik (Ogita *et al.* 1997, Das dan Mandal 2010), induksi pembentukan dan proliferasi tunas (Vasanth *et al.* 2006, Pola *et al.* 2007, Patil *et al.* 2009), serta peningkatan kualitas (Wang *et al.* 2007). Selanjutnya serin merupakan salah satu komponen penyusun glikoprotein dinding sel, yang disebut dengan ekstensin, yang memiliki fungsi pengaturan terjadinya morfogenesis pada sel tanaman (Ronchi *et al.* 1984). Kedua asam amino tersebut diketahui merupakan asam amino penting dalam kultur anter dan/atau mikrospora (androgenesis) karena kemampuannya menginduksi pertumbuhan dan embriogenesis (Babbar *et al.* 2004, Anonim 2011). Aplikasi kedua asam amino tersebut dalam konsentrasi yang tepat memberikan pengaruh yang positif terhadap keberhasilan kultur anter dan/atau mikrospora tanaman, tetapi pada konsentrasi yang tidak sesuai dapat menimbulkan keracunan sel dan menghambat regenerasinya (Hattasch *et al.* 2007).

Pada kultur anter, glutamin dan serin umumnya ditambahkan untuk meningkatkan induksi kalus, regenerasi, dan pertumbuhan tunas yang dihasilkan. Pada kentang, medium MSU93 yang ditambah dengan 7,3 mg/l glutamin dan 6,6 mg/l asparagin meningkatkan keberhasilan regenerasi

tanaman hingga 27 tanaman/100 anter (Tai dan Xiong 2003). Glutamin pada konsentrasi 750 mg/l mampu meningkatkan induksi pembentukan kalus pada *Linum usitatissimum* (Nichterlein 2003), 1.256 mg/l pada kultur anter apel (Hoffer 2003), dan 200 mg/l pada embriogenesis jeruk (Germana 2003). Selanjutnya Gorecka *et al.* (2005) menemukan bahwa modifikasi medium B5 yang ditambah dengan L-glutamin (500 mg/l), L-serin (100 mg/l), 2,4-D (0,1 mg/l), NAA (0,1 mg /l) sukrosa (100 g/l), dan agar (6,5 g/l) merupakan medium terbaik untuk menunjang keberhasilan kultur anter wortel melalui embriogenesis. Kombinasi 500 mg/l glutamin dan 100 mg/l serin pada medium tersebut juga memberikan hasil yang maksimal dalam kultur mikrospora wortel (Gorecka *et al.* 2010). Kemudian medium B5 yang ditambah dengan 800 mg/l glutamin dan 100 mg/l serin, 0,2 mg/l BAP, dan 0,2 mg/l IAA merupakan medium yang optimal pada androgenesis *Brassica napus* L. (Smykalova *et al.* 2006). Namun aplikasi kombinasi dan konsentrasi glutamin-serin yang sesuai dalam kultur anter *Anthurium* belum pernah dilaporkan.

Penelitian ini diarahkan untuk menggali dan mengeksplorasi pengaruh aplikasi kombinasi dan konsentrasi glutamin dan serin dalam menunjang keberhasilan kultur anter *Anthurium*. Penelitian secara spesifik bertujuan untuk mengetahui pengaruh kombinasi konsentrasi glutamin dan serin dalam induksi, pertumbuhan, dan regenerasi kalus pada kultur anter *Anthurium*. Diduga terdapat satu kombinasi konsentrasi glutamin dan serin yang optimal untuk induksi, pertumbuhan, dan regenerasi kalus pada kultur anter *Anthurium*.

BAHAN DAN METODE

Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Balai Penelitian Tanaman Hias, Cianjur, Jawa Barat. Kegiatan penelitian dilakukan sejak bulan Januari hingga September 2008.

Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini ialah (1) spadik *Anthurium andraeanum* kultivar Tropical yang 50% stigmanya berada dalam

kondisi reseptif dan (2) kalus hasil regenerasi. L-glutamin dan L-serin produk Sigma, Aldrich-Jerman. Sementara media dasar yang digunakan ialah medium Winarto dan Teixeira (Winarto *et al.* 2011) yang mengandung 1,5 mg/l TDZ, 0,75 mg/l BAP, 0,02 mg/l NAA, 30 g/l sukrosa, dan 2,0 g/l gelrit. pH medium diatur 5,8 dan disterilkan pada suhu 121°C selama 20 menit pada tekanan atmosfer 15 kPsi.

Sterilisasi Spadik

Spadik diletakkan di bawah air mengalir selama 0,5-1,0 jam, kemudian dipindahkan ke dalam larutan 1% benomil + bactomycin selama 30 menit dan dibilas dengan air destilasi beberapa kali hingga bersih. Setelah itu spadik direndam sambil dikocok secara manual dengan tangan dalam larutan 2% natrium hipoklorida (NaOCl) + 5 tetes Tween 20 selama 5 menit kemudian dipindahkan ke dalam larutan 1% NaOCl selama 10 menit dan dibilas dengan air destilasi steril hingga bersih (5-6x, @ 5 menit) (Winarto *et al.* 2009a).

Isolasi Anther

Isolasi anther dilakukan dengan memotong spadik pada daerah transisi (± 2 cm). Empat petal yang membungkus anther dibuka secara perlahan dan hati-hati menggunakan pisau kultur kemudian dibuang. Selanjutnya setiap anther yang terlihat mengelilingi empat sisi stigma dipotong pada bagian tengahnya menggunakan pisau kultur yang berbeda dan langsung ditanam pada medium dengan posisi terbalik, di mana bagian punggung anther menempel pada permukaan medium.

Inkubasi Kultur

Botol kultur plus anther selanjutnya diinkubasi dalam ruang gelap dengan suhu $24 \pm 1^\circ\text{C}$ selama 2 bulan. Setelah itu botol kultur diinkubasi terang dengan 12 jam fotoperiode pada suhu yang sama di bawah lampu fluoresen dengan intensitas cahaya $\pm 13 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ untuk pertumbuhan dan perkembangan kalus lebih lanjut.

Penyiapan Kalus

Penyiapan kalus untuk percobaan pertumbuhan kalus dan regenerasinya dilakukan dengan menanam anther pada medium dasar. Botol kultur plus anther diinkubasi seperti uraian di atas. Kalus hasil regenerasi disubkultur berulang 2-3 kali

(4-6 bulan) hingga diameter kalus mencapai $\pm 1,0-1,5$ cm dan siap digunakan sebagai sumber eksplan. Selanjutnya panjang, lebar, dan tinggi kalus dipotong ± 3 mm. Potongan-potongan ini digunakan sebagai sumber eksplan dan dikultur pada medium uji.

Pengaruh Glutamin dan Serin dalam Induksi Kalus

Konsentrasi L-glutamin yang diuji dalam percobaan ini ialah (1) 0 mg/l, (2) 250 mg/l, (3) 500 mg/l, dan (4) 750 mg/l, sedangkan konsentrasi L-serin yang diuji ialah (1) 0 mg/l, (2) 250 mg/l, (3) 500 mg/l, dan (4) 750 mg/l.

Percobaan ini menggunakan rancangan acak kelompok pola faktorial dengan empat ulangan. Tiap perlakuan terdiri atas tiga botol. Tiap botol terdapat enam anther yang dikultur. Botol kultur plus anther diinkubasi dalam kondisi gelap sesuai dengan uraian di atas.

Parameter yang diamati ialah (1) potensi tumbuh anther (PTA, %) diamati 1 bulan setelah kultur inisiasi (BSKI), (2) persentase regenerasi anther (PRA, %) diamati 2 BSKI, dan (3) jumlah anther yang membentuk kalus (JK) diamati 3 BSKI.

Pengaruh Glutamin dan Serin terhadap Pertumbuhan dan Regenerasi Kalus

Konsentrasi L-glutamin yang diuji dalam percobaan ini ialah (1) 0 mg/l, (2) 250 mg/l, (3) 500 mg/l, dan (4) 750 mg/l, sedangkan L-serin yang dites ialah (1) 0 mg/l, (2) 250 mg/l, (3) 500 mg/l, dan (4) 750 mg/l.

Percobaan menggunakan rancangan acak lengkap pola faktorial dengan empat ulangan. Tiap ulangan terdapat tiga botol. Tiap botol terdiri atas tiga eksplan dengan ukuran $\pm 3 \times 3 \times 3$ mm. Botol kultur plus eksplan diinkubasi dalam kondisi terang sesuai dengan uraian di atas.

Parameter yang diamati dalam percobaan ini ialah (1) persentase tumbuh kalus (PTK, %), (2) volume kalus (VK, mm^3), (3) skor bakal tunas (SBT) – s/d +++++, di mana – tidak ada bakal tunas yang teramati, + terdapat 1-5 bakal tunas, ++ terdapat 6-10 bakal tunas, +++ terdapat 11-20 bakal tunas, dan +++++ terdapat lebih dari 20 bakal tunas per eksplan yang diamati, dan (4) jumlah tunas yang terbentuk per eksplan (JT). Pengamatan dilakukan $\pm 2,5-3,0$ bulan setelah

kultur awal untuk skoring bakal tunas, sedangkan jumlah tunas dihitung dan diamati 4-4,5 BSKI.

Pengolahan Data

Data yang berhasil dikumpulkan selama percobaan berlangsung, dianalisis menggunakan analisis varian (ANOVA) menggunakan program SAS Release window 6.12. Apabila terjadi interaksi antarperlakuan, maka data diolah lebih lanjut menggunakan uji wilayah berganda Duncan taraf kepercayaan 95%, sedangkan apabila tidak terdapat interaksi antarperlakuan, maka nilai rerata pengaruh sederhana pada tiap perlakuan lanjut menggunakan uji wilayah berganda Duncan taraf kepercayaan 95%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari pengamatan secara periodik terlihat bahwa anter yang dikultur dalam media yang diberi perlakuan glutamin dan serin mulai membengkak 20-30 hari setelah kultur inisiasi (HSKI) terutama pada daerah dekat potongan anter. Pada 15-20 HSKI, sel-sel dinding anter mengalami dediferensiasi dan berubah menjadi kompeten. Inti sel-sel kompeten ini kemudian aktif membelah dan menghasilkan sel-sel yang meristematik terlihat dengan adanya pembengkakan eksplan. Sel-sel meristematik ini aktif membelah hingga membentuk kalus (Winarto *et al.* 2010a). Kalus mulai terlihat jelas 1-1,5 BSKI. Perlakuan glutamin dan serin tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap induksi kalus, sedangkan pada pertumbuhan dan regenerasi kalus, perlakuan glutamin memberikan pengaruh yang signifikan dibanding perlakuan serin. Perlakuan glutamin mampu menstimulasi pertumbuhan dan regenerasi kalus hingga menghasilkan enam tunas per eksplan.

Pengaruh Glutamin dan Serin terhadap Induksi Kalus

Kombinasi glutamin dan serin yang diuji pada percobaan ini tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap induksi pembentukan kalus. Meski demikian, terlihat bahwa glutamin pada 250 dan 750 mg/l dapat menstimulasi pembentukan kalus hingga 1,3 anter per perlakuan membentuk kalus (Tabel 1). Meski rendah pengaruhnya, penambahan glutamin pada medium terseleksi meningkatkan keberhasilan induksi kalus

pada kultur anter *Anthurium*. Berbeda dengan glutamin, perlakuan serin justru memberikan pengaruh yang nyata terhadap induksi kalus. Serin pada konsentrasi 500 mg/l merupakan konsentrasi yang paling baik untuk menginduksi pembentukan kalus dan berbeda nyata dengan konsentrasi yang lain. Konsentrasi ini mampu menstimulasi potensi tumbuh anter hingga 55% dengan 24% regenerasi anter dan 1,4 anter per perlakuan membentuk kalus (Tabel 1). Sementara penurunan dan peningkatan konsentrasi serin dari 500 mg/l justru menurunkan keberhasilan induksi pembentukan kalus.

Glutamin memiliki peran penting dalam dediferensiasi sel, proliferasi, dan menjaga potensi embriogenik eksplan (Ogita *et al.* 2001) dan sangat diperlukan untuk biosintesis asam amino, protein lain hingga auksin yang penting dalam pertumbuhan dan perkembangan sel tanaman (Winkel-Shirley 2002) belum memberikan pengaruh yang sangat signifikan dalam menunjang keberhasilan kultur anter *Anthurium*. Hasil yang hampir sama juga dicatat oleh Zeng *et al.* (2003) pada kultur in vitro *Crocus sativus*. Selanjutnya 250 mg/l merupakan konsentrasi glutamin yang potensial memberikan pengaruh positif terhadap induksi pembentukan kalus. Ini berbeda dengan Wilcox *et al.* (1991) yang menemukan 3,5 g/l merupakan konsentrasi yang optimum dalam kultur anter *Arachis hypogaea* L. Ogita *et al.* (1997) menemukan bahwa 500 mg/l merupakan konsentrasi optimal glutamin dalam induksi kalus embriogenik pada kultur in vitro *Picea jezoensis*, 233 mg/l pada *Beta vulgaris* (Saunders *et al.* 1997), 100 mg/l pada *Juniperus excelsa* (Shanjani 2003), dan 150 mg/l pada gandum (Rakesh dan Chawla 2002). Selanjutnya Hamasaki *et al.* (2005) menemukan 8 mM glutamin pada medium SIM mampu meningkatkan kompetensi dan kecepatan regenerasi eksplan *Ananas comosus* hingga 70%, namun peningkatan konsentrasi hingga 32 mM justru menghambat regenerasi eksplan. Sementara pada *Phoenix dactylifera* penggandaan kecepatan pertumbuhan kalus terjadi pada aplikasi glutamin hingga 30 mM (Aboei-Nil 1990). Pada kultur anter *Anthurium*, aplikasi glutamin pada konsentrasi 250 mg/l lebih dianjurkan dibanding konsentrasi lain dalam induksi kalus.

Tabel 1. Pengaruh glutamin dan serin terhadap induksi pembentukan kalus (*Effect of glutamine and serine on callus induction*)

Perlakuan (<i>Treatments</i>)	PTA, %	PRA, %	JK
Konsentrasi glutamin (<i>Concentration of glutamine</i>), mg/l			
0	52,3 a	12,5 a	0,8 a
250	47,7 a	20,8 a	1,3 a
500	45,4 a	16,7 a	1,0 a
750	47,7 a	18,7 a	1,3 a
Konsentrasi serin (<i>Concentration of serine</i>), mg/l			
0	43,8 b	11,5 b	0,7 b
250	45,2 b	17,7 ab	1,1 ab
500	55,2 a	23,9 a	1,4 a
750	48,2 ab	15,6 ab	0,9 ab
KK (<i>CV</i>), %	12,77	20,84	20,85

PTA = potensi tumbuh anter (*potential growth of anther*) PRA = persentase regenerasi anter (*percentage of anther regeneration*) JK = jumlah anter yang membentuk kalus (*number of anthers producing callus*), dan tn (*ns*) = tidak nyata (*not significant*).

Serin berpengaruh pula dalam morfogenesis sel tanaman (Ronchi *et al.* 1984), meski secara statistik memberikan pengaruh yang nyata dalam induksi pembentukan kalus, tetapi tidak memberikan pengaruh yang maksimal dalam kultur anter *Anthurium*. Meskipun kombinasi 800 mg/l glutamin dan 160 mg/l serin yang optimal untuk induksi kalus embriogenik pada bunga matahari (Anonymous 1991), kombinasi 500 mg/l glutamin dan 100 mg/l serin pada medium B5 yang memberikan hasil yang maksimal dalam androgenesis wortel (Gorecka *et al.* 2005, 2010), kombinasi 800 mg/l glutamin dan 100 mg/l serin, 0,2 mg/l BAP, dan 0,2 mg/l IAA pada *Brassica napus* L. (Smykalova *et al.* 2006), berbagai kombinasi dan konsentrasi glutamin dan serin yang diuji pada penelitian ini tidak memberikan pengaruh interaksi yang signifikan dalam menunjang keberhasilan kultur anter *Anthurium*.

Pengaruh Glutamin dan Serin terhadap Pertumbuhan dan Regenerasi Kalus

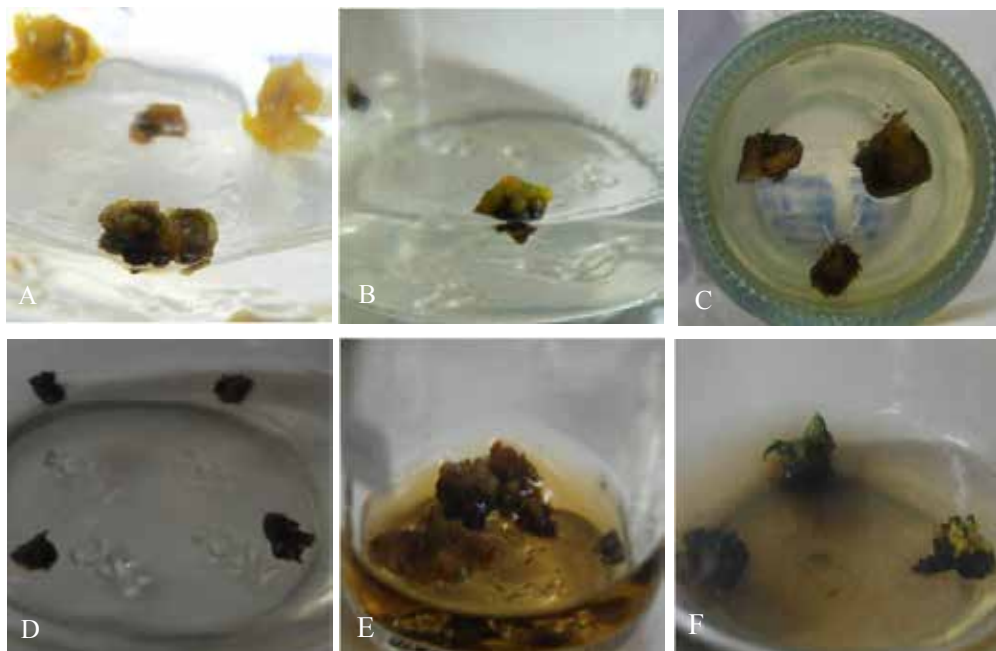
Pencoklatan kalus merupakan salah satu masalah penting yang terjadi dan diamati selama percobaan berlangsung. Persentase pencoklatan eksplan berkisar antara 1-30%. Pencoklatan umumnya terjadi pada 10-15 HSKI, prosesnya dimulai ketika terjadi perubahan warna kalus dari kuning cerah/kehijauan menjadi kuning/hijau kecoklatan (Gambar 1A-C). Kalus yang kecoklatan (baik yang belum maupun yang telah membentuk tunas) selanjutnya berubah menjadi

coklat kehitaman dan akhirnya mati pada 25-30 HSKI (Gambar 1D).

Berbeda dengan percobaan induksi pembentukan kalus, kombinasi dan konsentrasi glutamin dan serin dapat memberikan pengaruh yang nyata hingga sangat nyata pada pertumbuhan dan regenerasi kalus. Pengaruh interaksi yang nyata hingga sangat nyata juga menunjukkan besarnya dampak positif perlakuan, di mana glutamin memiliki pengaruh yang lebih besar dibanding dengan perlakuan serin.

Penambahan glutamin pada medium terseleksi memberikan pengaruh yang nyata terhadap pertumbuhan dan regenerasi kalus. Glutamin pada konsentrasi 250 mg/l merupakan konsentrasi yang terbaik dan berbeda nyata dibanding konsentrasi yang lain. Perlakuan ini mampu mendukung potensi tumbuh anter hingga 38% dengan volume pertumbuhan kalus mencapai 102 mm³ per kalus dan 1,4 tunas per eksplan (Tabel 2). Sementara itu penambahan serin justru berpengaruh negatif terhadap pertumbuhan dan regenerasi kalus. Kalus umumnya menjadi coklat kemudian mati. Akibatnya persentase tumbuh kalus, pertumbuhan kalus dan regenerasi tunas menurun seiring dengan peningkatan konsentrasi serin yang ditambahkan dalam media (Tabel 3).

Dari jumlah bakal tunas yang berhasil diamati terlihat bahwa perlakuan glutamin tanpa serin menunjukkan hasil yang terbaik dibanding perlakuan lain. Ini memberi indikasi bahwa media Winarto dan Rachmawati yang ditambah



Gambar 1. Pencoklatan kalus dalam kultur anter *Anthurium* (*Callus browning in anther culture of Anthurium*), (A-C) proses pencoklatan kalus yang sedang berlangsung (*process of callus browning taking place*) (D) kalus yang mati akibat pencoklatan (*death calli due to browning*), (E-F) pencoklatan yang disertai difusi fenol ke dalam medium (*browning followed by phenol diffusion in culture medium*)

Tabel 2. Pengaruh glutamin terhadap pertumbuhan dan regenerasi kalus (*Effect of glutamine on callus growth and regeneration*)

Konsentrasi glutamin (Concentration of glutamine), mg/l	PTK, %	VK, mm ³	JT
0	24,5 b	30 b	0,0 b
250	38,0 a	102 a	1,4 a
500	2,1 c	25 b	0,0 b
750	15,1 b	26 b	0,3 b
KK (CV), %	21,27	17,58	13,30

PTK = persentase tumbuh kalus (*percentage of callus growth*), VK – volume kalus (*callus volumn*), JT = jumlah tunas yang terbentuk per eksplan (*number of shoots produced per explant*). Angka rerata yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji wilayah berganda Duncan pada taraf 5% (*Mean followed by the same letter in the same column are not significantly different based on Duncan Multiple Range Test (DMRT) at p=0.05*).

Tabel 3. Pengaruh serin terhadap pertumbuhan dan regenerasi kalus (*Effect of serine on growth and regeneration of callus*)

Konsentrasi serin (Concentration of serine), mg/l	PTK, %	VK, mm ³	JT
0	33,3 a	83 a	1,1 b
250	24,0 ab	27 b	0,2 a
500	16,1 bc	38 b	0,2 b
750	6,2 b	26 b	0,1 b
KK (CV), %	21,27	17,58	13,30

Tabel 4. Skor jumlah bakal tunas per eksplan (Score of number of initial shoots per explant)

Konsentrasi serin (Concentration of serine), mg/l	Skor jumlah bakal tunas (Score of initial shoot number)			
	Konsentrasi glutamin (Concentration of glutamine) (mg/l)			
	0	250	500	750
0	-/+	++	-/+	+
250	-	+	-	-/+
500	-	+	-	-/+
750	-	-/+	-	-/+

Keterangan (Note): – tidak ada bakal tunas (no initial shoot), + terdapat 1-5 bakal tunas (1-5 initial shoots per explant), ++ terdapat 6-10 bakal tunas (6-10 initial shoots per explant), +++ terdapat 11-20 bakal tunas (11-20 initial shoots per explant), dan ++++ terdapat lebih dari 20 bakal tunas per eksplan (more than 20 initial shoots per explant).

250 mg/l glutamin tanpa serin merupakan kombinasi perlakuan terbaik untuk mendukung pertumbuhan dan regenerasi kalus (Tabel 4). Dominan berbagai kombinasi perlakuan yang diuji coba dalam percobaan ini justru berdampak negatif terhadap pertumbuhan kalus karena efek negatif serin dan inkubasi terang.

Kombinasi glutamin dan serin pada berbagai konsentrasi umumnya tidak memberikan efek positif terhadap pertumbuhan dan regenerasi kalus. Kombinasi perlakuan terbaik ditemukan pada medium terseleksi yang hanya ditambah 250 mg/l glutamin tanpa serin. Perlakuan ini mampu mempertahankan persentase tumbuh kalus (PTK) tertinggi hingga 77% dengan pertumbuhan kalus yang maksimal (237 mm³ per kalus) dan jumlah tunas terbanyak (4 tunas per eksplan) (Tabel 5, Data PTK dan VK tidak ditunjukkan). Sementara itu kalus yang dikultur pada medium terseleksi tanpa penambahan glutamin dan serin mampu mempertahankan persentase tumbuh kalus hingga 50% dengan pertumbuhan kalus mencapai 49 mm³ tanpa satu pun tunas teregenerasi.

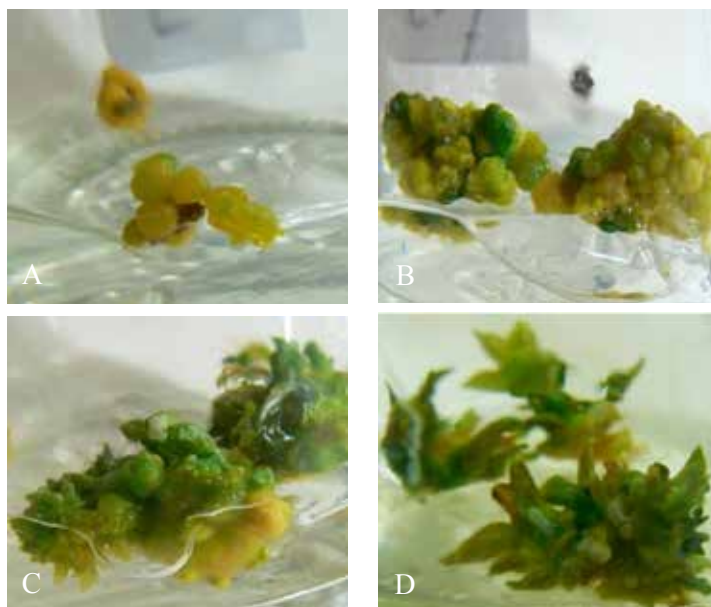
Pencoklatan kalus hasil kultur anter ini diduga berkaitan dengan sensitivitas kalus terhadap inkubasi terang seperti yang dilaporkan oleh Gow *et al.* (2009) pada *Phalaenopsis*. Pencoklatan

kalus menyebabkan terjadinya degenerasi eksplan dan kematian (Pirttila *et al.* 2008). Warna hitam kecoklatan yang terdifusi ke dalam medium kultur pada kalus hasil kultur anter *Anthurium* (Gambar 1E-F) juga mengindikasikan bahwa pencoklatan eksplan juga dipacu oleh adanya produksi fenol yang cukup tinggi (Huang *et al.* 2002 Abdelwahd *et al.* 2008 Arnaldos *et al.* 2008) dan adanya keterbatasan jumlah CO₂ dalam botol kultur (Vyas dan Purohit 2003).

Kematian kalus hasil kultur anter *Anthurium* pada penelitian ini diduga terjadi karena dampak senesensi akibat perlakuan serin seperti yang juga dilaporkan oleh Zhu *et al.* (2004) pada kultur *in vitro Spirodela polyrrhiza*, bahwa aplikasi serin menyebabkan terjadinya senesensi eksplan baik sebagian maupun seluruhnya, baik pada inkubasi terang maupun gelap yang berakibat pada terjadinya kematian. Aplikasi 1 mM menyebabkan terjadinya peningkatan konsentrasi serin endogenus eksplan. Peningkatan ini menyebabkan proses senesensi berlangsung lebih cepat. Di sisi lain inkubasi terang dalam jangka waktu yang lama menyebabkan aktivitas enzim serin gliksilat amino transferase, yang berperan mengkonversi L-serin menjadi hidrokspiruvat menurun secara bertahap (Zhu *et al.* 2004).

Tabel 5. Pengaruh kombinasi glutamin dan serin pada berbagai konsentrasi terhadap jumlah tunas yang dihasilkan per eksplan (JT) (Effect of combination of glutamine and serine different concentrations on number of shoots produced per explant)

Konsentrasi serin (Concentration of serine), mg/l	Jumlah tunas per eksplan (Number of shoots per explant)			
	Konsentrasi glutamin (Concentration of glutamine), mg/l			
	0	250	500	750
0	0,0	4,0 a	0,6 a	0,6 a
250	0,0	0,7 b	0,0 a	0,3 a
500	0,0	0,5 b	0,0 a	0,2 a
750	0,0	0,3 b	0,0 a	0,0 a
KK (CV), %	-	20,37	-	16,2



Gambar 2. Pertumbuhan dan regenerasi kalus pada medium terseleksi yang mengandung 250 mg/l glutamin dan 0 mg/l serin (*Growth and regeneration of calli on selected medium containing 250 mg/l glutamine with 0 mg/l serine*). (A) pertumbuhan kalus 10-15 HSKI (*calli growth 10-15 DACI*), (B) pertumbuhan kalus ± 2 BSKI (*Calli growth ± 2 MACI*), (C) Bakal tunas terbentuk 2,5-3,0 BSKI (*Initial shoots produced 2.5-3.0 MACI*), (D) tunas dengan 1-2 daun terbentuk 4,0-4,5 BSKI (*Shoots with 1-2 leaves formed 4.0-4.5 MACI*)

Kombinasi perlakuan serin dan inkubasi terang inilah yang diduga juga berakibat pada menurunnya kemampuan tumbuh dan regenerasi kalus hasil kultur anter *Anthurium*.

Hasil studi juga menguatkan besarnya pengaruh glutamin dalam menstimulasi pertumbuhan dan regenerasi kalus hasil kultur anter *Anthurium* (Gambar 2). Penambahan glutamin (250 mg/l) mampu meningkatkan proliferasi, pertumbuhan, dan regenerasi kalus dalam membentuk tunas (Das *et al.* 1995, Vengadesan *et al.* 2002, Pola *et al.* 2007) dan menekan dampak kematian eksplan karena pencoklatan dan senesensi kalus (Zhu *et al.* 2004, Gow *et al.* 2009). Aplikasi glutamin yang sesuai dapat meningkatkan dan menjaga potensi regenerasi kalus (Guevin dan Kirby 1997) dengan meningkatkan keseimbangan level glutamin endogenus dalam kalus. Kondisi ini meningkatkan aktivitas metabolisme sel dalam sintesis asam amino dan protein lain (Ogita *et al.* 2001) yang berdampak pada meningkatnya kemampuan tumbuh dan regenerasi kalus dalam

membentuk tunas. Sementara konsentrasi yang lebih tinggi dan kombinasinya dengan serin justru menurunkan kemampuan tumbuh kalus dan regenerasinya.

Secara keseluruhan perlakuan glutamin dan serin belum memberikan pengaruh yang signifikan terhadap induksi pembentukan kalus. Meski jumlah anter yang membentuk kalus cenderung lebih tinggi pada medium yang ditambah dengan glutamin maupun serin, namun hasilnya belum maksimal. Hasil yang hampir sama juga terlihat pada pertumbuhan dan regenerasi kalus. Perlakuan ini juga belum mampu menstimulasi pembentukan tunas yang maksimal. Hasil yang hampir sama ternyata juga ditemukan pada perlakuan kombinasi konsentrasi sukrosa dan glukosa (Winarto *et al.* 2009b), kombinasi konsentrasi 2,4-D dan TDZ (Winarto *et al.* 2010b) dan media dasar dan konsentrasi NH_4NO_3 (Winarto 2011). Hal ini mengindikasikan bahwa keberhasilan induksi pembentukan kalus pada kultur anter *Anthurium* hanya berkisar antara 1-6

anter per perlakuan yang beregenerasi membentuk kalus dengan jumlah tunas yang dihasilkan per eksplan 1- 8 tunas.

KESIMPULAN

1. Penambahan glutamin dan serin pada medium terseleksi belum memberikan pengaruh yang signifikan terhadap induksi, pertumbuhan, dan regenerasi kalus.
2. Glutamin pada konsentrasi 250 mg/l menginduksi potensi tumbuh anter hingga 48% dengan 21% anter beregenerasi dan 1,3 anter per perlakuan membentuk kalus.
3. Serin 500 mg/l merupakan konsentrasi yang paling potensial dalam induksi kalus dengan 55% potensi tumbuh anter, 24% anter beregenerasi, dan 1,4 anter per perlakuan membentuk kalus.
4. Glutamin 250 mg/l merupakan konsentrasi terbaik dibanding konsentrasi yang lain. Perlakuan tersebut yang diaplikasikan tanpa serin mampu menginduksi potensi pertumbuhan kalus hingga 77% dengan volume pertumbuhan kalus mencapai 237 mm³ dan empat tunas dihasilkan per eksplan.
5. Perlakuan serin mereduksi pertumbuhan dan regenerasi kalus dan menstimulasi senesensi kalus yang berdampak pada pencoklatan dan kematian eksplan.

PUSTAKA

1. Abdelwahd, R, N. Hakam, M. Labhilili, and S.M. Udupa. 2008. Use of an Adsorbent and Antioxidants to Reduce the Effects of Leached Phenolics in in vitro Plantlet Regeneration of Faba Bean. *Afr. J. Biotech.* 7(8): 997-1002
2. Aboei-Nil, M. 1990. The Effect of Amino Acid Nitrogen on Growth of Date Palm Callus. *Second Symposium on Date Palm*. pp: 59-65
3. Anonymous. 1991. US Patent 5017491 - Process for Regenerating Sunflowers by Embryogenesis. US Patent Issued on May 21, 1991. <http://www.patentstorm.us/patents/5017491/fulltext.html>. [3 Juni 2009]
4. _____. 2011. Anther or Pollen Culture <http://theagricos.com/tissue-culture/anter-or-pollen-culture/> [25 Juli 2011].
5. Arnaldos, T.L., R. Muñoz, M. A. Ferrer, and A. A. Calderón. 2008. Changes in Phenol Content During Strawberry (*Fragaria x ananassa*, cv. Chandler) Callus Culture. *Physiol Plant.* 113(3):315-322

6. Ashok-Kumar, H.G. and H.N. Murthy. 2004. Effect of Sugars and Amino Acids on Androgenesis of *Cucumis sativus*. *Plant Cell, Tis. and Organ Cult.* 78(3): 201-208
7. Babbar, S.B., P.K. Agarwal, S. Sahay, and S.S. Bhojwani. 2004. Isolated Microspore Culture of Brassica: An Experimental Tool for Developmental Studies and Crop Improvement. *Indian J. Biotech.* 3: 185-202.
8. Das, A. and N. Mandal. 2010. Enhanced Development of Embryogenic Callus in *Stevia rebaudiana* Bert. by Additive and Amino Acids. *Biotechnol.* 1-5.
9. Das, A.B., G.R. Rout, and P. Das. 1995. In Vitro Somatic Embryogenesis from Callus Culture of the Timber Yielding Tree *Hardwickia binata* Roxb. *Plant Cell Rep.* 15:147-149.
10. Ganesan, M. and N. Jayabalan. 2005. In Vitro Plant Regeneration from the Callus of Shoot Tips in Cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. SVPR 2). *Iranian J. Biotech.* 3(3):144-151
11. George, E.F, M.A. Hall, and G.J. De Klerk. 2007. *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition: Volume 1. The Background*. Exegetic Basingstone. UK. 508 pp.
12. Germana, M.A. 2003. Haploids and Doubled Haploids in *Citrus* spp. In Maluszynski, M., K.J. Kasha, B.P. Forster and I Szarejsko (Eds.). *Double Haploid Production in Crop Plants: A Manual*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht/Boston/London. pp: 303-308.
13. Górecka, K., D. Krzyżanowska, and R. Górecki. 2005. The Influence of Several Factors on the Efficiency of Androgenesis in Carrot. *J. Appl Genet.* 46(3): 265-269
14. _____. Kowalska, D. Krzyżanowska, and W. Kiszczak. 2010. Obtaining Carrot (*Daucus carota* L.) Plants in Isolated Microspore Cultures. *J. Appl. Genet.* 51(2):141-147
15. Gow, W.P., J.T. Chen, and W.C. Chang. 2009. Effects of Genotype, Light Regime, Explant Position, and Orientation on Direct Somatic Embryogenesis from Leaf Explants of *Phalaenopsis* Orchids. *Acta Physiol. Plant.* 31:363-369
16. Guevin, T.G. and E.G. Kirby. 1997. Induction of Embryogenesis in Cultured Mature Zygotic Embryos of *Abies fraseri* (Pursh) Poir. *Plant Cell. Tiss. Organ. Cult.* 49:219-222.
17. Hamasaki, R.M., E. Purgatto, and H. Mercier. 2005. Glutamine Enhances Competence for Organogenesis in Pineapple Leaves Cultivated In Vitro. *Braz. J. Plant. Physiol.* 17(4):383-389
18. Hattasch, C., M.V. Hanke, and H. Flachowsky. 2007. System as an Alternative Selection Strategy on Apple. *ISHS Acta Horticulturae* 814: XII EUCARPIA Symposium on Fruit Breeding and Genetics. www.actahort.org/members/showpdf?booknr=814_39, Access date [26 Juni 2011].
19. Hofer, M. 2003. In Vitro Androgenesis in Apple. In. Maluszynski, M., K.J. Kasha, B.P. Forster, and I. Szarejsko (Eds.). *Double Haploid Production in Crop Plants: A Manual*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht/ Boston/London. pp. 287-292.

20. Huang, L.C., Y.L. Lee, B.L. Huang, C.I. Kuo, and J.F. Shaw. 2002. High Polyphenol Oxidase Activity and Low Titratable Acidity in Browning Bamboo Tissue Culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 38(4):358-365.
21. Kamada, H. and H. Harada. 1984. Changes in Endogenous Amino Acid Compositions During Somatic Embryogenesis in *Daucus carota* L. *Plant Cell Physiol.* 25(1):27-38
22. Masaaki, D., K. Osamu, and N. Yuji. 2000. Efficient Anther Culture Method of the Japonica Rice Cultivar Koshihikari. *Breed Sci.* 50(3):197-202
23. Nichterlein, K. 2003. *Anther Culture of Linseed (Linum usitatissimum L.) Double Haploid Production in Crop Plants: A Manual.* In Maluszynski, M., K.J. Kasha, B.P. Forster, and I. Szarejsko (Eds.) Kluwer Academic Publishers. Dordrecht/Boston/London. pp. 249-254.
24. Ogita, S., T. Kubo, and M. Fushitani. 1997. Caulogenic Callus Induction and Adventitious Bud Formation from Embryos of Long-term Stored Seeds of *Picea jezoensis*. *J. For. Res.* 2:141-145.
25. _____, H. Sasamoto, E.C. Yeung, and T.A. Thorpe 2001. The Effects of Glutamine on the Maintenance of Embryogenic Cultures of *Cryptomeria japonica*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 37:268-273
26. Patil, G., R. Patel, R. Jaat, A. Pattanayak, P. Jain, and R. Srinivasan. 2009. Glutamine Improves Shoot Morphogenesis in Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Acta Physiol. Plant.* Pub [9 Jun 2009].
27. Pirttila, A.M., O. Podolich, J.J. Koskimaki, E. Hohtola, and A. Hohtola. 2008. Role of Origin and Endophyte Infection in Browning of Bud-derived Tissue Cultures of Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.). *Plant. Cell. Tissue Organ. Cult.* 95:47-55.
28. Pola, S., N. Saradamani, and T. Ramana. 2007. Enhanced Shoot Regeneration in Tissue Culture Studies of Sorghum Bicolor. *J. Agric Tech.* 3(2):275-286.
29. Rakesh, Y. and H. S. Chawla. 2002. Role of Genotypes, Growth Regulators, and Amino Acids on Callus Induction and Plant Regeneration from Different Developmental Stages of Inflorescence in Wheat. *Indian J. Genet. Plant Breed.* 62(1):55-60.
30. Ronchi, V.N., M.A. Caligo, M. Nozzolini, and G. Luccarini. 1984. Stimulation of Carrot Somatic Embryogenesis by Proline and Serine. *Plant Cell. Rep.* 3(5):210-214.
31. Saunders, J. W., C.J. Tsai, and E. Samper. 1997. Evaluation of Alternative Nitrogen and Carbon Sources for Sugarbeet Suspension Culture Platings in Development of Cell Selection Schemes. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 33(1):56-61.
32. Shanjani, P. S. 2003. Nitrogen Effect on Callus Induction and Plant Regeneration of *Juniperus excels*. *Int. J. Agric Biol.* 5(4):419-422.
33. Sidky, R.A and Z.E. Zaid. 2011. Direct Production of Somatic Embryos and Plant Regeneration using TDZ and CPPU of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) *Int. J. Academic Res.* 3(2):792-796.
34. Smýkalová, I., M. Větrovcová, M. Klíma, I. Macháčková, and M. Griga. 2006. Efficiency of Microspore Culture for Doubled Haploid Production in the Breeding Project "Czech Winter Rape". *Czech. J. Genet. Plant Breed.* 42(2):58-71.
35. Stuart, D. A. and S.G. Strickland. 1984. Somatic Embryogenesis from Cell Cultures of *Medicago sativa* L. I. The Role of Amino Acid Additions to the Regeneration Medium. *Plant Sci. Lett.* 34:165-174.
36. Tai, G.C.C. and X.Y. Xiong. 2003. Haploid Production of Potatoes by Anther Culture. In Maluszynski, M., K.J. Kasha, B.P. Forster and I Szarejsko (Eds.). *Double Haploid Production in Crop Plants: A Manual.* Kluwer Academic Publishers. Dordrecht/Boston/London. pp: 229-234.
37. Thimmappaiah, R., A. Shirley, and P.H. Sadhana. 2002. In Vitro Propagation of Cashew from Young Trees. *In Vitro Cell Dev. Biol-Plant.* 38(2):152-156.
38. Vasanth, K., A. Lakshmi Prabha, and N. Jayabalan. 2006. Amino Acids Enhancing Plant Regeneration from Cotyledon and Embryonal Axis of Peanut (*Arachis hypogaea* L.) *Indian J. Crop Sci.* 1(1-2):79-83
39. Vasudevan, A., N. Selvaraj, A. Ganapathi, S. Kasthuriengan, V. Ramesh Anbazhagan, and M. Manickavasagam. 2004. Glutamine: A Suitable Nitrogen Source for Enhanced Shoot Multiplication in *Cucumis sativus* L. *Biol Plant.* 48(1):125-128
40. Vengadesan, G., A. Ganapathi, V. Ramesh Anbazhagan, and R. Prem Anand. 2002. Somatic Embryogenesis in Cell Suspension Cultures of *Acacia sinuata* (Lour.) Merr. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 38:52-57.
41. Vyas, S. and S.D. Purohit. 2003. In Vitro Growth and Shoot Multiplication of *Wrightia tomentosa* Roem et Schult in a Controlled Carbon Dioxide Environment. *Plant Cell, Tiss Organ Cult.* 75:283-286.
42. Wang, H.J., L.H. Wu, M.Y. Wang, Y.H. Zhu, Q.N. Tao, and F.S. Zhang. 2007. Effects of Amino Acids Replacing Nitrate on Growth, Nitrate Accumulation, and Macroelement Concentrations in Pak-Choi (*Brassica chinensis* L.). *Pedosphere.* 17(5):595-600
43. Willcox, M.C., S. M. Reed, J.A. Burns, and J. C. Wynne. 1991. Effect of Microspore Stage and Media on Anther Culture of Peanut (*Arachis hypogaea* L.) *Plant Cell, Tiss. Organ. Cult.* 24:25-28.
44. Winarto, B. 2009a. Androgenesis: A Breakthrough Effort for Preparing Haploid or Double-haploid Plants in *Anthurium*. *Disertation.* Department of Agronomy and Horticulture, Faculty of Agriculture. Bogor Agriculture Institute. 235 pp.
45. _____, N.A. Mattjik, A. Purwito, dan B. Marwoto. 2009b. Kultur Anter *Anthurium*: Pengaruh Sukrosa dan Glukosa terhadap Keberhasilan Induksi Pembentukan Kalus dan Regenerasinya. *Berkala Penel. Hayati.* 14(2): 65-172.
46. _____, dan B. Marwoto. 2010a. Improvement of Selected Induction Culture Medium on Callus Induction in Anther Culture of *Anthurium* and Histological Study on Its Callus Formation. *J. Natur Ind.* 12(2):93-101.

47. _____ . 2010b. Aplikasi 2,4-D dan TDZ dalam Pembentukan dan Regenerasi Kalus pada Kultur Anther *Anthurium*. *J. Hort.* 20(1):1-9.
48. _____ . 2011. Kultur Anther *Anthurium*: Pengaruh Media Dasar dan Konsentrasi Ammonium Nitrat terhadap Keberhasilan Induksi Pembentukan Kalus dan Regenerasinya. *J. Natur Ind.* (Dalam proses penerbitan).
49. _____, F. Rachmawati, J.A. Teixeira da Silva. 2011. New Basal Media for Half-anther Culture of *Anthurium andraeanum* Linden ex Andre' cv. Tropical. *Plant Growth Regul.* 65(3):513-529.
50. Winkel-Shirley, B. 2002. Biosynthesis of Flavonoids and Effects of Stress. *Current Opinion in Plant Biol.* 5:218-223.
51. Yam T. W., S. Ichihashi, and J. Arditti. 1991. Callus Growth and Plantlet Regeneration in Taro, *Colocasia esculenta* var. *esculenta* (L) Schott (Araceae) *Ann. Bot.* 67:317-323.
52. Zeng, Y., F. Yan, L. Tang, and F. Chen. 2003. Increased Crocin Production and Induction Frequency of Stigma-like-structure from Floral Organs of *Crocus sativus* by Precursor Feeding. *Plant Cell, Tiss. Organ Cult.* 72:185-191.
53. Zhu, Y.R., H.L. Tao, X.Y. Lv , S.F. Wang, N.N. Wang, and Y. Wang. 2004. High Level of Endogenous L-serine Initiates Senescence in *Spirodela polyrrhiza*. *Plant Sci.* 166(5):1159-1166