

Teknologi Haploid Anyelir: Studi Tahap Perkembangan Mikrospora dan Seleksi Tanaman Donor Anyelir

Kartikaningrum, S¹⁾, A. Purwito²⁾, G. A. Wattimena²⁾, B. Marwoto¹⁾, dan D. Sukma²⁾

¹⁾Balai Penelitian Tanaman Hias, Jl. Raya Ciherang-Pacet, Cianjur 43253

²⁾Institut Pertanian Bogor, Jl. Raya Dramaga, Bogor 16680

Naskah diterima tanggal 18 Maret 2011 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 20 April 2011

ABSTRAK. Pengembangan teknologi haploidisasi merupakan salah satu terobosan yang diharapkan mampu mempercepat kebangkitan industri florikultura di Indonesia. Teknologi tersebut dapat menghasilkan tanaman homozigot murni atau tanaman haploid ganda. Tujuan penelitian ialah (1) mengetahui tahap perkembangan bunga, mikrospora, dan viabilitasnya, (2) mendapatkan medium inisiasi yang potensial untuk kultur anter atau mikrospora anyelir. Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan, Balai Penelitian Tanaman Hias, Segunung dan Laboratorium *Microtechnique*, Departemen Agronomi, Institut Pertanian Bogor, mulai September 2009 sampai dengan Oktober 2010. Bahan tanaman yang digunakan ialah lima genotip *Dianthus chinensis*. Pengamatan mikrospora dengan pengecatan menggunakan DAPI dan FDA, seleksi medium inisiasi, dan tanaman donor dilakukan dalam penelitian ini. Penelitian ini menghasilkan lima genotip *D. chinensis* yang memiliki kecepatan anthesis yang relatif sama, yaitu berkisar antara 14-16 hari, mempunyai ciri-ciri spesifik, yaitu adanya perubahan warna anter pada fase perkembangan kuncup bunga yang sama dan pada genotip V11, V13, dan V15 yang memiliki ukuran mikrospora bervariasi. Jumlah mikrospora per anter terbanyak ditemukan pada genotip V11, yaitu 30.400. Rasio tahap perkembangan mikrospora berubah sejalan dengan perubahan tahap perkembangan kuncup bunga dengan persentase *late-uninucleate* tertinggi (44,64%) pada saat kuncup bunga mencapai ukuran antara 1,31 dan 1,51 cm, dan belum ada perubahan warna anter. Viabilitas mikrospora berkisar antara 40-60% dan persentase tertinggi ditunjukkan oleh genotip V11. Fase perkembangan mikrospora T3 (ukuran kuncup <1,50 cm, warna anter putih) berpotensi untuk pengujian lebih lanjut. Medium inisiasi yang dipilih ialah medium M2 dan M5 yang akan diuji lebih lanjut. Genotip V11 ditetapkan sebagai tanaman donor utama, sedang genotip lain yang berpotensi yaitu V13 dan V15. Hasil penelitian ini bermanfaat sebagai langkah awal pembuatan protokol kultur anter tanaman anyelir.

Katakunci: *Dianthus* sp.; Kultur anter; Medium inisiasi; Tanaman donor

ABSTRACT. Kartikaningrum, S., A. Purwito, G. A. Wattimena, B. Marwoto, and D. Sukma. 2011. **Carnation Haploid Technology: A Study on Development Phase of Microspore and Selection of Carnation Donor Plant.** The development of haploid technology is one of the breakthrough innovation to fasten the revival of floriculture industry in Indonesia. Homozygous double haploid plants can be produced through this technology. The aims of this research were to determine (1) flower development stage, microspores, and survival, (2) isolation techniques and medium having the potential for initiation of anther or microspores culture of carnation. The study was conducted at the Tissue Culture Laboratory, Indonesian Ornamental Crops Research Institute, Segunung, and the Microtechnique Laboratory, Department of Agronomy, Bogor Agricultural University, from September 2009 to October 2010. Five genotypes of *Dianthus chinensis* were used in this study. Periodically observations of anther morphology, DAPI and FDA staining, selection of medium, and donor plants were done in this research. The results showed that the *D. chinensis* genotypes tested had relatively the same growth speed of anther ranged from 14 to 16 days, special characteristics in color change of anther of the flower bud stage development of the same genotype and variation of microspore size among the genotypes V11, V13, and V15. The highest number of microspores per anther was presented in genotype V11 (30,400). The ratio of microspore developmental stage changed in line with flower bud development stage with the highest percentage of late-uninucleate (44.64%) at flower bud size between 1.31 to 1.51 cm, and there was no change in color of anther. Microspore viability ranged between 40 and 60%, and the highest percentage shown by genotype V11. Microspore development phase of T3 (bud size <1.50 cm, white anther color) had potential for further testing. The selected initiation media were M2 and M5, which will be examined further. Genotype V11 designated as a major donor plant, while the other potential genotypes were V13 and V15. The results of this study are useful as a first step to develop anther culture protocol on carnation.

Keywords: *Dianthus* sp.; Anther culture; Initiation medium; Donor plants

Tanaman hias umumnya diperbanyak secara vegetatif dengan konstitusi genetik yang heterozigot. Kondisi ini yang menyebabkan sulit untuk memprediksi hasil persilangan yang dituju terutama karakter warna, corak bunga,

dan karakter penting lain. Biasanya apabila telah diperoleh generasi F1, tanaman diseleksi dan diperbanyak secara klonal, tanpa melihat lagi pewarisan karakter-karakter penting pada tanaman tersebut. Akibatnya sulit menentukan

trend masa depan, karena tetap bergantung pada hasil yang diperoleh saat itu. Perakitan tanaman hibrida pada tanaman hias dimungkinkan apabila diperoleh tanaman yang homozigot.

Teknik kultur jaringan anyelir sudah banyak dikembangkan, di antaranya ialah regenerasi tanaman dari daun dan batang (Jethwani dan Kothari 1996, Watad *et al.* 1996, Kantia dan Kothari 2002), induksi embriogenesis somatik langsung dari daun dan petal (Nakano dan Mii 1992, Yantcheva *et al.* 1998, Pareek dan Kothari 2003, Karami *et al.* 2006) yang menghasilkan tanaman diploid yang heterozigot. Eksplan lain yang dapat digunakan ialah anter dan ovul. Meskipun kultur anter dilakukan untuk induksi somatik embriogenesis pada beberapa spesies tanaman (Achar 2002, Germana 2003, Kikkert *et al.* 2005, Rimberia *et al.* 2005), tetapi hanya sedikit hasil penelitian mengenai kultur anter anyelir yang dilaporkan (Dolcet-Sanjuan *et al.* 2001).

Teknik kultur anter dan/atau mikrospora merupakan salah satu teknik kultur jaringan yang telah diaplikasikan secara meluas pada tanaman sereal (Dunwell 1996, Sopory dan Munshi 1996) untuk mendapatkan tanaman homozigot. Namun aplikasinya pada tanaman hias sampai saat ini masih terbatas. Beberapa tanaman hias yang dilaporkan menggunakan teknik ini, di antaranya ialah lily (van den Bulk *et al.* 1992, Han *et al.* 1997), tulip (van den Bulk *et al.* 1994), bunga matahari (Coumans dan Zhong 1995), petunia (Mohan dan Bhalla-Sharin 1997), dan *Camelia japonica* (Pedroso dan Pais 1997). Namun hasil penelitian Fu *et al.* (2008) pada tanaman anyelir melaporkan bahwa pada kultur anter anyelir terjadi pembelahan sel anter dan diperoleh tanaman, tetapi hasil analisis sitologi tidak mendapatkan sel yang haploid. Hal itu disebabkan semua tanaman yang dihasilkan secara histologi berasal dari dinding sel anter, dengan konstitusi genetik diploid dan tetraploid.

Aplikasi teknologi kultur anter pada tanaman anyelir tergolong sesuatu yang baru, maka pengembangan penelitian ini berawal dari studi tanaman donor, kajian khusus mengenai biologi bunga dan perkembangannya (morfologi maupun mikroskopi), studi perkembangan mikrospora, metode isolasi, pemilihan pra-perlakuan yang optimal, pengembangan medium

inisiasi, regenerasi dan pemasakan embrio, studi perkecambahan embrio, analisis ploidi, dan penggandaan kromosom menjadi hal penting yang perlu dikaji dan dipelajari dalam penelitian ini.

Tahap awal studi ini diarahkan untuk mengungkap perkembangan biologi bunga secara morfologi terkait dengan penampilan fisik bunga (ukuran panjang, lebar diameter bunga, waktu bunga mekar, dll.) dan mikroskopi (jumlah mikrospora, ukuran, dan viabilitasnya), rasio tahap perkembangan mikrospora, seleksi tahap perkembangan mikrospora dan studi beberapa medium inisiasi. Kegiatan pada tahap ini memiliki tujuan (1) mengetahui tahap perkembangan bunga, mikrospora, dan viabilitasnya dan (2) mendapatkan teknik isolasi dan medium inisiasi yang potensial untuk kultur anter/mikrospora pada anyelir.

Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini ialah bahwa (1) data morfologi bunga, mikrospora dan viabilitasnya dapat diperoleh melalui kajian organ reproduksi dan (2) minimal terdapat satu teknik isolasi dan medium inisiasi yang potensial untuk pengembangan teknologi haploid pada anyelir melalui kultur anter dan/atau mikrospora. Dari penelitian ini diharapkan tersedia data dan teknologi awal untuk pengembangan kultur anter dan/atau mikrospora anyelir.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan dan Rumah Sere Anyelir, Balai Penelitian Tanaman Hias, Segunung serta Laboratorium *Microtechnique*, Departemen Agronomi, Institut Pertanian Bogor, mulai September 2009 sampai dengan Oktober 2010. Bahan tanaman yang digunakan yaitu stek pucuk dari lima genotip *D. chinensis* berumur lebih dari 4 bulan, yaitu V11 (warna pink), V12 (warna merah), V13 (warna ungu), V14 (dua warna merah/ungu), dan V15 (Picotee/Telstar) yang ditanam di Rumah Sere Anyelir di Kebun Percobaan Tanaman Hias Cipanas dengan ketinggian 1.100 m dpl.

Studi Tahap Perkembangan Bunga

Studi biologi bunga difokuskan untuk mengetahui perkembangan bunga sejak inisiasi kuncup hingga bunga mekar sempurna.

Pengamatan dilakukan pada tujuh tahap/ukuran kuncup bunga. Tahap pertama (T1) dimulai dari kuncup bunga berumur 4 hari setelah inisiasi bunga dan tahap kedua (T2) ialah 5 hari setelah inisiasi bunga dan seterusnya setiap hari sampai tahap T7. Berbagai parameter morfologi menyangkut ukuran kuncup bunga (panjang, lebar, tinggi, dan diameter) dari berbagai tanaman donor diamati dan diukur. Studi biologi ini melibatkan aplikasi histologi sederhana (baik irisan lintang maupun membujur) dan pewarnaan (fuchsin, carmine, safranin, yodium) untuk membantu memperjelas pengamatan. Studi ini dikomparasi langsung dengan studi tahap perkembangan mikrospora.

Penghitungan Jumlah dan Ukuran Mikrospora

Untuk menghitung jumlah mikrospora, 2-3 anter (tahap T4) dipanen, seluruh mikrospora dikeluarkan dari kotak spora, kemudian dilarutkan dalam 1 ml medium MS0. Suspensi mikrospora dibuat sehomogen mungkin melalui penggojokan menggunakan vortex. Setelah cukup homogen, sampel dipipet dan diletakkan di atas hemacytometer, selanjutnya ditutup dengan gelas penutup dan diamati di bawah mikroskop untuk menghitung jumlah mikrospora. Mikrospora dihitung menggunakan rumus (Godini 1979)

$$A = (n \times B) / N$$

di mana :

n = Jumlah mikrospora dalam setiap kotak,

B = 10.000/jumlah kotak yang dihitung,

N = Jumlah anter yang digunakan, sedangkan ukuran mikrospora diukur menggunakan mikrometer okuler yang dikalibrasi.

Pengukuran dilakukan sebanyak mungkin mewakili jumlah mikrospora secara keseluruhan. Hasil penghitungan dan pengukuran selanjutnya ditampilkan dalam bentuk data rerata dan standar deviasinya untuk setiap tanaman donor.

Studi Rasio Tahap Perkembangan Mikrospora

Tahap perkembangan mikrospora diamati melalui pengecatan DNA yang ada di dalam inti sel menggunakan 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Sebanyak 25 µl larutan mikrospora dimasukkan dalam *ependorf* kecil, kemudian disentrifugasi pada 4.000 rpm selama 2-4 menit.

Supernatan dipipet hingga hanya tersisa pelet dan sesedikit mungkin supernatan, ditambah 12,5µl larutan kerja DAPI (0,002%), dan diaduk merata. Campuran mikrospora dan larutan DAPI dipipet dan diletakkan di atas kaca obyek, kemudian ditutup dengan gelas penutup dan dibiarkan minimal 4 jam pada suhu 4°C. Setelah diinkubasi, mikrospora diamati di bawah mikroskop UV pada perbesaran 200 dan 400x. Tahap perkembangan yang diamati ialah *uninucleate* (*early*, *middle*, dan *late*) dan *binucleate*. Pada setiap tahap tersebut dilakukan penghitungan jumlah mikrospora dan dibagi dengan jumlah seluruh sel mikrospora yang diamati dikalikan 100 untuk mengetahui persentasenya. Pengamatan dilakukan minimal pada lima bidang pandang dan diulang minimal lima kali untuk mendapatkan data yang valid.

Uji Viabilitas Mikrospora

Pengujian viabilitas sel mikrospora/polen menggunakan *fluorescen diacetate* (FDA). Larutan mikrospora (90 µl) ditempatkan ke dalam *ependorf* yang telah dibungkus dengan aluminium ditambah 10 µl larutan stok 0,1% FDA ke dalam larutan kultur mikrospora dan diaduk merata, kemudian ditempatkan ke dalam ruang gelap selama 10 menit. Sebanyak 50-100 µl larutan mikrospora yang telah diberi perlakuan FDA dipipet dan ditempatkan di atas kaca obyek dan ditutup dengan kaca penutup, dan segera dilakukan pengamatan di bawah mikroskop fluorescen. Jumlah mikrospora yang memendarkan warna hijau diamati dan dihitung. Pengamatan diulang minimal pada lima bidang pandang pengamatan. Viabilitas sel (%) dihitung dengan membagi jumlah total sel yang fluorescen dengan jumlah total sel yang diamati pada satu bidang pandang dikalikan 100%.

Tahap Perkembangan Kuncup Bunga pada Berbagai Medium Inisiasi

Empat tahap perkembangan kuncup bunga yang diuji dalam kegiatan ini yaitu (1) kuncup satu (T2), dominan mikrospora berada dalam kondisi *tetrad*, (2) kuncup dua (T3), dominan mikrospora berada dalam kondisi *early* dan *middle uninucleate*, (3) kuncup tiga (T4), dominan mikrospora berada pada tahap *late uninucleate*, dan (4) kuncup empat (T5), dominan mikrospora berada pada tahap *early binucleate*. Mikrospora pada tiap tahap tersebut ditanam pada lima medium untuk

pengujian induksi kalus dan/atau embrio, yaitu (1) M1 (Winarto 2009), (2) M2 (Nontaswatsri *et al.* 2007), (3) M3 (Mosquera *et al.* 1999), (4) M4 (Sato *et al.* 2000), dan (5) M5 (Fu *et al.* 2008) (Tabel 1). Tiap unit perlakuan diulang 10 kali. Setiap ulangan terdiri atas satu cawan petri yang berisi 10 anter.

Seleksi Tanaman Donor dan Medium Inisiasi

Lima tanaman donor *D. chinensis* pada tahap *late uninucleate* diuji kesesuaiannya sebagai tanaman donor untuk pengembangan teknologi kultur anter dan/atau mikrospora pada anyelir. Kelima tanaman donor yang diuji dalam studi ini yaitu (1) V11, (2) V12, (3) V13, (4) V14, dan (5) V15, sedangkan lima medium induksi kalus dan/atau embrio yang diuji yaitu (1) M1 (Winarto 2009), (2) M2 (Nontaswatsri *et al.* 2007), (3) M3 (Mosquera *et al.* 1999), (4) M4 (Sato *et al.* 2000), dan (5) M5 (Fu *et al.* 2008) (Tabel 1). Tiap unit perlakuan diulang 10 kali. Tiap ulangan terdiri atas satu cawan petri yang berisi 10 anter.

Inkubasi kultur dilakukan di ruang gelap selama $\pm$ 1-2 bulan pada suhu $24\pm 1^\circ\text{C}$. Semua kultur menggunakan sistem medium *double layer* yang terdiri atas medium padat di bagian bawah dengan volume 3 ml dan bagian atas medium cair dengan volume 2 ml. Pengamatan dilakukan

terhadap tingkat kontaminasi dan respons dari masing-masing perlakuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Studi Tahap Perkembangan Bunga

Hasil studi ini menunjukkan bahwa dari lima genotip *D. chinensis* yang digunakan memiliki kecepatan antesis yang relatif sama, yaitu berkisar antara 14-16 hari setelah inisiasi yang ditandai dengan pecahnya anter. Hasil pengamatan pada jumlah anter menunjukkan bahwa lima genotip yang digunakan pada umumnya memiliki jumlah anter yang sama yaitu 10.

Pada fase awal perkembangan bunga, petal, dan anter berwarna putih, kemudian pada tahap pertumbuhan selanjutnya warna petal berubah sesuai dengan warna petal. Warna anter berubah dari putih menjadi ungu muda dan pada saat masak menjadi ungu tua. Perubahan warna anter merupakan karakter yang stabil yang terjadi pada fase pertumbuhan kuncup bunga keempat pada semua genotip yang diamati. Perubahan warna dapat digunakan sebagai penanda untuk mendapatkan ciri spesifik pada saat yang tepat untuk pengambilan tanaman donor.

Tabel 1. Komposisi medium yang digunakan untuk induksi kultur anter (*Medium composition for initiation of anther culture*)

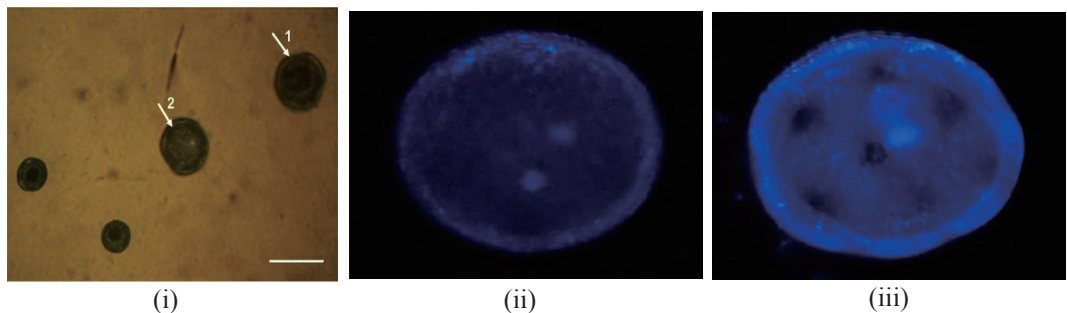
Komponen (Component)	Media (Medium), mg/l				
	M1	M2	M3	M4	M5
Makro	MMS	MS	MS	MS	MS
Mikro	MMS	MS	MS	MS	MS
FE-chelate	MS	MS	MS	MS	MS
L glutamin	-	-	-	-	400
Casein hidrolisat	-	-	-	-	400
Myo-inositol	110	100	100	100	100
Thiamin-HCl	0,5	0,1	0,1	0,1	0,1
Piridoxin-HCl		0,5	0,5	0,5	0,5
Niacin		0,5	0,5	0,5	0,5
L-Prolin	-	-	-	-	103,77
Glisin		2	2	2	2
2,4-D			1,00		2,00
NAA	0,01	0,10	-	0,35	-
TDZ	0,50	1,00	-	-	-
BAP BA	1,00	-	1,00	1,00	1,00
Sukrosa	30.000	20.000	20.000	60.000	30.000
Gelrite	2.600	2.600	2.600	2.600	2.600

Hasil pewarnaan campuran antara fuchsin dan metilen-blue pada mikrospora fase kuncup T1 banyak didominasi oleh fase sel induk mikrospora (*pollen mother cell*) dan *tetrad*. Pada fase kuncup T2 didominasi oleh tahap mikrospora berinti tunggal di tengah (*mid uninucleate*) dan fase kuncup T3 didominasi oleh *late uninucleate*, sedang fase kuncup T4, yaitu fase terjadinya perubahan warna polen bentuk tahap awal pembentukan mikrospora berinti dua (*early binucleate*) mulai muncul. Namun dengan pewarnaan yang ada tidak mampu melihat inti *binucleate*, yang ada hanyalah mikrospora dengan inti tunggal berukuran besar (Gambar 1 i). Hasil penelitian Fu et al. (2008) pada tanaman yang sama juga ditemukan dua ukuran mikrospora. Menurut Fu et al. (2008) mikrospora berukuran besar merupakan bentuk mikrospora $2n$, tetapi tidak didukung oleh data yang akurat. Terdapat dua kemungkinan mikrospora berukuran besar tersebut, yaitu *binucleate* (n) atau mikrospora dengan dua inti identik (n). Dengan pewarnaan DAPI bentuk inti antara mikrospora *binucleate* n dengan mikrospora dengan dua inti identik tampak berbeda (Gambar 1 iii dan iv).

Perubahan program gametofit jantan yang normal ke perkembangan embriogenesis butir polen ditentukan oleh faktor genetik, fisiologi, dan lingkungan. Menurut Nitsch (1974) dalam Grando dan de Moraes. (1997) sinyal penyimpangan dari lintasan perkembangan polen normal menjadi lintasan embriogenik ialah adanya gangguan

pembelahan selular pada mitosis pertama yang menghasilkan dua sel dengan ukuran inti yang sama. Pada tanaman tembakau terdapat dua kelas butiran polen, yaitu polen normal dan *atypical* (Sunderland dan Wicks 1971). Menurut Heberle-Bors dan Reinert (1979) polen *atypical* disebut juga dengan *pre-mitotic pollen* (*p-pollen*). Pada polen normal pembentukan sitoplasma terjadi sangat intensif diikuti pembelahan meiosis pertama, sedangkan pada *p-pollen* tidak terjadi (Sunderland 1978). Biasanya *p-pollen* memiliki lapisan luar mikrospora (*exine*) yang lebih tipis, sitoplasma lemah, ribosom lebih sedikit, mitokondria terkondensasi, dan diferensiasi gametofitik yang tertekan. Pada tanaman tembakau *p-pollen* ini merupakan bentuk dari sterilitas jantan (Heberle-Bors 1982). *P-pollen* tembakau terinduksi oleh suhu dan panjang hari sebelum atau selama meiosis dari sel induk mikrospora.

Pada tanaman *Datura metel* jumlah ribosom pada fase *early uninucleate* berkurang pada saat terbentuk vakuola (Sangwan dan Camefort 1982). Menurut Sunderland (1978) dua inti polen identik yang merupakan hasil dari berkurangnya pembentukan vakuola, juga kompeten untuk androgenesis, karena eliminasi tahap akhir sporofitik tidak terjadi. Seperti diketahui bahwa sitoplasma dari *p-pollen* menjaga molekul sporofitik yang informatif, sementara polen yang normal mengeliminasi molekul tersebut, karena mampu melalui lintasan gametofitik.



Gambar 1. (i) Pewarnaan mikrospora fuchsin + metilen-blue (1:1) dan DAPI (*Microspore staining with fuchsin + metilen-blue (1:1) and DAPI*), (ii) mikrospora dengan dua inti identik (*two identic nucleus binucleate*), (iii) mikrospora fase *binucleate* dengan inti vegetatif (warna pudar) dan inti generatif (warna terang) (*nucleus consist of vegetative and generative cell*), 1) mikrospora berinti 1 (*single nucleus*), 2) mikrospora tidak berinti (*microspore without nucleus*), 3: *two identic nucleus*, Bar = 25 μ m

Tabel 2. Jumlah mikrospora per anter tiga genotip *D. chinensis* (Microspore number per anther of three *D. chinensis* genotypes)

Genotip (Genotypes)	Jumlah mikrospora per anter (Microspore number per anther)	
	Kisaran (Range)	Rerata (Average)
V11	10.000-64.000	30.400 ± 16.297,24
V13	4.000-40.000	21.200 ± 10.840,25
V14	4.000-32.000	23.200 ± 10.799,18

Data dihitung dari rerata 10 kali isolasi pada lima bidang pengamatan (Data was counted from the average of 10 times isolation with five times observation)

Penghitungan Jumlah dan Ukuran Mikrospora

Hasil pengamatan yang dilakukan pada tiga sampel genotip diketahui bahwa rerata jumlah mikrospora berkisar antara 4.000-64.000 (Tabel 2). Dua genotip (V12 dan V15 tidak ditampilkan karena data tidak valid). Jumlah mikrospora yang terkandung dalam anter dapat berpengaruh terhadap jumlah anter yang harus diisolasi dan terkait dengan kepadatan anter dalam kultur. Kepadatan anter memiliki pengaruh fisik dan biokimia pada pembentukan embrio. Pada kepadatan yang rendah anter memisah pada medium, sedang pada kepadatan yang tinggi cenderung mengelompok.

Kecenderungan anter untuk melekat satu sama lain memfasilitasi pergerakan substansi di antara mereka atau melindungi anter menempel pada dinding cawan petri (Keller 1984, Hoekstra *et al.* 1993, dan Arnison *et al.* 1990). Pada *Brassica* jumlah anter 6 per ml medium merupakan

kepadatan yang optimal (Keller 1984), sedangkan pada tanaman padi kepadatan anter yang diperlukan yaitu 3 per ml medium. Menurut Huang *et al.* (1990) kepadatan kultur mikrospora pada *Brassica napus* yaitu $3-4 \times 10^4$ mikrospora per ml dan pada jagung $6-8 \times 10^4$ mikrospora per ml (Gaillard *et al.* 1991).

Besarnya ukuran mikrospora diketahui menggunakan mikrometer okuler. Hasil pengamatan pada dua sampel genotip diperoleh tiga macam kisaran ukuran, yaitu besar dengan ukuran $>20 \mu\text{m}$, sedang dengan ukuran $15-20 \mu\text{m}$, dan ukuran kecil $<15 \mu\text{m}$. *Dianthus chinensis* memiliki ukuran mikrospora yang bervariasi dari kecil, sedang, dan rendah.

Studi Rasio Tahap Perkembangan Mikrospora

Hasil pengamatan pada kuncup bunga diperoleh lima fase perkembangan kuncup bunga yang disesuaikan dengan perkembangan

Tabel 3. Rasio tahap perkembangan mikrospora berdasarkan ukuran kuncup bunga dan warna anter (Ratio of microspore development based on bud size and anther color)

Fase anter (Anther stage)	Karakteristik (Characteristic)		Rasio tahap perkembangan mikrospora (Ratio of microspore development), %				
	Ukuran kuncup (Bud size) (cm)	Warna anter (Anther color)	EU	MU	LU	EB	B
T2	1,20 - 1,30	Putih	5,10	67,35	27,55	0	0
T3	1,31 - 1,50	Putih	3,57	33,93	44,64	17,86	0
T4	1,51 - 1,60	Putih	6,76	10,81	29,73	35,14	17,57
T5	1,61 - 1,70	30% ungu muda, ujung kuncup muncul petal warna putih	1,30	19,48	20,78	20,78	37,66
T6	$>1,71$	$>50\%$ ungu muda, petal berubah warna sesuai warna bunga	0	16,67	20,00	21,67	41,67

Data diambil dari rerata lima kali isolasi pada lima bidang pengamatan (Data was counted from the average of five times isolation with five times observation). EU = early uninucleate, MU = mid uninucleate, LU = late uninucleate, EB = early binucleate, B = binucleate

mikrospora, yaitu fase T2 (ukuran kuncup bunga 1,20-1,30 cm, anter warna putih), fase T3 (ukuran kuncup bunga 1,31-1,50 cm, anter warna putih), fase T4 (ukuran kuncup bunga 1,51-1,60, anter warna putih), fase T5 (ukuran kuncup bunga 1,61-1,70 cm, 30% anter ungu muda, ujung kuncup muncul petal warna putih), fase T6 (ukuran kuncup bunga >1,71 cm, >50% ungu muda, petal berubah warna sesuai warna bunga). Pada Tabel 3 terlihat bahwa fase anter T2 didominasi oleh mikrospora *mid-uninucleate*, selanjutnya pada fase T3 didominasi oleh *late-uninucleate*, dan fase T4 masuk pada dominan *early binucleate*.

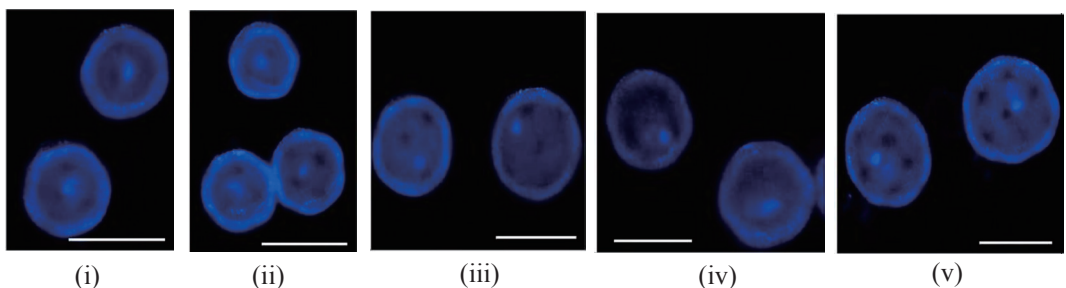
Pada banyak kasus tahap *uninucleate* sampai *early binucleate* (Gambar 2 iv) merupakan tahap paling responsif untuk menginduksi perubahan mikrospora dari perkembangan gametofit (membentuk polen) ke perkembangan sporofit (membentuk embrio/kalus) akibat stres lingkungan pada beberapa perlakuan yang diberikan (Palmer dan Keller 2005). Tahap ini merupakan tahap yang kompeten di mana sel-sel mikrospora memiliki respons yang tinggi terhadap induksi stres yang diberikan. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa fase T3 merupakan fase yang optimal untuk diinduksi, karena memiliki fase *late-uninucleate* paling tinggi. Namun setiap kultivar memiliki potensi yang berbeda, sehingga hasil ini perlu diuji lebih lanjut.

Uji Viabilitas Mikrospora

Pada pengamatan ini, mikrospora yang viabel ditunjukkan oleh tingkat fluorescen yang tinggi setelah pengecatan FDA, sementara

mikrospora yang nonviabel ditunjukkan oleh tingkat fluorescen yang rendah. Hal yang menarik, mikrospora memiliki ukuran besar yang memancarkan warna hijau, tetapi di sini berwarna coklat kehitaman (Gambar 3), walaupun tidak semua mikrospora berukuran besar berwarna coklat kehitaman, ada juga yang berwarna terang (ditandai dengan tanda panah putih). Warna coklat kehitaman ini diduga merupakan polen yang mengalami degenerasi, sehingga inti tidak terbentuk. Hasil uji viabilitas pada tanaman uji sangat rendah (Tabel 4). Dua genotip yaitu V12 dan V14 jarang dijumpai warna coklat kehitaman, namun jumlah mikrospora yang dihasilkan dari anter sangat sedikit.

Hasil uji viabilitas mikrospora menunjukkan bahwa rerata mikrospora viabel berkisar antara 44-60%. Persentase viabilitas tertinggi ditunjukkan oleh genotip V11, kemudian diikuti oleh V13. Uji viabilitas ini terkait dengan jumlah anter yang harus ditanam. Apabila rerata viabilitas 50%, maka jumlah anter yang harus ditanam dua kali jumlah prediksi optimalnya. Misalnya jika mengacu pada kepadatan mikrospora *Brassica* optimal 30.000-40.000 per ml, dengan jumlah mikrospora per anter rerata 30.000, viabilitas 50%, maka bila dalam cawan petri 6 cm berisi 5 ml medium, jumlah anter yang harus ditanam yaitu 10-13 anter. Untuk *Dianthus* sp. jumlah anter yang tepat perlu diuji lebih lanjut, karena kepadatan suatu kultur bergantung dari kualitas materi misalnya persentase mikrospora yang embriogenik yang dipengaruhi oleh *pretreatment* dan metode isolasinya (Sopory dan Munshi 1996).

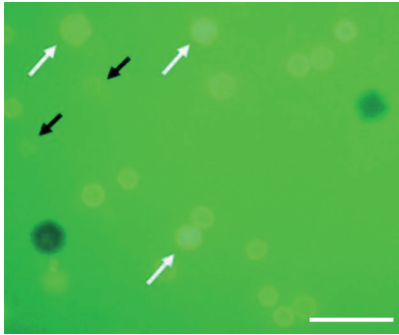


Gambar 2. Tahap perkembangan mikrospora anter *D. chinensis* (Microspore development stage of *D. chinensis*): (i) *early-uninucleate* (ii) *middle-uninucleate*, (iii) *late-uninucleate*, (iv) *early-binucleate* (v) *binucleate*. Bar =15 μ m

Tabel 4. Viabilitas mikrospora lima genotip *Dianthus* sp. (*Microspore viability of five *Dianthus* sp.*)

Genotip (<i>Genotypes</i>)	Viabilitas mikrospora (<i>Microspore variability</i>), %			
	Viabel (<i>Viable</i>)		Nonviabel (<i>Nonviable</i>)	
	Kisaran (<i>Range</i>)	Rerata (<i>Average</i>)	Kisaran (<i>Range</i>)	Rerata (<i>Average</i>)
V11	35,29 - 86,21	60,36 ± 10,73	13,79 - 64,71	39,64 ± 10,73
V12	33,33 - 100,00	56,72 ± 36,15	0,00 - 80,00	43,28 ± 36,15
V13	48,91 - 60,61	57,85 ± 7,93	35,96 - 51,09	42,15 ± 7,93
V14	31,58 - 90,91	44,91 ± 21,51	9,09 - 68,42	55,09 ± 21,51
V15	26,21 - 85,19	55,02 ± 22,26	14,81 - 73,79	44,98 ± 22,26

Data dihitung dari rerata lima kali isolasi diulang tiga kali setiap pengamatan pada masing-masing genotip (*Data was counted from the average of five times isolation with three times observation each genotype*)



Gambar 3. Hasil pengecatan dengan FDA (*FDA staining*), mikrospora besar dengan warna terang/viabel (tanda panah putih), mikrospora dengan warna pudar/nonviabel (tanda panah hitam) (*Big viable microspore (white arrow), non viable microspore (black arrow)*), Bar = 50 μ m

Tahap Perkembangan Mikrospora pada Berbagai Medium Inisiasi

Pada studi ini diuji empat fase perkembangan kuncup bunga hasil studi sebelumnya pada berbagai medium inisiasi. Fase T2 merupakan fase dengan panjang kuncup bunga di bawah 1,50 cm (fase dominan tahap *mid-late uninucleate*), fase T3 dengan ukuran kuncup bunga 1,51-1,60 cm (fase dominan tahap *early binucleate*). Fase T4 yaitu fase dengan ukuran kuncup bunga antara 1,61-1,70 cm, 30% (fase tahap *early binucleate-binucleate*) dan T5 fase dengan ukuran kuncup bunga lebih dari 1,71 cm (fase dominan *binucleate*). Berdasarkan pada hasil studi sebelumnya, dalam satu cawan petri dengan ukuran 6 cm dan volume 2 ml medium cair pada sistem *double layer* berisi 10 anter. Dalam satu

cawan petri ditanam 10 anter yang berasal dari satu kuncup bunga. Hasil yang diperoleh belum dapat dianalisis secara statistik, karena belum diperoleh embrio atau kalus. Analisis hasil hanya bersifat observatif dengan mengamati *browning* dan kontaminasi saja. Dari studi ini diperoleh bahwa fase T2 yang memiliki anter dengan *browning* terkecil dan tertinggi fase T4 (Tabel 5). Makin lanjut fase kuncup bunga, makin tinggi kontaminasi dan *browning*. Pada umumnya kontaminasi kultur anter akibat munculnya bakteri pada minggu kedua setelah tanam. *Browning* terjadi mulai minggu kedua terutama pada fase T4 dan T5. Fase T4 dan T5 mengandung anter dengan warna ungu, yang pada umumnya paling cepat mengalami degenerasi.

Dari lima macam medium yang diuji, medium M5 merupakan medium yang paling sedikit menyebabkan *browning*, kemudian diikuti oleh medium M2 dan M3. Pada medium M2 kontaminasi sangat tinggi, sehingga memengaruhi kualitas eksplan. Pada medium yang mengalami kontaminasi ditemukan *browning* pada eksplan (Gambar 4 i). Hal ini dapat mengaburkan hasil, karena *browning* dapat terjadi akibat medium yang tidak sesuai atau karena pengaruh kontaminasi.

Browning kemungkinan terjadi karena adanya akumulasi komponen fenolik pada eksplan di mana terjadi proses perubahan adaptif bagian tanaman akibat adanya pengaruh fisik dan biokimia (memar, pengupasan, pemotongan, serangan penyakit, atau kondisi yang tidak normal), bisa juga merupakan gejala alamiah dari proses penuaan. Menurut Sheeler dan Bianchi (1987), bagian sel tanaman yaitu vakuola sebagai tempat untuk penyimpanan air dan produk-produk sel khususnya metabolit sekunder termasuk

Tabel 5. Respons empat fase perkembangan mikrospora genotip V11 (donor terseleksi) pada berbagai medium inisiasi terhadap pencoklatan (*Response of four development phase of V11 genotype (selected donor) microspore stage in different initiation medium to the browning*)

Fase kuncup bunga (Bud stage)	Media (Medium)					Rerata pencoklatan (Average of browning)
	M1	M2	M3	M4	M5	
	 %					
T2	10	0	20	20	0	10
T3	50	30	20	50	30	36
T4	70	70	70	70	50	66
T5	60	50	40	70	50	54
Rerata (Average)	47,5	37,5	37,5	52,5	32,5	
Fase kuncup bunga (Bud stage)	Media (Medium)					Rerata pencoklatan (Average of browning)
	M1	M2	M3	M4	M5	
	 %					
T2	10	40	20	10	40	24
T3	90	70	60	60	60	68
T4	70	70	60	60	40	60
T5	50	50	40	70	50	52
Rerata (Average)	55	57,5	45	50	47,5	

Data merupakan rerata dari 10 ulangan (*Data was counted from average of 10 replications*)

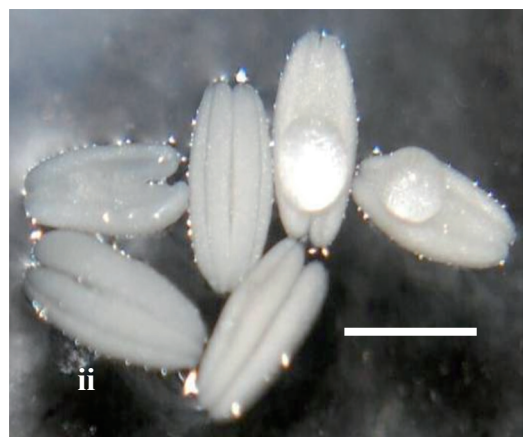
fenol. Di dalam pemotongan jaringan, vakuola terpotong dan mengeluarkan fenol yang bereaksi dengan enzim fenol oksidase di dalam sitosol, sehingga terbentuk kuinon yang menyebabkan warna coklat dan beracun.

Dari hasil pengamatan, fase T2 dari tahap perkembangan mikrospora merupakan tahap dominasi *mid-late uninucleate* yang memiliki potensi untuk diuji lebih lanjut, karena memiliki

persentase *browning* yang paling rendah. Medium M2 dan M5 pada fase tersebut sama sekali tidak menyebabkan *browning* pada anter. Selanjutnya fase T2 ini yang digunakan untuk uji selanjutnya untuk seleksi genotip.

Seleksi Tanaman Donor pada Berbagai Medium Inisiasi

Berdasarkan hasil seleksi fase perkembangan mikrospora pada berbagai medium inisiasi,



Gambar 4. Eksplan kultur anter (*Anther culture explant*), (i) Pencoklatan pada anter (*Browning of anther*), (ii) Anter yang tumbuh normal (*Normal growth of anther*). Bar 2 mm.

Tabel 6. Respons genotip pada berbagai medium inisiasi terhadap kontaminasi dan pencoklatan (*Response of genotypes in different initiation medium to the contamination and browning*)

Genotip (<i>Genotypes</i>)	M1		M2		M3		M4		M5		Rerata (<i>Average</i>)	
	K	B	K	B	K	B	K	B	K	B	K	B
	%											
V11	22,2	61,7	20,0	42,0	30,0	50,0	30,0	76,0	30,0	60,0	26,4	57,9
V12	16,7	77,7	33,3	0,0	16,7	40,0	0,0	47,5	16,7	50,0	16,7	43,0
V13	25,0	60,0	12,5	27,5	0,0	100,0	37,5	80,0	37,5	0,0	22,5	53,5
V14	42,9	55,0	28,6	83,3	14,3	53,3	28,6	83,3	0,0	25,0	22,9	60,0
V15	16,7	75,0	16,7	20,0	33,3	0,0	33,3	100,0	16,7	0,0	23,3	39,0
Rerata (<i>Average</i>)	24,7	65,9	22,2	34,6	18,9	48,7	25,9	77,4	20,2	27,0		

K = Kontaminasi (*Contamination*); B = Pencoklatan anter (*Browning anther*)

pengujian dilanjutkan terhadap seleksi tanaman donor pada berbagai medium inisiasi. Semua medium inisiasi digunakan lagi untuk mengantisipasi perbedaan respons setiap genotip. Setiap genotip memberikan respons yang berbeda terhadap medium yang digunakan.

Secara umum dapat dinyatakan bahwa rerata medium M5 menghasilkan *browning* pada anter yang paling rendah (27%) dibanding medium yang lain. Bahkan pada genotip V13 dan V15 tidak terjadi *browning*, diikuti oleh medium M2 (34,6%). Medium M4 merupakan medium yang paling tinggi terjadinya *browning* (77,4%) (Tabel 6). Tingginya *browning* akibat dari akumulasi komponen fenolik memberikan indikasi bahwa eksplan memerlukan *pretreatment* untuk mengatasi terjadinya *browning*. Dengan tingkat kontaminasi yang tinggi sulit mendapatkan hasil akhir yang akurat.

Seleksi genotip dan medium dilakukan berdasarkan pada kejadian *browning* dan kontaminasi yang rendah. Apabila dikaitkan dengan variabel pengamatan yang lain, di antaranya jumlah mikrospora dan viabilitas, serta karakter lain seperti mudah tidaknya dan kecepatan perbanyakannya, maka dipilih V11, V13, dan V15 untuk diuji lebih lanjut sebagai tanaman donor utama. Selain itu kecepatan tumbuh dan kerajinan berbunga genotip tersebut memudahkan untuk bahan uji selanjutnya.

KESIMPULAN

1. Lima genotip *D. chinensis* yang diuji memiliki kecepatan anthesis yang relatif sama, yaitu

berkisar antara 14-16 hari, memiliki ciri-ciri spesifik yaitu adanya perubahan warna pada anter fase perkembangan kuncup bunga yang sama dan pada genotip V11, V13, dan V15 memiliki ukuran mikrospora yang bervariasi.

2. Jumlah mikrospora per anter terbanyak ditemukan pada genotip V11 yaitu 30.400.
3. Rasio tahap perkembangan mikrospora berubah sejalan dengan perubahan tahap perkembangan kuncup bunga dengan persentase *late-uninucleate tertinggi* (44,64%) pada saat ukuran kuncup bunga antara 1,31- 1,51 cm, dan belum ada perubahan warna anter.
4. Viabilitas mikrospora berkisar antara 40-60% dan persentase tertinggi ditunjukkan oleh genotip V11.
5. Fase kuncup bunga T3 (ukuran kuncup 1,31 - 1,50 cm, warna anter putih) berpotensi untuk di uji lebih lanjut.
6. Medium inisiasi kalus dan/atau embrio dalam kultur anter yang dipilih adalah M2 dan M5 yang akan diuji lebih lanjut.
7. Genotip V11 ditetapkan sebagai tanaman donor utama, selanjutnya genotip lain yang berpotensi ialah V13 dan V15.

Implikasi dari penelitian ini ialah pentingnya penentuan genotip dan medium yang spesifik yang dapat memaksimalkan hasil yang akan diperoleh. Metode *shed microspore culture* tidak sesuai digunakan untuk menginduksi sel embrioid, sehingga perlu dicoba medium kultur padat.

Hasil seleksi genotip dan medium awal ini akan digunakan untuk penentuan metode selanjutnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Kementerian Pertanian yang telah membiayai penelitian ini; Pak Dayat dan Wahyu yang telah membantu pelaksanaan penanaman di lapangan, serta Eneng Yuniarti dan Ai Mintarsih yang telah membantu pelaksanaan penelitian di laboratorium.

PUSTAKA

- Achar, P.N. 2002. A Study of Factors Affecting Embryo Yields from Anther Culture of Cabbage. *Plant Cell Tiss Org. Cult.* 69: 183–188.
- Arnison, P.G., P. Donaldson, A. Jackson, C. Semple, and W. Keller. 1990. Genotype-specific Response of Cultured Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) Anthers to Cytokinins. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 20: 217–228.
- Coumans, M.P. dan D. Zhong. 1995. Doubled Haploid Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Plant Production by Androgenesis: Fact or Artifact? 1. *In Vitro* Isolated Microspore Culture. *Plant Cell, Tiss. and Org. Cult.* 41:203–209.
- Custers, J.B.M., J.H.G. Cordewener, M.A. Fier, B.T.H. Maassen, M.M. van Lookeren Campagne, and C.M. Liu. 2001. Androgenesis in *Brassica*: A Model Sistem to Study the Initiation of Plant Embryogenesis. In: Bhojwani, S.S and W.Y. Soh (Eds.). *Current Trends in the Embryology of Angiosperms*. Kluwer Academic Publications. Dordrecht. 451–470.
- Dolcet-Sanjuan R., E. Clavería, Llauradó, A. Ortigosa, and P. Arús. 2001. Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) Dihaploid Lines Resistant to *Fusarium oxysporum* f.sp. *Dianthi*. *Acta Hort.* 560:141–144.
- Dunwell, J.M. 1996. Microspore Culture. In: Mohan Jain, S., S.K. Sopory, and R.E. Veileux (Eds.). *In Vitro Haploid Production in Higher Plants*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht/Boston/London. 1: 177–245.
- Fu, X.P. S.H. Yang, and M.Z. Bao. 2008. Factors Affecting Somatic Embryogenesis in Anther Cultures of Chinese Pink (*Dianthus chinensis* L.). *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant.* 44:194–202.
- Gaillard, A., P. Vergne, and M. Beckert. 1991. Optimization of Maize Microspore Isolation and Culture Conditions for Reliable Plant Regeneration. *Plant Cell Rep.* 10(2): 55–58.
- Germanà, M.A. 2003. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Anther Culture of *Citrus aurantium* and *C. reticulata*. *Biologia.* 58:843–850.
- Godini, A. 1979. Counting Pollen Grains of Some Almond Cultivars by Means of a Haemocytometer of the Progetto Finalizzato C.N.R. *Istituto di coltivazioni Arboree, Università di Bari.* Paper no 153. p 83–86.
- Han, D.S., Y. Niimi, and M. Nakano. 1997. Regeneration of Haploid Plants from Anther Cultures of the Asiatic Hybrid Lily ‘Connecticut King’. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 47: 153–158.
- Grando, M.F and M.I.B de Moraes-Fernandes. 1997. Two Point Deterministic Model for Acquisition of In-Vitro Pollen Grain Androgenetic Capacity Based on Wheat Studies. *Brazilian J. Genet.* 20 (3):467–476.
- Heberle-Bors, E. 1982. In Vitro Pollen Embryogenesis in *Nicotiana tabacum* L. and Its Relation to Pollen Sterility, Sex Balance, and Floral Induction of Pollen Donor Plants. *Planta* 156:402–206.
- _____ dan J. Reinert. 1979. Androgenesis in Isolated Pollen Culture of *Nicotiana tabacum*: Dependence Upon Pollen Development. *Protoplasma* 99:237–245.
- Hoekstra S., M.H. van Zijderveld, F. Heidekamp, and F. van der Mark. 1993. Microspore Culture of *Hordeum vulgare* L.: The Influence of Density and Osmolarity. *Plant Cell Rep.* 12:661–665.
- Huang, B., S. Bird, R. Kemble, D. Simmonds, W.A. Keller, and B. Miki. 1990. Effects of Culture Density, Conditioned Medium and Feeder Cultures on Microspore Embryogenesis in *Brassica napus* L. c.v. Topas. *Plant Cell Rep.* 8:594–597.
- Indrianto A, E. Heberle-Bors, and A. Touraev. 1999. Assessment of Various Stresses and Carbohydrates for Their Effect on the Induction of Embryogenesis in Isolated Wheat Microspores. *Plant Sci.* 143:71–79.
- Jethwani, V. and S.L. Kothari. 1996. Phenylacetic Acid Induced Organogenesis in Cultured Leaf Segments of *Dianthus chinensis*. *Plant Cell Rep.* 15:869–872.
- Kantia, A., and S.L. Kothari. 2002. High Efficiency Adventitious Shoot Bud Formation and Plant Regeneration from Leaf Explants of *Dianthus chinensis* L. *Scientia Hort.* 96: 205–212.
- Karami, O., A. Deljou, M. Esna-Ashari, and P. Ostad-Ahmadi. 2006. Effect of Sucrose Concentrations on Somatic Embryogenesis in Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Scientia Hort.* 110:340–344.
- Karsai I, Z. Bedő, and P.M. Hayes. 1994. Effect of Induction Medium pH and Maltose Concentration on *In Vitro* Androgenesis of Hexaploid Winter Triticale and Wheat. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 39: 49–53.
- Keller, W.A. 1984. Anther Culture of *Brassica* spp. In I. K. Vasil *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, 1, Academic Press, New York. 825 pp.
- Kikkert, J., M. Striem, J. Vidal, Wallace P Barnard, and J. Reisch, B. 2005. Long-term Study of Somatic Embryogenesis from Anthers and Ovaries of 12 Grapevine (*Vitis* sp.) Genotypes. *In Vitro Cell Dev Biol Plant.* 41:1475–2689.
- Mohan Jain S. and N. Bhalla-Sarin. 1997. Haploidy in Petunia. In: Mohan Jain, S., S.K. Sopory, and R.E. Veileux (Eds.) *In Vitro Haploid Production in Higher Plants*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht/Boston/London. 5:53–71.

25. Mosquera T., L.E. Rodríguez A. Parra, and M. Rodríguez. 1999. In Vitro Adventive Regeneration from Carnation (*Dianthus caryophyllus*) Anther. *International Symposium on Cut Flowers in the Tropics*. ISHS Acta Hort. 482 pp.
26. Nakano, M., and M. Mii. 1992. Protoplast Culture and Plant Regeneration of Several Species in the Genus *Dianthus*. *Plant Cell Rep.* 11: 225-228.
27. Nontaswatsri C., K Uchiyama, and S. Fukai. 2007. Shoot Regeneration and Genetic Transformation of Regenerative Callus Culture in *Dianthus Hybrid* Telstar Scarlet. *Acta Hort.* (ISHS) 764: 165-168.
28. Palmer, C. and W. Keller. 2005. Overview of Haploidy: Haploids in Crop Improvement II. *Biotech. Agric. Forest* 56 :1-7.
29. Pareek, A. and S.L. Kothari. 2003. Direct Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Leaf Cultures of Ornamental Species of *Dianthus*. *Scientia Hort.* 98: 449-459.
30. Pedroso, M.C. and M.S. Pais. 1997. Anther and Microspore Culture in *Camellia japonica*. In Mohan Jain, S., S.K. Sopory and R.E. Veileux (Eds.): *In Vitro Haploid Production in Higher Plants*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht/Boston/London. 5:89-108
31. Rahman, M.H, R. Islam, M. Hossain, and M.S. Islam. 2010. Role of Sucrose, Glucose and Maltose on Conventional Potato Micropropagation. *J. Agric. Technol.* 6(4):733-739.
32. Rimerberia, F.K., H. Sunagawa, N. Urasaki, Y. Ishimine, and Adaniya. 2005. Embryo Induction via Anther Culture in Papaya and Sex Analysis of the Derived Plantlets. *Scientia Hort.* 103:199-208.
33. Roberts-Oehlschlager, S.L., J.M. Dunwell, and R. Faulks. 1990. Changes in the Sugar Content of Barley Anthers During Culture on Different Carbohydrates. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 22:77-85.
34. Sangwan, R S and H. Camefort. 1982. Ribosomal Bodies Specific to Both Pollen and Zygotic Embryogenesis in *Datura*. *Experientia*. 38: 395-397.
35. Sato S, N. Katoh, H. Yoshida, S. Iwai I, and M. Hagimori. 2000. Production of Doubled Haploid Plants of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) by Pseudofertilized Ovule Culture. *Scientia Hort.* 83,(3-4):301-310.
36. Sengsai, S., S. Peyachoknagul, P. Sripichitt, A. Thongpan, and P. Pongtongkam. 2007. Anther Culture of BC1F1 (KDML105//IRBB5/KDML105) Hybrid to Produce Bacterial Blight Resistance Doubled Haploid Rice. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 41: 51-261.
37. Sheeler, P. and D.G. Bianchi. 1987. *Cell and Molecular Biology*. John Wiley and Sons, Inc Canada.
38. Sopory, S.K. and M. Munshi. 1996. Anther Culture. In: Mohan Jain, S., S.K. Sopory, and R.E. Veileux (Eds.). *In Vitro Haploid Production in Higher Plants*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht/Boston/London. 1: 145-176.
39. Sunderland, N. and F. M. Wicks. 1971. Embryoid Formation in Pollen Grain of *Nicotiana tabacum*. *J. Exp. Bot.* 22: 213-216.
40. _____. 1978. Strategies in the Improvement of Yields in Anther Culture. In: ... (Eds) *Preceeding Symposium on Plant Tissue Culture*. Science Press, Peking. pp 65-86
41. van den Bulk. R.W., H.P.J. de Vries-van Hulten, and J.J.M. Dons. 1992. Formation of Multinucleate Lily Microspores in Culture. *Acta Hort.* 325:649-654.
42. _____, J.B.M. Custers, and J.J.M. Dons. 1994. Induction of Embryogenesis in Isolated Microspores of Tulip. *Plant Sci.* 104: 101-111.
43. Watad, A.A., A. Ahroni, A. Zuker, H. Shejtman, A. Nissim, and A. Vainstein. 1996. Adventitious Shoot Formation from Carnation Stem Segments: A Comparison of Different Culture Procedures. *Scientia Hort.* 65:313-320.
44. Winarto, B. 2009. Metode Kultur Anter: Upaya Terobosan Untuk Penyediaan Tanaman Haploid dan/atau Haploid Ganda pada *Anthurium*. *Disertasi* Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. 252 p.
45. Yantcheva, A., M. Vlanhova, and Antanassov. 1998. A. Direct Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Plant Cell Rep.* 18: 148-153.