

Pembungaan Jeruk Kalamondin Hasil Perbanyakannya Melalui Somatik Embriogenesis yang Disambung pada Batang Bawah JC (*The Flowering of Calamondin Citrus Derived from Somatic Embryogenesis Budded on to JC Rootstock*)

Devy, NF, Yulianti, F, dan Hardiyanto

Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika, Jl. Raya Tlekung No. 1, Junrejo, Batu, Malang 65301

E-mail: nirmala_friyantidevy@yahoo.co.id

Naskah diterima tanggal 18 Juli 2012 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 12 Januari 2013

ABSTRAK. Fase vegetatif mencakup fase juvenil yang ditandai dengan munculnya percabangan, pertumbuhan duri, serta belum berkembangnya bunga. Karakter ini ditemukan pada periode vegetatif asal biji dan hasil perbanyakannya somatik embriogenesis (SE). Tujuan penelitian ialah mengetahui kemampuan berbunga dan berbuah tanaman jeruk Kalamondin hasil perbanyakannya SE yang disambung dengan batang bawah JC setelah 1 tahun ditanam di lapangan. Penelitian pembungaan pada tanaman hasil perbanyakannya SE yang disambung dengan batang bawah JC dilakukan di Kebun Percobaan Tlekung, Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika, pada Bulan Februari 2011-Maret 2012. Tanaman jeruk Kalamondin berasal dari hasil sambungan *ex vitro*, yaitu batang atas berasal dari embrio kotiledonari dan planlet disambungkan pada batang bawah JC dengan tiga perlakuan, yaitu planlet JC hasil perbanyakannya SE yang berumur 4 dan 8 bulan setelah aklimatisasi serta semai biji umur 8 bulan. Tanaman jeruk Kalamondin hasil sambungan berumur 1 tahun, ditanam di lapangan dan disusun secara RAK dengan tiga ulangan dengan unit percobaan tiga tanaman. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sampai dengan umur 7 bulan di lapangan, tanaman masih pada fase vegetatif, dengan pertumbuhan tertinggi pada perlakuan K_{ps} yaitu tanaman yang berasal dari planlet Kalamondin yang disambungkan pada semai JC. Namun, pada bulan kedelapan setelah tanam, pertanaman menunjukkan fase generatif yang ditandai dengan munculnya organ bunga. Jumlah bunga dan buah tertinggi terdapat pada perlakuan tanaman yang berasal dari planlet Kalamondin yang disambungkan pada batang bawah JC hasil aklimatisasi. Dari penelitian ini disimpulkan bahwa hasil perbanyakannya jeruk melalui SE, berupa embrio kotiledonari maupun planlet dapat dimanfaatkan sebagai batang atas yang tumbuh dan berkembang dengan normal di lapangan apabila didukung oleh kondisi lingkungan yang optimal.

Katakunci: Embrio somatik; Juvenil; Kalamondin (*Citrus mitis* Blanco); Planlet; Sambungan

ABSTRACT. Vegetative phase of citrus plant consists of the juvenile phase characterized by appearing of branch, thorn, and the absence of flower in the crop. This character is commonly found on citrus plants both derived from seed and somatic embryogenesis (SE) *in vitro*. The purpose of this study was to evaluate response of 1 year old Calamondin citrus derived from SE propagation budded on to JC rootstock. The research was conducted at Tlekung Eksperimental Garden, Indonesian Citrus and Subtropical Fruit Research Institute, in February 2011 up to March 2012. The treatments were 1 year old-Calamondin plants derived from embryos and plantlet that were grafted on to three treatments rootstock (4 and 8 months-acclimated SE plant and 8 months age-seedling of JC). These treatments were arranged as randomized block design, with three replications and three plants for each experimental unit. The results showed that up to 7 months after planting, plants were still on vegetative phase with the best high growth were found on the K_{ps} treatment (plantlet as a stock that was budded on to seedling JC as a rootstock). But more than 7 months after planting, the plants began in the generative phase. The highest number of flowers and fruits produced at plants derived from plantlet as stock that were grafted on to acclimated JC rootstock. This study suggests that planting materials produced from SE method, both in the form of cotyledonary embryos and plantlets could be used as stock which will normally grow and develop in the field if they are in optimal environmental conditions.

Keywords: Somatic embryos; Juvenile; Calamondin (*Citrus mitis* Blanco); Plantlets; Budding

Pola pembungaan jeruk dipengaruhi oleh kondisi lingkungan, sehingga pembungaan di daerah tropika berbeda dengan subtropika. Di daerah subtropika, suhu udara dan tanah pada musim dingin turun sampai 15°C. Hal ini menyebabkan perubahan fisiologis mata tunas dan terinduksinya pembungaan pada saat suhu lingkungan mulai meningkat, sedangkan di daerah tropika induksi pembungaan dipicu oleh musim kering dan pengairan yang optimal (Srivastava *et al.* 2000, Valiente & Albrigo 2004, Okuda *et al.* 2004). Menurut Monerri *et al.* (2011) karbon yang terfiksasi selama

proses fotosintesis dikirim ke akar yang dimanfaatkan untuk pertumbuhan, selanjutnya fotosintat disimpan sebagai karbohidrat dalam daun. Apabila lingkungan optimal, maka cadangan karbohidrat digunakan untuk pembentukan bunga. Kekeringan atau stress air yang terjadi di daerah subtropika merupakan stress lingkungan yang dianggap serius karena terjadi pengurangan tingkat net fotosintesis (Xie *et al.* 2012). Selain lingkungan, potensi hasil jeruk juga dibutuhkan oleh umur dan asal benih. Secara umum, benih yang berasal dari sambungan yang menggunakan mata

tempel dewasa, dapat berbunga pada tahun ke-2 di lapangan, sedangkan benih yang berasal dari biji/embrio zigotik, berbunga lebih lama dibandingkan tanaman sambungan.

Menurut Frost (2011), pada tanaman jeruk, embrio dihasilkan dari proses perkawinan atau pun dari bagian jaringan nuselar yang berasal dari maternal melalui proses apomiktik. Embrio tersebut banyak tumbuh pada jaringan nucelus di sekeliling kantung embrio zigotik yang sedang berkembang (Koltunow *et al.* (1996). Kedua jenis embrio ini mempunyai sifat yang sama, yaitu menghasilkan tanaman yang memiliki fase vegetatif (juvenil) yang panjang yaitu 12–15 tahun (Ligeng *et al.* 1995). Menurut Ollitrault (1990), karakter juvenil merupakan hambatan yang besar dalam perbanyakan jeruk melalui teknologi embriogenesis somatik. Panjangnya fase vegetatif merupakan sesuatu karakter kuantitatif yang dikendalikan oleh multigen. Pada tanaman jeruk Washington (*Citrus sinensis* L. Osbeck), pembentukan calon bunga berada pada terminal bunga, yang dikendalikan oleh gen CsTFL dengan urutan asam amino CsTFL 65% yang serupa dengan protein TFL1 pada Arabidopsis. Protein TFL1 berperan untuk pembentukan bunga (Pillitteri *et al.* 2004).

Untuk memperpendek masa juvenil perlu diterapkan teknik *grafting* embrio. Menurut Ollitrault (1990) teknik tersebut dianggap lebih mudah dan lebih cepat dibandingkan teknik tradisional, karena (1) terjadi pengurangan waktu pada tahapan *in vitro* dan aklimatisasi, (2) menekan serangan patogen, dan (3) mempercepat pertumbuhan tunas. Pada tanaman kakao, penerapan teknik ini memungkinkan diperolehnya bunga pertama 1 atau 2 tahun lebih awal dibanding teknik pembibitan tradisional (Couturon *dalam* Ollitrault 1990). Embrio *grafting* juga diterapkan oleh Altaf & Iqbal (2003) menggunakan embrio dari keprok Kinnow yang disambungkan pada batang bawah RL berumur 2–18 bulan. Penyambungan embrio tersebut menghasilkan individu tanaman yang tumbuh dengan baik. Ligeng *et al.* (1995) juga berhasil menyambung mata tunas semai nuselar umur 1 tahun pada tanaman dewasa yang telah berbuah. Dengan cara ini, fase juvenil yang panjang dapat dikurangi 2–4 tahun.

Penelitian mengenai induksi pembungaan jeruk di lapangan juga dilakukan sejak lama oleh Furr *et al.* (1947). Metode yang paling sederhana dan telah lama diaplikasikan ialah dengan cara perompesan dan pengikatan (pemasangan cincin) pada cabang tanaman yang dilakukan secara berkala. Tanaman jeruk dewasa yang diikat dan diberi pencahayaan 9–12 jam dapat berbunga lebih cepat dibandingkan dengan tanpa perlakuan pengikatan.

Tujuan penelitian ialah mendapatkan keragaan vegetatif dan generatif tanaman jeruk Kalamondin (*Citrus mitis* Blanco) hasil perbanyakan SE *in vitro* yang disambungkan pada batang bawah JC secara *ex vitro*. Setelah 1 tahun di lapangan, tanaman Kalamondin diharapkan dapat tumbuh dan berkembang dengan baik. Informasi hasil penelitian ini diharapkan menjadi acuan dalam memperbanyak jeruk secara massal yang dilakukan melalui metode SE untuk mendapatkan benih *true-to-type*, seragam, serta bebas dari penyakit dengan harga murah. Hipotesis yang diajukan pada penelitian ini ialah bahwa benih jeruk yang batang atasnya berasal dari produk SE tumbuh dan berkembang lebih cepat dibandingkan dengan benih yang berasal dari perbanyakan konvensional.

BAHAN DAN METODE

Percobaan dilakukan di Kebun Percobaan Tlekung (950 m dpl.), pada Bulan Januari 2011 –Maret 2012. Bahan yang digunakan ialah batang atas jeruk varietas Kalamondin (*C. mitis* Blanco) dan batang bawah varietas *Japansche citroen* (JC) hasil perbanyakan secara SE serta semai biji JC umur 8 bulan. Hasil perbanyakan jeruk Kalamondin melalui teknologi SE *in vitro* berupa planlet dan embrio fase kotiledonari yang telah berkembang digunakan sebagai batang atas untuk produksi benih jeruk. Penyambungan batang atas pada batang bawah JC dilakukan secara *ex vitro*.

Penyambungan *Ex Vitro* di Rumah Pembibitan antara Embrio Kotiledonari dan Planlet Kalamondin Hasil Perbanyakan SE pada Batang Bawah JC

Embrio dan planlet Kalamondin (Gambar 1a) disambungkan pada semai batang bawah JC yang berasal dari planlet JC hasil perbanyakan SE yang telah diaklimatisasi selama 4 dan 8 bulan serta semai biji JC berumur 8 bulan. Tanaman hasil penyambungan diletakkan di tempat naungan yang agak lembab untuk menghindari proses respirasi yang berlebihan. Setelah 3 minggu, sungkup plastik dibuka. Benih jeruk Kalamondin dipelihara secara optimal di dalam *screen-house* sampai dengan umur 1 tahun (Gambar 1b).

Perawatan tanaman dilakukan dengan mengikuti prosedur operasional standar, di antaranya pemupukan Urea masing-masing tanaman sebanyak 50 g/tanaman yang dilakukan pada awal dan akhir musim penghujan. Pengendalian hama dan penyakit dilakukan sesuai dengan kondisi di lapangan.



Gambar 1. Embrio kotiledonari dan planlet yang dipakai sebagai batang atas (a) dan tanaman hasil sambung yang berumur 1 tahun (b) (*Cotyledonary embryo and plantlet that used as stock (a) and 1 year-grafted plants (b)*)

Peubah yang Diamati

Pengamatan dilakukan terhadap tinggi tanaman, diameter batang bawah, jumlah cabang, persentase tanaman berbunga serta jumlah bunga/tanaman, dan buah/tanaman. Pengamatan dilakukan setiap bulan sampai umur sambungan 12 bulan. Tinggi tanaman diukur dari permukaan tanah sampai dengan bagian pucuk tanaman dan diameter batang bawah diukur pada 5 cm di bawah pertautan.

Untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap semua parameter yang diamati, maka data yang terkumpul dianalisis dengan sidik ragam pada rancangan acak kelompok, dengan tiga ulangan dan tiga tanaman setiap unit. Bagi parameter yang dipengaruhi secara nyata oleh perlakuan, maka uji dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan pada taraf 5%. Data penunjang yang diamati lainnya ialah

Tabel 1. Perlakuan asal benih Kalamondin (*The treatments of derived-Calamondin plant*)

Perlakuan (Treatments)	Keterangan (Explanation)
K_{E4}	Batang bawah JC (SE) aklimatisasi 4 bulan + disambung embrio
K_{E8}	Batang bawah JC (SE) aklimatisasi 8 bulan + disambung embrio
K_{ES}	Batang bawah JC (semai biji) + disambung embrio
K_{P4}	Batang bawah JC (SE) aklimatisasi 4 bulan + disambung planlet
K_{P8}	Batang bawah JC (SE) aklimatisasi 8 bulan + disambung planlet
K_{PS}	Batang bawah JC (semai biji) + disambung planlet

jumlah hari hujan dan curah hujan selama 1 tahun (Januari s/d Desember 2011).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari hasil analisis data didapatkan bahwa sampai dengan umur 7 bulan di lapangan, tanaman belum memasuki fase generatif. Hal ini ditandai dengan tanaman belum berbunga serta tanaman masih menghasilkan duri yang mencirikan bahwa tanaman tersebut masih dalam fase juvenil (Gambar 2). Menurut Ligeng *et al.* (1995) karakter yang khas pada tanaman jeruk fase juvenil ialah tumbuhnya duri di semua bagian batang, cabang maupun ranting tanaman. Duri semakin berkurang dengan bertambahnya umur tanaman.

Sampai dengan umur 10 bulan, tinggi tanaman meningkat sejalan dengan umur tanaman. Penyambungan jeruk Kalamondin pada batang bawah JC asal semai (K_{ps}) relatif lebih baik dibandingkan pada perlakuan lainnya (Gambar 3).

Tinggi tanaman enam perlakuan pada saat tanam tidak berbeda nyata ($CV = 15\%$), tetapi dalam pertumbuhan selanjutnya, perlakuan K_{ps} secara nyata tumbuh lebih baik dibandingkan perlakuan lainnya. Demikian pula pertumbuhan diameter serta jumlah cabang tanaman menunjukkan pola serupa (Tabel 2). Hal ini diduga disebabkan karena perakaran yang terbentuk pada batang bawah JC asal semai relatif lebih baik dibandingkan dengan yang berasal dari aklimatisasi planlet asal perbanyakannya SE (Devy *et al.* 2011), sedangkan menurut penelitian Gradinariu *et al.* (2011), pertumbuhan yang tidak optimal pada tanaman hasil sambungan disebabkan adanya jaringan parenkim yang tidak terbentuk secara normal, sehingga menyebabkan terhambatnya pembentukan pembuluh secara berkesinambungan di daerah pertautan. Spot-spot yang terdapat pada xilem tersebut dapat menghambat perkembangan jaringan vaskular dan menyebabkan perubahan aliran hormon endogenus secara normal dan mengakibatkan terganggunya transportasi air dan nutrisi ke batang atas.

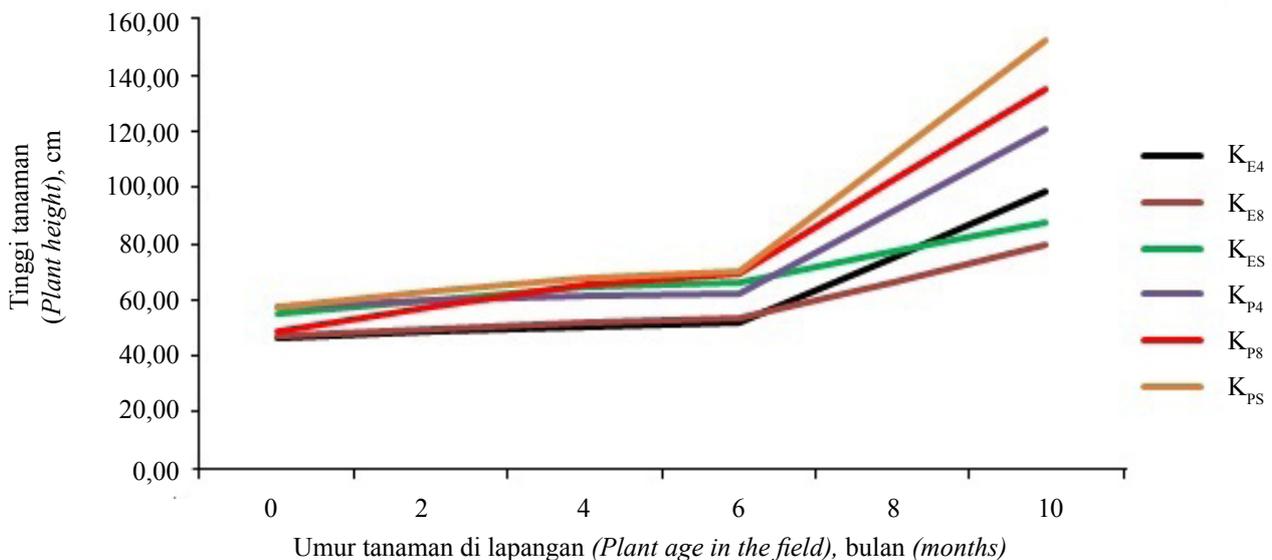
Pada umur 8 bulan setelah tanam (bulan Oktober 2011), pertanaman mulai menunjukkan perubahan fase, yaitu dari fase vegetatif ke generatif yang ditandai dengan tumbuhnya bunga. Secara umum persentase tanaman yang berbunga tertinggi pada minggu pertama terjadi pada perlakuan K_{p8} , tetapi pada minggu ke-5 dan ke-6, persentase tanaman yang berbunga tertinggi ditemukan pada perlakuan K_{ps} yaitu tanaman dengan batang atas asal planlet yang disambungkan pada batang bawah JC asal semai (Gambar 4), sedangkan jumlah bunga yang tumbuh/tanaman dari minggu



Gambar 2. Karakter juvenil (duri) pada tanaman jeruk Kalamondin (*Juvenile character (thorn) at Calamondin citrus*)

ke-2 sampai ke-6 pembungaan, umumnya terjadi pada perlakuan K_{P_4} (Tabel 3), sedangkan buah yang terbentuk relatif lebih banyak terjadi pada perlakuan K_{ES} dan K_{P_4} dibandingkan perlakuan lainnya (Gambar 5).

Berdasarkan hasil dalam Tabel 3, hingga minggu ke-6 pengamatan K_{P_4} dan K_{P_8} tidak berbunga. Hal ini diduga disebabkan embrio yang disambungkan pada batang bawah JC berasal dari embrio yang secara fisiologis belum mampu mengubah fase vegetatif ke generatif. Selain itu asal batang bawahnya juga diduga kurang mendukung perkembangan tanaman, yang dapat dilihat dari pertumbuhan diameter maupun jumlah cabang yang relatif lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan lainnya (Tabel 2).



Gambar 3. Tinggi tanaman jeruk Kalamondin pada umur tanaman 0–10 bulan di lapangan (*The height of Calamondin citrus at 0–10 months after planting*)

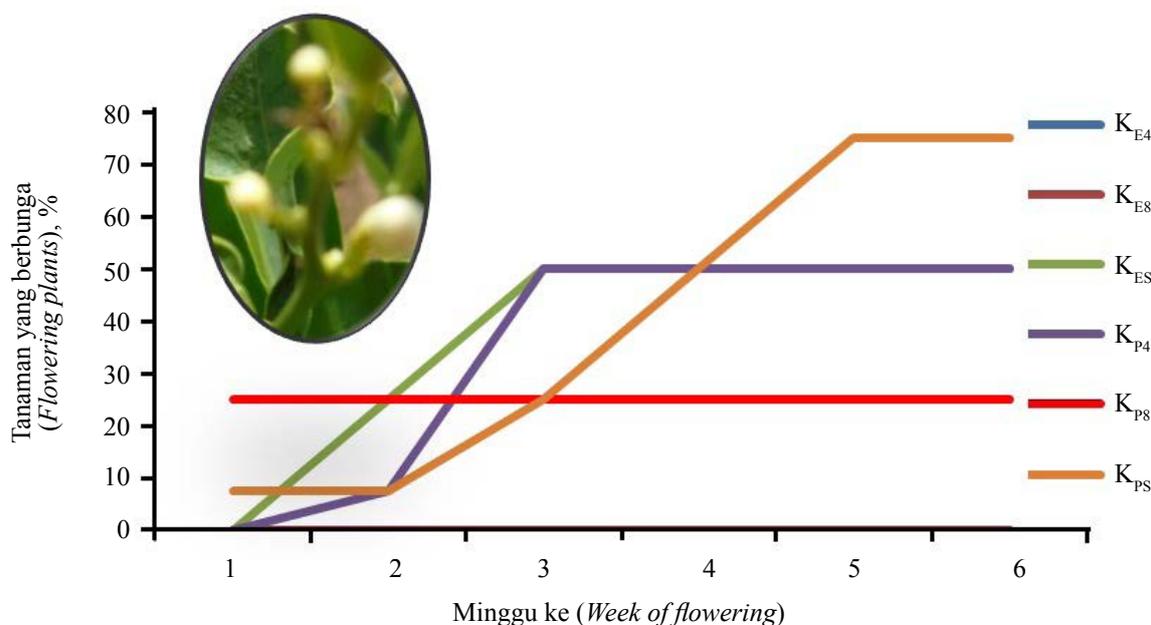
Tabel 2. Rerata diameter dan jumlah cabang pada tanaman jeruk Kalamondin hasil sambung SE dengan batang bawah JC umur 4 dan 10 bulan setelah tanam (*The average of diameter and number of branches on Calamondin citrus banded with JC as rootstock at 4 and 10 months after planting*)

Perlakuan (Treatments)	Diameter dan jumlah cabang pada tanaman Kalamondin (<i>Diameter and number of branches on Calamondin</i>)			
	Diameter (Diameter) cm		Jumlah cabang (Number of branches)	
	4 bulan (months)	10 bulan (months)	4 bulan (months)	10 bulan (months)
K_{E_4}	1,05 a	1,54 b ^{*)}	4,5 ab	3,3 c
K_{E_8}	1,10 a	1,58 b	3,6 b	3,5 c
K_{ES}	1,17 a	1,92 ab	5,6 ab	5,5 ab
K_{P_4}	1,10 a	1,84 ab	5,1 ab	5,33 ab
K_{P_8}	1,16 a	1,93 ab	4,5 ab	4,66 bc
K_{PS}	1,19 a	2,27 a	6,1 a	6,66 a
KK (CV), %	14,5	13,4	13,8	14,7

^{*)} angka rerata yang diikuti oleh huruf yang sama pada satu kolom, berarti tidak berbeda nyata pada uji duncan dengan taraf 5% (*Numbers followed by the same letters in the same column*)

Berdasarkan hasil pada Tabel 3 dan Gambar 5, jumlah buah pada pengamatan Bulan Desember, terutama pada perlakuan K_{P_8} lebih tinggi dibandingkan jumlah bunga pada perlakuan lain pada bulan yang sama. Hal ini mencerminkan bahwa jumlah buah yang ada merupakan hasil total buah yang terbentuk mulai minggu ke-3 s/d ke-6 setelah pembungaan.

Pembungaan yang diikuti oleh pembuahan pada tanaman jeruk Kalamondin diduga disebabkan



Gambar 4. Persentase jumlah tanaman yang berbunga pada minggu ke-1 s/d 6 pembungaan (*The percentage of flowering plants at 1st – 6th week of flowering*)

Tabel 3. Rerata jumlah bunga pada minggu ke-1 s/d 6 pembungaan (*The average of flower number at 1st – 6th week of flowering*)

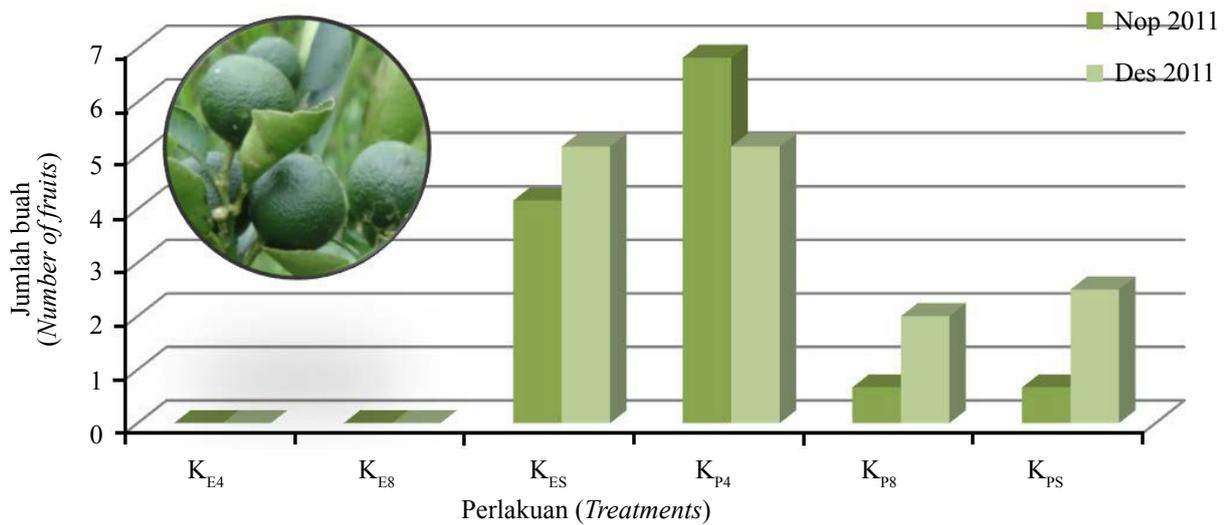
Perlakuan (Treatments)	Rerata jumlah bunga pada minggu ke-1 s/d 6 (<i>The average of flower number at 1st – 6th week</i>)					
	1	2	3	4	5	6
K _{E4}	0 c ⁾	0 d	0 d	0 c	0 c	0 d
K _{E8}	0 c	0 d	0 d	0 c	0 c	0 d
K _{ES}	0 c	1,1 cd	4,1 b	4,1 b	4,1 b	7,3 b
K _{P4}	0 c	7,1 a	7,3 a	9,5 a	9,5 a	9,5 a
K _{P8}	3,6 a	3,6 b	3,6 b	3,6 b	3,6 b	1,1 d
K _{PS}	1,3 b	1,3 c	1,1 c	2,8 b	2,8 b	2,6 c
KK (CI), %	43,8	30,1	18,8	21,3	21,3	20,1

tanaman di lapangan (KP Tlekung) mengalami kekeringan selama 4 bulan, yaitu dimulai pada Bulan Juni s/d Septemer 2011 dengan curah hujan berkisar antara 15,5 mm/bl s/d 0,0 mm/bl (Gambar 6).

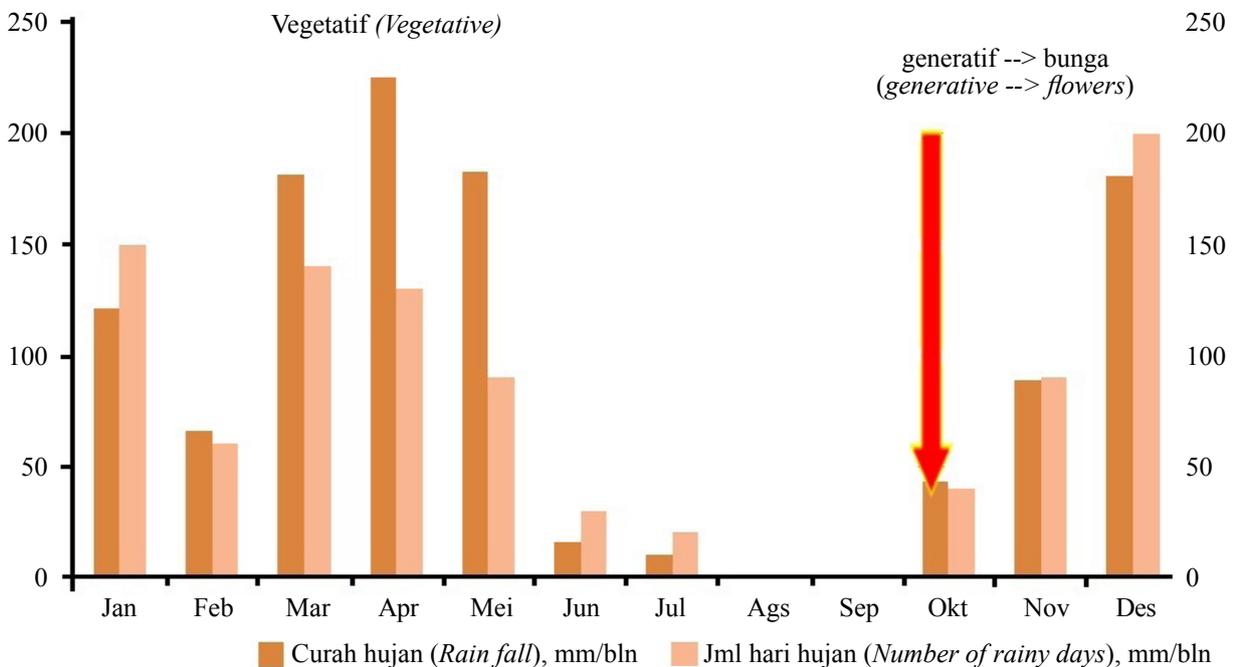
Kalamondin merupakan salah satu tanaman jeruk yang dianggap sebagai tanaman model untuk studi pembungaan dan pembuahan, karena tanaman ini dapat diinduksi pembungaannya pada setiap saat dengan mengurangi asupan air atau perlakuan stress air, pengurangan nitrogen, dan aplikasi zat pengatur tumbuh (Lai & Chen 2008). Lebih lanjut diketahui bahwa pembungaan pada tanaman ini tidak terpengaruh oleh suhu lingkungan, pembungaan dapat terjadi pada tanaman yang terpapar oleh suhu rendah maupun tinggi. Pembungaan juga dapat terjadi setelah

tanaman diperlakukan pemangkasan berat kecuali pada *flush* pertama, pembentukan calon bunga dapat terjadi pada setiap saat *flush* (Lin *et al.* 2012), sedangkan pada tanaman jeruk limau Tahiti (*Citrus latifolia* Tan.), kondisi stress air (-2,25– -3,5 megapascal) pada siang hari paling tidak selama 2 minggu secara bersiklus maupun secara kontinyu, dapat menginduksi bunga, demikian pula bila tanaman terpapar oleh suhu rendah (18°C siang dan 10°C pada malam hari) (Southwick & Davenport 1986).

Menurut Greenwood (1995) fase generatif atau fase matang melibatkan perubahan perilaku dari meristem, di mana pola perilaku ini merupakan respons dari satu set input parameter fisiologis. Secara umum, tanaman cenderung menolak perubahan lingkungan, tetapi dalam beberapa hal tanaman berubah untuk mengakomodasikan berbagai pengaruh lingkungan. Pada keadaan normal, jaringan meristem pucuk tanaman tetap berkembang untuk tumbuh vegetatif. Namun, dengan berjalannya waktu, perilaku ini dapat berubah, yaitu dengan hilangnya kemampuan untuk regenerasi serta pertumbuhan vegetatif, berganti dengan meningkatnya kompetensi untuk reproduktif. Hal ini merupakan respons adaptif tanaman terhadap stress lingkungan yang ada. Perubahan dari fase vegetatif ke generatif diduga disebabkan oleh perubahan rasio fitohormon (ABA, GA, auksin, dan sitokinin) yang ada pada tanaman. Hal ini sesuai dengan pendapat Koshita *et al.* (1999), bahwa pembungaan jeruk Satsuma terjadi dengan adanya stimulus lingkungan yang menyebabkan meningkatnya kandungan GA_{1/3} yang berfungsi menghambat pembentukan tunas



Gambar 5. Jumlah buah pada tanaman berumur 9 dan 10 bulan setelah tanam (Nov. & Des. 2011) (The number of fruits at 9 and 10-months after planting (Nov. & Dec. 2011))



Gambar 6. Curah hujan/bulan dan jumlah hari hujan/bulan (The rainfall/month and number of rainy days/month)

serta meningkatnya kandungan IAA dan ABA pada bulan berikutnya. Kondisi tersebut dapat mendorong terbentuknya calon bunga pada ujung maupun ruas-ruas batang tanaman jeruk.

KESIMPULAN DAN SARAN

1. Hasil perbanyak jeruk melalui SE (berupa embrio kotiledonari maupun planlet) dapat dimanfaatkan sebagai batang atas yang tumbuh dan berkembang dengan normal di lapangan apabila didukung oleh kondisi lingkungan optimal.
2. Pertumbuhan fase vegetatif benih tanaman jeruk Kalamondin yang berasal dari SE sebagai batang atas yang disambungkan dengan batang bawah JC di lapangan berlangsung sampai dengan 7 bulan setelah tanam, sedangkan fase generatif terjadi pada bulan ke-8, setelah tanam mengalami fase kering selama 4 bulan.
3. Persentase tanaman yang berbunga tertinggi pada perlakuan K_{PS}, namun jumlah bunga dan buah yang tertinggi terdapat pada perlakuan K_{P4}.
4. Informasi hasil penelitian ini dapat menjadi acuan awal bagi pemanfaatan hasil perbanyak massal jeruk yang dilakukan melalui metode SE untuk

produk benih *true-to-type*, seragam, serta bebas dari penyakit dengan harga murah yang dapat dijangkau.

PUSTAKA

1. Altaf, N & Iqbal, M 2003, 'Towards a seedless cultivar of Kinnow Mandarin. VI. Production of seedless plants by sprout/shoot apex/embryo grafts', *Pak. J. Bot.*, vol. 35, no. 4, pp. 563-70.
2. Devy, NF, Sugiyatno, A & Yulianti, F 2011, 'Daya tumbuh tanaman jeruk Kalamondin hasil perbanyakan via somatik embriogenesis *in vitro* pada batang bawah JC', *J. Hort.*, vol. 21, no. 3, pp. 214-24.
3. Frost, H 2011, *Nucellar embryony and juvenile characters in clonal varieties of citrus*, Paper Univ. of California Citrus Exp. Station and Graduate School of Tropical Agricultural, Riverside-California, no. 391, pp. 423-32. viewed 2 May 2012 <jhered.oxfordjournals.org>.
4. Furr, JR, Cooper, WR & Reece, PC 1947, 'An investigation of flower formation in adult and juvenile citrus trees', *Amer. J. Bot.*, vol. 34, no. 1, pp. 1-8.
5. Gradinariu, G, Zlati, C, Istrate, M & Draghia, D 2011, 'Improvement of grafting union in plum by studying graft anatomy', *Acta Hort.*, vol. 923, pp. 283-90.
6. Greenwood, MS 1995, 'Juvenility and maturation in conifers: current concepts', *Tree Physiol.*, vol. 15, pp. 433-38. viewed 2 May 2012 tanggal ? <<http://treephys.oxfordjournals.org>>.
7. Koltunow, AM, Hidaka, T & Robinson, SP 1996, 'Accumulation of seed storage proteins in seeds and in embryos cultured *in vitro*', *Plant Physiol.*, vol. 110, pp. 559-609.
8. Koshita, Y, Takahara, T, Ogata, T & Goto, A 1999, 'Involvement of endogenous plant hormones (IAA, ABA, GAs) in leaves and flower bud formation of Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.)', *Sci. Hort.*, vol. 79, pp. 185-94.
9. Lai, Yi-Ting & Iou-Zen Chen 2008, 'Effect of temperature on Calamondin (*Citrus microcarpa*) flowering and flower bud formation', *Acta Hort.*, vol. 773, pp. 111-15.
10. Ligeng, C, Keling, C & Guangyan, Z 1995, 'Genetic study and artificial regulation of juvenile period of citrus seedling', *Acta Hort.*, vol. 403, pp. 205-10.
11. Lin, SY, Chen, IZ & Yi-Ting Lai 2012, 'Heavy pruning effect on flower buds formation of *Citrus microcarpa* Bunge and *Fortunella margarita* Swing', *Acta Hort.*, vol. 928, pp. 267-72.
12. Monerri, C, Fortunato-Almeida, A, Molina, RV, Nebauer, SG, Garcia-Luis, A & Guardialo, JL 2011, 'Relation of carbohydrate reserves with the forthcoming crop, flower formation and photosynthetic rate, in alternate bearing 'Salustiana' sweet orange (*Citrus sinensis* L.)', *Scientia Horticulturae*, vol. 129, pp. 71-8.
13. Okuda, H, Noda, K, Hirabayashi, T & Yonemoto, JY 2004, 'Relationship between floral evocation and bud dormancy in Satsuma mandarin', *Scientia Horticulturae*, vol. 102, pp. 213-19.
14. Ollitrault, P 1990, 'Somatic embryo grafting, a promising technique for citrus breeding and propagation', ICSN 3rd Congres, Australia, pp. 10.
15. Pillitteri, LJ, Lovatt, CJ & Willing, LL 2004, 'Isolation and characterization of terminal flower. Homolog and its correlation with juvenility in citrus', *Plant Physiol.*, vol. 135, no. 3, pp. 1540-51.
16. Southwick, SM & Davenport, TL 1986, 'Characterization of water stress and low temperatur effect on flower induction in citrus', *Plant Physiol.*, vol. 81, no. 1, pp. 26-9.
17. Srivastava, AK, Singh, S & Huchche, AD 2000, 'An analysis on citrus flowering- a riview', *Agric. Rev.*, vol. 21, no. 1, pp. 1-15.
18. Valiente, JI & Albrigo, LG 2004, 'Flower bud induction of Sweet Orange trees (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) : effect of low temperatures, crop load, and bud age', *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, vol. 129, no. 2, pp. 158-64.
19. Xie, S, Liu, Q, Xiong, X & Lovatt, CJ 2012, 'Effect of water stress on citrus photosynthetic characteristics', *Acta Hort.*, vol. 928, pp. 315-22.