

## Teknik Kultur Anther pada Pemuliaan Anthurium

Winarto, B. dan F. Rachmawati

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

Naskah diterima tanggal 24 Januari 2005 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 24 Juli 2006

**ABSTRAK.** Kultur anther merupakan teknik baru yang telah dikembangkan pada beberapa tanaman untuk mendapatkan galur murni melalui produksi tanaman haploid ganda. Keberadaan tanaman ini berpengaruh nyata terhadap perbaikan dan peningkatan efisiensi program pemuliaan dan perbenihan tanaman. Pada anthurium, teknik ini belum pernah dikembangkan dan dilaporkan, sehingga studi awal kultur anther bermanfaat untuk program pemuliaan dan perbenihan tanaman ini. Penelitian bertujuan mengetahui tahap perkembangan spadik, rasio tahap perkembangan mikrospora dan viabilitasnya, mendapatkan teknik isolasi anther dan medium inisiasinya yang potensial untuk kultur anther. Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan, Balai Penelitian Tanaman Hias dan Plant Research International, Wageningen-Belanda dari bulan Juni 2003 hingga Agustus 2005. Anthurium yang digunakan dalam penelitian adalah *Anthurium andreanum* Linden ex André. cv. Amigo, Carnaval, dan Tropical. Pengamatan secara periodik, pengecatan menggunakan DAPI dan FDA, pengembangan 4 teknik isolasi (T-1 s/d T-4), dan seleksi medium inisiasi dilakukan dalam percobaan ini. Dari hasil penelitian didapatkan bahwa 3 kultivar anthurium yang diuji memiliki karakter yang berbeda dalam hal waktu munculnya kepala putik, pemunculan putik tercepat terdapat pada kultivar Amigo, sedangkan waktu muncul serbuk sari relatif sama. Jumlah mikrospora per kotak spora terbanyak ditemukan pada kultivar Carnaval. Rasio tahap perkembangan mikrospora berubah seiring perubahan tahap perkembangan spadik dengan persentase *late-uninucleate* tertinggi (76%) tercatat saat spadik berada pada masa transisi. Viabilitas mikrospora berkisar antara 40-70% dengan persentase tertinggi (70%) ditunjukkan oleh kultivar Amigo. T-1 merupakan teknik isolasi yang potensial digunakan dalam mengembangkan kultur anther pada anthurium. Medium MMS merupakan medium yang paling potensial digunakan dalam kultur anther anthurium. Kultivar Tropical merupakan kultivar yang potensial digunakan sebagai tanaman model dalam kultur anther anthurium. Hasil-hasil tersebut bermanfaat dalam membuat protokol kultur anther pada anthurium.

Katakunci: *Anthurium andreanum*; Kultur anther; Teknik isolasi; Medium inisiasi.

**ABSTRACT.** Winarto, B. and F. Rachmawati. 2007. Development of Anther Culture Technique on Anthurium. Anther culture is a new technique developed on several plants in obtaining pure line of plant via double haploid plant production. The existence of such plant has significantly increased and improved plant breeding and seed production programs efficiency. In anthurium so far the techniques have not developed and reported yet, therefore this study is important and benefit for the plant in relation with improving the plant breeding and seed production programs. The research objectives were too find out the development stage of spadix, ratio of microspore development stages and their viability, to findout potential isolation technique and initiation medium for anther and/or microspore culture of anthurium. The study was conducted at Tissue Culture Laboratory of Indonesian Ornamental Crop Research Institute and Plant Research International, Wageningen, Netherlands, from June 2003 till August 2005. Anthurium used in the study was *Anthurium andreanum* Linden ex André. cv. Amigo, Carnaval, and Tropical. Periodical observation, DAPI and FDA staining, developing 4 isolation techniques (T-1 to T-4), and selection of initiation media were carried out during this research. Results of this study indicated that 3 anthurium cultivars had different characters with the fastest noticeable time of stigma observed in Amigo, while visible time of pollen was relatively similar. Higher number of microspore was recorded in Carnaval. Ratio of microspore development stages changed gradually dealing with alteration of spadix growth and high percentage of late-uninucleate stage (76%) was observed on spadix in transition stage of its growth that was characterized with color alteration area of scale like corola. Microspore viability was between 40-70% with the highest percentage (70%) obtained by Amigo. T-1 was a prospective technique developed for anthurium anther culture, while MMS was a potential initiation medium for the technique. Anthurium cv. Tropical was potentially used as a plant model for anther culture of anthurium. Results of this study can give benefit in establishing anther culture protocol for anthurium.

Keywords: *Anthurium andreanum*; Anther culture; Isolation technique; Inisiation medium.

Pemuliaan anthurium umumnya melalui seleksi biji hasil hibridisasi untuk mendapatkan jenis-jenis tanaman baru dengan karakter yang diperbaiki dan mampu melakukan penyerbukan silang (Kamemoto dan Kuehnle 1996). Cara ini

umumnya memerlukan waktu cukup lama. Pada *A. andreanum* dibutuhkan waktu 6-7 bulan sejak penyerbukan hingga biji masak dan 10-12 bulan untuk *A. scherzerianum*. Biji tidak dapat disimpan dan harus segera ditanam. Evaluasi dan seleksi

tanaman baru dapat dilakukan setelah 2-3 tahun. Kondisi ini menyebabkan perbaikan tanaman berjalan lambat dan turunan baru yang diperoleh tidak seragam. Walaupun terdapat variasi yang besar pada produksi bunga, warna, dan bentuk, tapi umumnya 1/3 dari hasil silangan dibuang sebelum berbunga karena kualitasnya yang rendah (Geier 1990), sehingga diperlukan teknik baru untuk menjawab tantangan tersebut.

Saat ini kultur anther merupakan salah satu dari teknik-teknik kultur jaringan dan merupakan teknik yang sangat menjanjikan untuk pemuliaan tanaman dan telah diaplikasikan secara meluas pada tanaman sereal dan beberapa tanaman lain (Dunwell 1996, Sopory dan Munshi 1996). Teknik ini memberi peluang mendapatkan tanaman homozigot murni atau homozigot haploid ganda yang dapat digunakan sebagai tetua persilangan maupun tanaman donor untuk tujuan produksi benih dalam waktu yang lebih singkat (Gosal *et al.* dalam Sripichitt *et al.* 2000). Meskipun kultur anther sering digunakan dalam pemuliaan tanaman, namun teknik ini dibatasi oleh rendahnya induksi kalus androgenik dan regenerasi tanaman. Pembelahan cepat pada dinding jaringan anther dapat terjadi, tetapi menghasilkan tanaman yang tidak seragam dalam ploidinya (Chiang *et al.* 1985). Sementara kultur mikrospora mempunyai keuntungan dibanding kultur anther karena teknik ini selalu menghasilkan tanaman homozigot dan populasi tanaman yang seragam.

Baik kultur anther maupun mikrospora belum pernah dikembangkan untuk pemuliaan anthurium. Pengembangan teknik tersebut mempunyai arti penting di masa mendatang untuk pengembangan tanaman anthurium. Kesuksesan dalam mengembangkan teknik ini akan membantu meningkatkan keberhasilan pemuliaan tanaman maupun perbenihannya.

Penelitian mencakup studi perkembangan spadik bunga anthurium, rasio tahap perkembangan mikrospora, uji viabilitas mikrospora, teknik isolasi mikrospora, dan menemukan medium inisiasi yang sesuai untuk kultur anther dan/atau mikrospora merupakan hal penting yang perlu dipelajari dalam rangka pengembangan kultur anther dan/atau mikrospora. Dari studi ini diharapkan diperoleh informasi perkembangan spadik anthurium, rasio tahap perkembangan

mikrospora, persentase viabilitas mikrospora, teknik isolasi, dan media inisiasi kultur anther dan/atau mikrospora.

## **BAHAN DAN METODE**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan dan Rumah Kaca, Balai Penelitian Tanaman Hias, Segunung dari bulan Juni 2003 hingga Agustus 2005. Sebagian kegiatan penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan, Plant Research International, Wageningen, Belanda.

Bahan tanaman yang digunakan adalah anthurium kultivar Amigo, Carnaval, dan Tropical. Tanaman ini ditanam dalam pot-pot plastik (f15 cm) yang berisi campuran sekam dan pupuk kandang (1:1 v/v), dirawat dengan penyiraman, pemupukan, dan disimpan dalam rumah kaca yang telah diberi naungan paranet 50%.

### **Studi Tahap Perkembangan Spadik Anthurium**

Tanaman yang mulai berbunga diamati secara periodik untuk mengetahui perubahan-perubahan yang terjadi sejak spathe membuka hingga spadik masak. Tiap perubahan nyata yang terjadi, dicatat dan diambil fotonya. Metode destruktif dan histologi sederhana (irisian lintang maupun memanjang) digunakan untuk membantu pengamatan perubahan-perubahan yang terjadi. Pada tahap ini perhatian difokuskan untuk mengetahui masa reseptif yang optimal, saat keluarnya serbuk sari, tipe kotak spora, dan jumlah mikrospora yang ada di dalamnya.

### **Studi Rasio Tahap Perkembangan Mikrospora (Custers *et al.* 2001)**

Tahap perkembangan mikrospora diketahui melalui pengecatan DNA yang ada dalam inti sel menggunakan 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) dan hanya dilakukan pada kultivar Tropical. Sebanyak 25-50 µl larutan mikrospora yang telah disiapkan dimasukkan ke dalam eppendorf kecil dan disentrifugasi pada 4.000 rpm selama 2-4 menit. Supernatan dipipet hingga hanya tersisa pellet dan sedikit supernatan. Kemudian ditambahkan 12,5 µl larutan DAPI dan diaduk merata menggunakan ujung pipet. Sejumlah campuran mikrospora dalam larutan DAPI diletakkan

di atas kaca obyek kemudian ditutup dengan gelas penutup, dan dibiarkan minimal 4 jam (1 malam). Setelah inkubasi, dilakukan pengamatan di bawah mikroskopa UV pada perbesaran 200, 400, dan 1.000x. Diamati perkembangan mikrospora dan dicatat persentase perkembangannya.

#### Uji Viabilitas Mikrospora (Custers *et al.* 2001)

Pengujian viabilitas sel mikrosopra/pollen menggunakan fluorescein diacetate (FDA). Kegiatan ini dimulai dengan penyiapan larutan mikrospora, kemudian dari larutan mikrospora 90-180 $\mu$ l dipipet dan ditempatkan dalam eppendorf yang telah dibungkus dengan aluminium foil, ditambahkan 10-20 $\mu$ l larutan stok FDA, diaduk secara merata dan diinkubasikan dalam gelap selama 10 menit. Dipipet 50-100 $\mu$ l kultur mikrospora yang telah diberi perlakuan FDA dan ditemplatkannya di atas kaca obyek, ditutup dengan kaca penutup dan segera dilakukan pengamatan di bawah mikroskop fluoresens. Diamati dan dihitung jumlah mikrospora yang memendarkan warna kuning/hijau dengan segera dan dihitung jumlah total sel yang diamati. Pengamatan diulang minimal pada 5 bidang pandang. Viabilitas sel dihitung dengan membagi jumlah total sel yang fluoresens dengan jumlah total sel yang diamati pada satu bidang pandang dikalikan dengan 100%.

#### Pengembangan Teknik Isolasi Anther dan Mikrospora

Tiga teknik isolasi diuji coba dalam kegiatan ini, yaitu pelepasan spontan dan homogenisasi yang diikuti oleh penyaringan. Teknik pelepasan spontan dilakukan dengan membuka petal dan mengambil anther yang saling berpasangan menggunakan jarum ent yang dilakukan di bawah mikroskop. Anther yang terisolasi dipotong secara melintang pada bagian pangkalnya dan dikultur dalam media semi padat MMS. Total anther yang dikultur adalah 120 buah yang ditanam dalam 30 botol. Sedangkan pada media cair MMS adalah 10 anther/botol isi 5 ml media cair untuk total 12 botol. Pada medium cair pelepasan mikrospora ke dalam medium dibantu dengan menekan dinding anther menggunakan batang gelas dan mengocoknya secara manual.

Teknik homogenisasi dan penyaringan diawali dengan mengisolasi anther dalam jumlah banyak (50 anther). Anther selanjutnya dimasukkan dalam tabung eppendorf ukuran 1 ml yang berisi 0,5 ml media cair,

kemudian ditumbuk dengan hati-hati menggunakan batang plastik, setelah itu disaring menggunakan penyaring nilon (48  $\mu$ m). Supernatan yang mengandung mikrospora kemudian dikonsentrasikan hingga 1 ml, dan dihitung kepadatan mikrosporanya. Selanjutnya kepadatan mikrospora dikonsentrasikan pada 30.000 sel/ml dan dikultur menggunakan erlenmeyer kecil (25 ml). Tiap erlenmeyer berisi 5 ml supernatan sel mikrospora. Total erlenmeyer yang dipakai untuk kultur adalah 12 botol. Selain dikultur pada media cair, supernatan yang mengandung mikrospora juga dikultur pada media semi padat. Media semi padat diberi lubang dengan batang pengaduk sebanyak 5 lubang, kemudian tiap lubang diisi dengan 50  $\mu$ l supernatan yang mengandung mikrospora. Total botol untuk kultur adalah 30 botol.

Semua kultur diinkubasi dalam kondisi gelap selama 1,5-2 bulan. Semua kultur yang menggunakan media cair diletakkan di atas shaker dengan goncangan 125 rpm, sedang yang menggunakan media semi padat diletakkan dalam kardus.

#### Seleksi Media pada Kultur Anther Anthurium

Media yang diuji dan komposisinya disajikan dalam Tabel 1. Teknik isolasi anther yang diikuti dengan penanaman secara langsung dalam medium semi padat merupakan teknik yang paling potensial dan digunakan dalam percobaan ini. Tiap perlakuan terdiri atas 2 botol. Tiap botol berisi 5 anther dan tiap perlakuan diulang 6 kali. Botol yang digunakan adalah botol jam tinggi 11 cm dengan diameter 7 cm. Tiap botol diisi dengan 30 ml media.

Selain media tersebut juga digunakan medium M4 yang telah dimodifikasi, di antaranya M4+ 50 ppm Cefotaxime (M4+C), M4+2 g/l asam pantotenat (M4+P), dan M4+P+C.

Parameter yang diamati secara visual adalah

1. Biologi bunga (waktu bunga betina masak (hari), waktu bunga jantan masak (hari), jenis kotak spora, dan jumlah mikrospora per anther)
2. Rasio tahap perkembangan mikrospora (%)
3. Viabilitas mikrospora (%)
4. Kontaminasi (%)
5. Pembentukan kalus (%), diamati setelah 2,5 bulan inkubasi anther dalam gelap.

Semua data yang disajikan merupakan nilai rerata yang diikuti dengan standar deviasi.

**Tabel 1. Komposisi medium M4, CPV-M, dan MMS yang digunakan untuk inisiasi kultur anther (M4, CPV-M, and MMS medium composition used for initiation of anther culture), mg/l**

| Komponen<br>(Component) | M4      | CPV-M   | MMS     |
|-------------------------|---------|---------|---------|
| Makro elemen            | ½       | ½       | ½       |
| Mikro elemen            | full    | ½       | ½       |
| Fe-Chelate (MS)         | full    | full    | full    |
| Nicotinic acid          | 0,3     | 0,5     | -       |
| Pyridoxine HC           | 0,4     | 0,3     | -       |
| Thiamine HCl            | 0,5     | 1,0     | 0,5     |
| Glycine                 | 2,0     | -       | -       |
| Myo-inositol            | 150     | 50      | 110     |
| 2,4-D                   | 0,10    | -       | 1,00    |
| NAA                     | -       | 0,2     | 0,01    |
| BA/BAP                  | -       | 0,5     | -       |
| Kinetin                 | 0,5     | -       | -       |
| TDZ                     | 0,5     | -       | 1,50    |
| Sukrose (g/l)           | 60      | 30      | 30      |
| Gelrite (g/l)           | 1,8     | 1,8     | 1,8     |
| Inkubasi gelap (bulan)  | 1,5-2,0 | 1,5-2,0 | 1,5-2,0 |
| pH                      | 5,8     | 5,8     | 5,8     |

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Studi Tahap Perkembangan Spadik pada Anthurium

Berdasarkan studi biologi bunga anthurium dapat diketahui bahwa 3 kultivar yang digunakan memiliki kecepatan pertumbuhan bunga yang berbeda, pada 2 parameter penting yang diamati (Tabel 1a dan 1b). Dari Tabel 1a dapat diketahui bahwa kepala putik mencapai masa reseptif optimal yang ditandai dengan produksi lendir dalam jumlah banyak pada 8-16 hari setelah spathe membuka. Periode reseptif tercepat ditunjukkan oleh kultivar Amigo dengan angka rerata 10 hari, diikuti oleh kultivar Tropical dan Carnaval. Sementara keluarnya serbuk sari berkisar antara 14-18 hari dengan rerata yang relatif sama pada ketiga kultivar yang diuji.

Berdasarkan hasil pengamatan anther pada ketiga kultivar dapat diketahui bahwa terdapat 2 jenis kotak spora, yaitu kotak spora yang agak pipih dan lebar serta kotak spora yang terlihat agak kecil tetapi lebih tebal. Dua tipe kotak spora memiliki atau menyimpan jumlah spora per kotak yang relatif berbeda (Tabel 1b). Kotak spora yang penampilannya lebih kecil dan tebal umumnya memiliki jumlah spora yang lebih banyak. Selanjutnya berdasarkan rerata jumlah spora per kotak spora, kultivar Carnaval adalah jenis anthurium yang memiliki jumlah spora lebih banyak dibanding 2 kultivar yang lain.

Dari 2 parameter penting yang diamati terlihat bahwa setiap kultivar memiliki karakter dan potensi yang berbeda. Diketuainya masa kepala putik dan serbuk sari keluar akan membantu menemukan titik kritis atau waktu terbaik untuk pengambilan sampel anther dan mikrospora. Selanjutnya jumlah spora yang terkandung dalam anther akan berpengaruh terhadap jumlah anther yang harus diisolasi dan konsentrasi mikrospora yang akan digunakan dalam kultur mikrospora. Keterkaitan 2 parameter penting tersebut dan potensinya dalam pengembangan kultur anther dan/atau mikrospora pada anthurium perlu dikaji lebih lanjut.

### Studi Rasio Tahap Perkembangan Mikrospora

Rasio tahap perkembangan mikrospora dalam anther merupakan salah satu faktor penting dan tahap yang krusial yang berpengaruh terhadap keberhasilan kultur anther dan/atau mikrospora (Prakash dan Giles 1987, Ferrie *et al.* 1995, Dunwell 1996, Sopory dan Munshi 1996), bahkan menurut Palmer dan Keller (2005a), tahap perkembangan nukleus mikrospora yang ada dalam anther merupakan faktor kunci. Pada banyak kasus, tahap *uninucleate* (tahap mikrospora berinti tunggal) hingga *early binucleate* (tahap awal inti tunggal mikrospora membelah menjadi 2) merupakan tahap paling responsif untuk menginduksi mikrospora berubah dari perkembangan gametofit (membentuk polen) ke perkembangan sporofit (membentuk embrio/kalus) akibat stres lingkungan dan beberapa perlakuan yang diberikan (Palmer dan Keller 2005b). Tahap ini disebut juga tahap kompeten di mana sel-sel mikrospora memiliki respons yang sangat tinggi terhadap induksi stres yang diberikan.

Perkembangan spadik diklasifikasikan menjadi 4 kelas, yaitu (1) muda, yang dicirikan dengan petal yang masih tertutup rapat, belum terlihat

**Tabel 1a. Keluarnya kepala putik dan serbuk sari bunga pada ketiga kultivar anthurium (Time of stigma and pollen of flower emerge on 3 cultivars of anthurium)**

| Kultivar<br>(Cultivars) | Keluarnya kepala putik<br>(Time of stigma emerge)<br>.....hari (day) ..... |                     | Keluarnya serbuk sari<br>(Time of pollen emerge) |                     |
|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------|---------------------|--------------------------------------------------|---------------------|
|                         | Kisaran<br>(Range)                                                         | Rerata<br>(Average) | Kisaran<br>(Range)                               | Rerata<br>(Average) |
| Amigo                   | 8-12                                                                       | 10.0±1.08           | 14-18                                            | 16.1±1.28           |
| Carnaval                | 13-16                                                                      | 14.5±0.96           | 15-18                                            | 16.2±1.14           |
| Tropical                | 12-15                                                                      | 13.4±1.04           | 15-18                                            | 16.7±1.03           |

**Tabel 1b. Jumlah mikrospora per kotak spora pada 3 kultivar anthurium (Number of microspore per anther on 3 cultivars of anthurium)**

| Kultivar<br>(Cultivar) | Jumlah mikrospora per kotak spora<br>(Number of microspore per anther) |                  |                            |                  |
|------------------------|------------------------------------------------------------------------|------------------|----------------------------|------------------|
|                        | Pipih/lebar (Slim/wide)                                                |                  | Tebal/panjang (Thick/long) |                  |
|                        | Kisaran (Range)                                                        | Rerata (Average) | Kisaran (Range)            | Rerata (Average) |
| Tropical               | 29.000-33.000                                                          | 30.830±1.28      | 33.000-44.000              | 36.670±2.78      |
| Carnaval               | 38.000-48.000                                                          | 42.400±2.92      | 32.000-68.000              | 48.570±5.12      |
| Amigo                  | 35.000-44.000                                                          | 39.380±3.23      | 27.000-66.000              | 46.430±9.51      |

Data dihitung dari 3 kali isolasi dengan 9 kali pengamatan (Data was counted from 3 times of isolation with 9 times of observation)

tonjolan stigma, (2) transisi, dicirikan dengan petal yang mulai terbuka, stigma terlihat mulai menonjol keluar, terkadang terdapat perubahan warna petal yang menyolok, terutama pada kultivar hibrida, (3) awal reseptif, umumnya dicirikan oleh petal yang terbuka lebih lebar, stigma menonjol keluar dan menghasilkan sedikit cairan, umumnya terletak 1-2 cm di bawah daerah transisi, dan (4) reseptif optimal, dicirikan dengan stigma yang menonjol keluar dengan produksi cairan lengket yang banyak (Gambar 1).

Dari hasil isolasi mikrospora yang diikuti dengan pengecatan menggunakan DAPI dan pengamatan di bawah mikroskop epifluoresens diketahui bahwa setiap kategori tahap perkembangan spadik memiliki rasio tahapan perkembangan mikrospora yang berbeda (Tabel 2). Terlihat bahwa perkembangan spadik pada anthurium yang sesuai untuk tujuan pengembangan kultur anther dan/atau mikrospora memiliki kisaran yang lebih luas, dimulai dari tahap muda hingga reseptif optimal. Pada tahap tersebut persentase mikrospora pada tahap inti tunggal hingga awal inti ganda terlihat paling tinggi. Rasio yang tinggi pada tahap inilah yang umumnya memberi potensi yang lebih tinggi untuk mendapatkan embrio hingga membentuk tanaman haploid dan/atau haploid ganda melalui induksi perkembangan sporofitik mikrospora, seperti yang dinyatakan oleh Ferrie *et al.* (1995), Palmer dan Keller (2005a dan b). Pentingnya studi tahap perkembangan mikrospora ini juga dilaporkan oleh Van Den Bulk dan Van Tuyl (1996) pada lily, Pedrosa dan Pais (1994) pada *Camelia japonica*, Mohan-Jain dan Bhalla-Sarin (1997) dan Izhaki *et al.* (2002) pada kultur anther petunia.

Pada Tabel 2 terlihat perubahan penampilan spadik memberikan pengaruh yang signifikan terhadap ratio persentase tahapan perkembangan

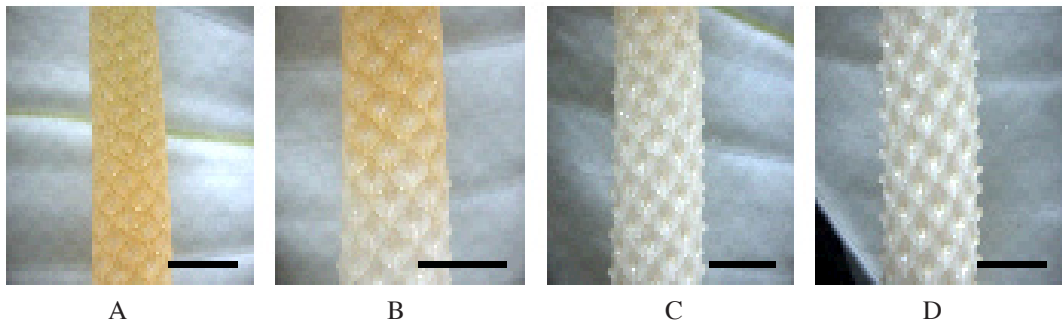
mikrospora yang ada di dalamnya. Tahap perkembangan sel induk mikrospora dalam anther setelah meiosis adalah sel induk membentuk tetrad, tetrad berkembang menjadi mikrospora dengan inti tunggal di tengah (*early-middle uninucleate*), tahap inti tunggal di tepi dinding mikrospora (*late uninucleate*), tahap awal inti ganda (disebut juga butiran polen muda/*early binucleate*), tahap inti ganda (butiran polen lebih tua/*binucleate*) dan terakhir serbuk sari (*mature pollen*) (Sangwan dan Sangwan-Norreel 1987). Hal serupa juga diungkapkan oleh Chapman (1987) dan Prakash dan Giles (1987).

Meskipun pada umumnya tahap awal inti tunggal hingga awal inti ganda merupakan tahap yang paling responsif dan dapat diinduksi membentuk embrio melalui perkembangan sporofitiknya, tetapi tiap tanaman memiliki respons spesifiknya masing-masing (Palmer dan Keller 2005b), sehingga pada anthuriumpun tahap perkembangan paling responsif dari mikrospora yang ada dalam anther perlu untuk dikaji lebih lanjut.

### Uji Viabilitas Mikrospora

Uji ini bermanfaat untuk mengetahui persentase sel yang memiliki peluang dan aktivitas metabolisme yang lebih baik dan dapat diinduksi membentuk embrio melalui perkembangan sporofitik mikrospora. Viabilitas sel dinilai berdasarkan aktivitas metabolisme sel, seperti pengambilan oksigen dan permeabilitas membran (Seraag *et al.* 1988, Fei dan Nelson 2003), aktivitas beberapa enzim, khususnya enzim esterase (Barak dan Chet 1986, Morris *et al.* 1997) dan ditunjukkan dengan adanya fluoresensi sel (Morris *et al.* 1997). Hasil pengujian viabilitas mikrospora dan polen disajikan pada Tabel 3.

Dari hasil uji viabilitas mikrospora terlihat bahwa 46-70% mikrospora yang terbentuk dalam



**Gambar 1.** Empat tahap perkembangan spadik untuk uji ratio tahap perkembangan mikrospora. (*Four development stages of spadix tested for ratio of microspore development stage*) A. Tahap muda (*Young stage*), B. Tahap transisi (*Transition stage*), C. Tahap awal reseptif (*Early receptive stage*), dan D. Tahap optimal reseptif (*Optimal receptive stage*). Bar = 5 mm

anther anthurium viabel dan memiliki kemampuan tumbuh pada tahap perkembangan selanjutnya. Persentase viabilitas tertinggi ditunjukkan oleh kultivar Amigo, kemudian diikuti oleh Tropical dan Carnaval. Pada tahap perkembangan selanjutnya hingga terbentuk polen (data tidak disajikan), persentase viabilitas ini dapat menurun. Penurunan persentase viabilitas sel ini berkisar antara 3-7%. Hal tersebut disebabkan karena tidak semua mikrospora yang viabel mampu tumbuh baik pada perkembangan selanjutnya akibat aktivitas metabolismenya yang menurun (Scraag *et al.* 1988, Morris *et al.* 1997). Tidak setiap sel mikrospora memiliki tingkat fluoresensi yang tinggi setelah pengecatan menggunakan FDA (Gambar 3), meskipun secara morfologi sel tersebut memiliki bagian-bagian sel yang lengkap. Menurut Pacini dan Franchi (1999) kondisi tersebut dipengaruhi oleh kompetisi perkembangan antarbutiran

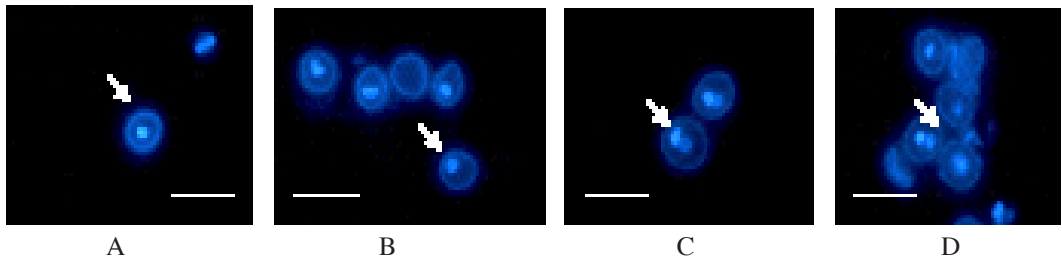
polen dalam perkembangannya. Lebih jauh Pacini (1994) menjelaskan ada 3 faktor genetik utama yang mempengaruhinya, yaitu (1) pembelahan meiosis kedua dari meiosite yang tidak sinkron, (2) pembelahan mitosis haploid pertama yang tidak sinkron, dan (3) segregasi gen-gen tertentu. Sedangkan menurut Bajaj (1987) kemampuan hidup dan viabilitas polen dipengaruhi oleh kondisi inti polen.

Dari data Tabel 3 terlihat bahwa potensi kultivar Amigo untuk dijadikan tanaman model untuk pengembangan kultur anther dan/atau mikrospora pada anthurium lebih besar dibanding kedua kultivar lain. Kultivar tersebut juga potensial untuk dijadikan sebagai tetua jantan karena jumlah polen viabel yang dimilikinya. Tetapi potensi tersebut masih perlu dikaji lebih lanjut bagaimana kompetensi dan kemampuan tumbuh pada media buatan dan responsifnya

**Tabel 2.** Rasio tahap perkembangan mikrospora berdasarkan tahap perkembangan spadik (*Ratio of microspore development based on development stages of spadix*)

| Tahap perkembangan spadik<br>( <i>Stage of spadix</i> ) | Rasio tahap perkembangan mikrospora<br>( <i>Ratio of microspore developmental stage</i> ), % |                           |                         |                         |                   |
|---------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------|
|                                                         | <i>Early uninucleate</i>                                                                     | <i>Middle uninucleate</i> | <i>Late uninucleate</i> | <i>Early binucleate</i> | <i>Binucleate</i> |
| Muda ( <i>Young</i> )                                   | 5,3 ± 1,94                                                                                   | 61,3 ± 6,90               | 25,0 ± 5,58             | 5,9 ± 2,14              | 0                 |
| Transisi ( <i>Transition</i> )                          | 1,9 ± 1,08                                                                                   | 11,1 ± 2,61               | 75,7 ± 5,96             | 5,3 ± 2,05              | 1,2 ± 1,12        |
| Awal reseptif<br>( <i>Early receptive</i> )             | 0                                                                                            | 5,4 ± 1,49                | 70,2 ± 5,18             | 17,3 ± 1,86             | 2,5 ± 0,41        |
| Reseptif optimal<br>( <i>Optimal receptive</i> )        | 0                                                                                            | 0                         | 6,9 ± 2,63              | 68,2 ± 6,21             | 14 ± 2,69         |

Data ± SD yang disajikan merupakan rerata dari 10 kali isolasi dan pengamatan (*Data ± SD presented was an average from 10 times isolation and observation*) Uji ini hanya dilakukan pada kultivar Tropical (*The test was only carried out on Tropical cultivar*)



**Gambar 2.** Tahap perkembangan mikrospora dalam anther *A. andraeanum* L. (*Microspore development stages in anther of A. andraeanum L.*). A. Early-middle uninucleate, B. Late-uninucleate, C. Early binucleate D. Binucleatae. Bar = 50  $\mu$ m.

terhadap beberapa perlakuan yang diberikan. Hal yang disebut terakhir perlu diketahui karena kompetensi sel viabel dalam merespons beberapa perlakuan sangat penting keberadaannya (Palmer dan Keller 2005a), karena kompetensi sel dipengaruhi oleh totipotensinya (George dan Sherrington 1984, Merkle *et al.* 1995). Evan *et al.* (1981) menyebut totipotensi sel pada proses embriogenesis sebagai *induced embryogenic determined cell* (IEDC), sedangkan pada proses organogenesis disebut organogenik sel.

### Pengembangan Teknik Isolasi Anther dan Mikrospora

Hasil studi menunjukkan bahwa tiap teknik memberikan hasil yang sangat berbeda (Tabel 4). Berdasarkan tingkat kontaminasinya terlihat bahwa T-3 menunjukkan tingkat kontaminasi terendah (18%), diikuti oleh T-1 (64%), T-2 (76%). Sedangkan pada T-4 semua kultur terkontaminasi oleh kehadiran bakteri. Tetapi jika didasarkan respons terjadinya pembentukan kalus, terlihat T-1 merupakan satu-satunya teknik isolasi yang

memberikan peluang terbentuknya kalus pada akhir inkubasi, meskipun persentase pembentukan kalus hanya 4% dari total anther yang tidak terkontaminasi. Keberhasilan kultur anther dalam kegiatan ini sangat rendah, walaupun demikian potensi untuk mengembangkan kultur anther memiliki peluang lebih baik dibanding kultur mikrospora.

Kendala utama dalam pengembangan kultur anther dan mikrospora anthurium adalah tingginya kontaminasi yang disebabkan oleh kontaminasi laten oleh bakteri (*Xanthomonas axonopodis* cv. *dieffenbachiae*) (Norman dan Alvarez 1994, Duffy 2000, dan Anonim 2001). Eliminasi bakteri ini melalui sterilisasi menjadi sulit karena bakteri dapat tumbuh dan berkembang secara sistemik (Anonim 2001), dengan menempati sel-sel parenkim dan ruang antarsel pada seluruh jaringan tanaman (Gunson dan Spencer-Philips 1994). Aktivitas bakteri meningkat dan bersifat merusak pada eksplan/tanaman inang saat aktivitas/metabolisme sel-sel inang terganggu. Kondisi tersebut menyebabkan mikroekosistem bakteri menjadi

**Tabel 3.** Viabilitas mikrospora pada 3 kultivar anthurium (*Microspore viability on 3 cultivars of anthurium*)

| Kultivar<br>(Cultivars) | Viabilitas mikrospora ( <i>Microspore viability</i> ), % |                  |                 |                  |
|-------------------------|----------------------------------------------------------|------------------|-----------------|------------------|
|                         | Viable                                                   |                  | Non-viable      |                  |
|                         | Kisaran (Range)                                          | Rerata (Average) | Kisaran (Range) | Rerata (Average) |
| Tropical                | 46,7 – 68,9                                              | 59,3 $\pm$ 9,64  | 30,1 – 52,3     | 40,7 $\pm$ 9,64  |
| Carnaval                | 35,8 – 55,6                                              | 46,3 $\pm$ 8,34  | 44,6 – 65,1     | 53,7 $\pm$ 8,34  |
| Amigo                   | 59,3 – 74,7                                              | 69,6 $\pm$ 6,95  | 20,5 – 38,4     | 30,4 $\pm$ 6,95  |

Data yang disajikan merupakan rerata dari 5 kali isolasi yang diulang 3 kali tiap pengamatan pada masing-masing kultivar *A. andraeanum* L. (Data presented was an average from 5 times isolation repeated 3 times in each observation in each cultivar) Mikrospora diisolasi dari anther pada saat stigma berada pada masa reseptif optimalnya (*Microspore isolated from anther in optimal receptive stage*)

terganggu, terutama terkait dengan ketersediaan asam amino, seperti metionin dan asam glutamat untuk stabilitas hidup dan pertumbuhannya (Star 1964 dalam Norman dan Alvarez 1994). Akibatnya bakteri akan tumbuh cepat dan merusak jaringan tanaman inangnya.

Pendapat tersebut di atas diperkuat dengan kenyataan yang diamati selama kegiatan penelitian berlangsung, jika antara proses isolasi hingga kultur berlangsung cepat (kurang dari 1 menit), selanjutnya anther segera ditanam dan dibenamkan dalam media, diduga sel-sel dinding anther akan segera melakukan absorpsi hara, vitamin, dan hormon yang tersedia dalam media untuk menjaga viabilitas sel-selnya, sehingga metabolisme dan mikroekosistem bakteri juga tetap terjaga. Sebaliknya jika antara proses isolasi dan kultur pada media berlangsung lama dan menyebabkan sel-sel anther kering, maka aktivitas sel lebih lama pulih dan akibatnya mikroekosistem bakteri terganggu serta berubah menjadi patogen bagi sel-sel inang untuk tumbuh dan berkembang lebih cepat. Kenyataan bahwa bakteri ini tidak dapat bertahan hidup lebih dari 2 minggu pada media MS tanpa adanya tanaman inang (Norman dan Alvarez 1994). Fenomena ini sangat menarik untuk dikaji lebih lanjut dalam pengembangan aspek kultur jaringan anthurium dan menguak misteri kontaminasi laten tersebut.

Pada T-3, meskipun menunjukkan tingkat kontaminasi yang rendah, tidak adanya respons

mikrospora dalam membentuk kalus diduga disebabkan seluruh mikrospora yang dikultur mati dan tidak dapat bertahan hidup setelah sejumlah medium cair yang disertakan saat dikultur menjadi kering akibat penguapan. Hal lain diduga terjadi akibat jumlah kepadatan mikrospora yang dikultur belum optimal dan viabilitas yang menurun drastis.

Secara keseluruhan dapat diketahui bahwa isolasi langsung yang diikuti dengan pemotongan secara melintang pada bagian pangkal anther, kemudian dilanjutkan dengan penanaman pada medium semi padat (T-1) merupakan teknik yang potensial digunakan dalam mengembangkan kultur anther anthurium. Selanjutnya kultur anther memiliki peluang yang lebih baik dibanding kultur mikrospora.

### **Seleksi Media pada Kultur Anther Anthurium**

Berdasarkan hasil seleksi media awal, terlihat bahwa 6 media yang diuji untuk inisiasi kultur anther memberikan respons yang berbeda. M4 dan modifikasinya yang sesuai untuk induksi pertumbuhan kalus dan tunas adventif pada beberapa kultivar anthurium yang digunakan untuk perbanyakan cepat, ternyata tidak sesuai untuk induksi kalus pada kultur anther (Tabel 5). Dua puluh kotak anther yang dikultur pada media M4 dan modifikasinya, dominan mati dan tidak memberikan respons. Hanya 1 kotak spora yang memperlihatkan adanya respons tumbuh dengan sedikit kalus yang terlihat. Respons yang sama

**Tabel 4. Respons perbedaan teknik isolasi kultur anther dan mikrospora pada anthurium (*Response of different isolation techniques of anther and microspore culture on anthurium*)**

| <b>Teknik Isolasi<br/>(Isolation technique)</b>                              | <b>Kontaminasi<br/>(Contamination)<br/>%</b> | <b>Pembentukan kalus<br/>(Callus formation)<br/>%</b> |
|------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| ½ anther + media semi padat (T-1)<br>(Half-anther + semi solid medium, T-1)  | 64,0 ± 2,91                                  | 4,3 ± 1,94                                            |
| ½ anther + media cair (T-2)<br>(Half-anther + liquid medium, T-2)            | 76,2 ± 8,21                                  | 0                                                     |
| Mikrospora + media semi padat (T-3)<br>(Microspore + semi solid medium, T-3) | 17,5 ± 8,29                                  | 0                                                     |
| Mikrospora + media cair (T-4)<br>(Microspore + liquid medium, T-4)           | 100                                          | 0                                                     |

T-1, total anther yang dikultur 120 anther dalam 30 botol (*Total anther cultured 120 anthers in 30 bottles*); T-2, total anther yang dikultur 120 kotak spora dalam 12 erlenmeyer (*Total anther cultured 120 anthers in 12 erlenmeyers*); T-3, total botol yang dikultur 30 (*Total bottle cultured 30 bottles*); dan T-4, total erlenmeyer yang dikultur 12 erlenmeyer (*Total erlenmeyer cultured 12 erlenmeyers*)

juga terlihat pada anther yang ditanam dalam medium CPV-M. Sedangkan medium MMS, diduga merupakan media yang memiliki potensi untuk dikembangkan pada kultur mikrospora. Medium ini mampu menginduksi 2 kotak spora dari 20 anther yang dikultur (10%) untuk tumbuh dan menghasilkan kalus yang banyak pada kotak spora dari anthurium jenis Tropical.

Dari Tabel 6 terlihat bahwa modifikasi media M4 (M4 + P, M4 + C, M4 + P + C) tidak mampu menstimulasi pembentukan kalus pada kultur anther dari ketiga kultivar anthurium yang diuji. Modifikasi M4 yang menstimulasi pembentukan kalus hanya ditemukan pada M4+P+C, itupun hanya ditemukan pada kultivar Tropical dengan jumlah kalus yang sedikit. Medium MMS merupakan medium paling potensial untuk pengembangan kultur anther anthurium. Medium ini mampu menginduksi pembentukan kalus pada semua kultivar anthurium yang diuji, dengan stimulasi terbaik pada kultivar Tropical, karena persentase pembentukan kalus yang tertinggi dibanding kultivar yang lain.

Masih rendahnya tingkat pembentukan kalus dari masing-masing kultivar diduga karena belum optimalnya media inisiasi yang digunakan dan waktu pengambilan sampel, serta umur fisiologi eksplan yang belum tepat. Menurut Aswath dan Biswas (1999), eksplan yang diambil dari spadik memiliki kapasitas regenerasi yang tinggi, tetapi

kesesuaian dengan media pertumbuhan, perlakuan yang diberikan pada eksplan, dan lingkungan tumbuh juga menjadi faktor penting yang harus diperhatikan, seperti yang juga dinyatakan oleh Prakash dan Giles (1987), Ferrie *et al.* (1995), Sopory dan Munshi (1996). Faktor-faktor tersebut adalah genotip tanaman donor, fisiologi tanaman donor, umur anther, tahap polen, praperlakuan anther, medium kultur, dan lingkungan kultur (suhu, kelembaban, cahaya), dan respons spesifik tanaman diduga berpengaruh sangat besar terhadap keberhasilan kultur jaringan. Menurut Aswath dan Biswas (1999) respons spesifik ini merupakan faktor paling kritis dalam kultur jaringan anthurium. Seperti yang dilaporkan juga oleh Geier (1990), Kamemoto dan Kuehnle (1996), dan Hamidah *et al.* (1997) bahwa anthurium merupakan tanaman perenial yang tumbuh lambat, baik pada perbanyakan konvensional maupun kultur jaringan.

Secara keseluruhan inisiasi kultur anther anthurium telah berhasil dilakukan, walaupun respons pembentukan kalusnya lambat dan menghabiskan waktu sekitar 2 bulan. Pembentukan kalus umumnya mulai terlihat setelah inkubasi gelap selama  $\pm 2$  bulan. Kultivar Tropical merupakan kultivar yang responsif dalam pembentukan kalus dibanding kultivar Carnaval dan Amigo. Medium MMS merupakan medium yang potensial digunakan dalam pengembangan kultur anther anthurium.

**Tabel 5. Pengaruh media terhadap pertumbuhan anther pada anthurium kultivar Tropical (*Effect of media on growth of anther on anthurium c.v Tropical*)**

| Medium<br>(Medium) | Respons anther (Anther response) |                 |                          |                                            |
|--------------------|----------------------------------|-----------------|--------------------------|--------------------------------------------|
|                    | Tumbuh<br>(Survive)              | Mati<br>(Death) | Tumbuh<br>(Survive)<br>% | Pembentukan kalus<br>(Callus formation), % |
| M4                 | 0                                | 20              | 0                        | -                                          |
| M4 + P             | 0                                | 20              | 0                        | -                                          |
| M4 + C             | 0                                | 20              | 0                        | -                                          |
| M4 + P + C         | 1                                | 19              | 5,0                      | + (5,0)                                    |
| CPV-M              | 0                                | 20              | 0                        | -                                          |
| MMS                | 2                                | 18              | 10,0                     | +++ (10,0)                                 |

- tidak ada kalus (*no callus formation*), + - sedikit kalus, kurang dari 25% dari total eksplan (*less callus formation, less than 25% of total explant*), ++ - kalus agak banyak, 25-50% total eksplan (*moderate callus formation, 25-50% of total explant*), +++ - kalus banyak, >50% total eksplan (*abundant callus formation, more than 50% of total explant*). Kalus diamati setelah 2,5 bulan inkubasi dalam gelap (*Callus observed 2.5 months after dark incubation*)

**Tabel 6. Pengaruh media terhadap pertumbuhan anther anthurium kultivar Tropical, Carnaval, dan Amigo (Effect of media on growth of anther on anthurium c.v Tropical, Carnaval, and Amigo)**

| Medium<br>(Medium)                             | Respon anther (Anther response) |                 |                          |                                            |
|------------------------------------------------|---------------------------------|-----------------|--------------------------|--------------------------------------------|
|                                                | Tumbuh<br>(Survive)             | Mati<br>(Death) | Tumbuh<br>(Survive)<br>% | Pembentukan kalus<br>(Callus formation), % |
| Kultivar Tropical ( <i>Tropical cultivar</i> ) |                                 |                 |                          |                                            |
| M4 + P                                         | 0                               | 20              | 0                        | -                                          |
| M4 + C                                         | 4                               | 16              | 20.0                     | -                                          |
| M4 + P + C                                     | 4                               | 16              | 20.0                     | + (5.0)                                    |
| MMS                                            | 9                               | 11              | 45.0                     | +++ (10.0)                                 |
| Kultivar Carnaval ( <i>Carnaval cultivar</i> ) |                                 |                 |                          |                                            |
| M4 + P                                         | 0                               | 20              | 0                        | -                                          |
| M4 + C                                         | 0                               | 20              | 0                        | -                                          |
| M4 + P + C                                     | 0                               | 20              | 0                        | -                                          |
| MMS                                            | 8                               | 12              | 40.0                     | ++ (10.0)                                  |
| Kultivar Amigo ( <i>Amigo cultivar</i> )       |                                 |                 |                          |                                            |
| M4 + P                                         | 8                               | 12              | 40.0                     | -                                          |
| M4 + C                                         | 6                               | 14              | 30.0                     | -                                          |
| M4 + P + C                                     | 11                              | 9               | 55.0                     | -                                          |
| MMS                                            | 14                              | 6               | 70.0                     | + (5.0)                                    |

## KESIMPULAN

1. Tiga kultivar anthurium yang diuji memiliki karakter yang berbeda terhadap waktu munculnya kepala putik dengan waktu munculnya kepala putik tercepat terdapat pada kultivar Amigo, sedangkan waktu muncul serbuk sari relatif sama. Sedangkan jumlah mikrospora per anther terbanyak ditemukan pada kultivar Carnaval.
2. Rasio tahap perkembangan mikrospora berubah seiring perubahan tahap perkembangan spadik dengan persentase *late-uninucleate* tertinggi (76%) saat spadik berada pada masa transisi.
3. Viabilitas mikrospora berkisar antara 40-70% dengan persentase tertinggi (70%) ditunjukkan oleh kultivar Amigo.
4. T-1 (isolasi anther yang langsung diikuti penanamannya dalam media) merupakan teknik isolasi yang potensial digunakan dalam mengembangkan kultur anther pada anthurium.
5. Medium MMS merupakan medium yang paling potensial digunakan dalam kultur anther anthurium.
6. Kultivar Tropical merupakan kultivar yang potensial digunakan sebagai tanaman model dalam kultur anther anthurium.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Pelaksana kegiatan ini mengucapkan terima kasih kepada Sdr/i. Nina Marlina, Euis Rohayati, dan Dedi Rusnandi yang telah membantu proses penelitian sejak persiapan pelaksanaan dan pengambilan data.

## PUSTAKA

1. Anonim. 2001. Bacterial Diseases of Anthurium, Dieffenbachiae, Philodendron and Syngonium. *Rep. Plant Dis.* 616:1-6.
2. Aswath, C. and B. Biswas. Anthurium. In: Parthasarathy, V.A., T.K. Bose and P. Das (Eds.). *Bio. Hort. Crops*. Naya Prokash. India. 3:198-213.
3. Bajaj, Y.P.S. 1987. Cryopreservation of Pollen dan Pollen Embryos, and the Establishment of Pollen Banks. In: Giles, K.L. and J. Prakash (Eds.) *International Review of Cytology: Pollen: Cytology and Development*. Academic Press Inc. New York. 07:397-420.
4. Barak, R. and I. Chet. 1986. Determination by Fluorescein Diacetate Staining; of Fungal Viability During Mycoparasitism. *Soil Biol. Biochem.* 18(3):315-319.
5. Chapman, G.P. 1987. The Tapetum. In: Giles, K.L. and J. Prakash (Eds.). *International Review of Cytology, Pollen, Cytology, and Development*. Academic Press Inc. New York. p. 107:111-125.
6. Chiang, M.S., S. Frechette, C.G. Kuo, C. Chong and S.J. Delafield. 1985. Embryogenesis and Haploid Plant Production from Anther Culture of Cabbage. *Can. J. Plant Sci.* 65:1033-1037.

7. Custers, J.B.M., J.H.G. Cordewener, M.A. Fiers, B.T.H. Maassen, M.M. van Lookeren Campagne and C.M. Liu. 2001. Androgenesis in *Brassica*: A Model System 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. p. 451-470.
8. Duffy, B. 2000. Survival of the Anthurium Blight Pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*, in Field Crop Residues. *European J. Plant Path.* 106:291-295.
9. 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. p. 1:177-245.
10. Evan, D.A., W.R. Sharp and C.E. Flick. 1981. Growth and Behaviour of Cell Cultures, Embryogenesis and Organogenesis. In Thorpe, T.A (Eds.). *Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture*. Academic Press. New York. 45p.
11. Fei, S and E. Nelson. 2003. Estimation of Pollen Viability, Shedding Pattern, and Longevity of Creeping Bentgrass on Artificial Media. *Crop Sci.* 43:2177-2181.
12. Ferrie, A.M.R., C.E. Palmer and W.A. Keller. 1995. Haploid Embryogenesis. In Thorpe, T.A (Ed.). *In Vitro Embryogenesis in Plants*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht/Boston/London. 309-344.
13. Geier, T. 1990. anthurium. In Ammirato, P.V., Evans, D.A., Sharp, W.R. & Bajaj, Y.P.S. (Eds.). *Handbook of Plant Cell Culture, Ornamental Species*, McGraw-Hill, New York. 5:228-252.
14. George, E.F. and P.D. Sherrington. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Exegetics Limited, England. 709p.
15. Gunson, H.E. and P.T.N. Spencer-Philips. 1994. Latent Bacterial Infections: Epiphytes and Endophytes as Contaminants of micropropagated plants. In: P.J. Lumsden, J.R. Nicholas and W.J. Davies (Eds). *Physiology, Growth and Development of Plants in Culture*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. p.379-394.
16. Hamidah, M., A.G.A. Karim, and P.C. Debergh. 1997. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in *Anthurium scherzerianum*. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 49:23-27.
17. Izhaki, A., A. Borochoy, E. Zamski and D. Weiss. 2002. Gibberellin Regulates Post-Microsporogenesis Processes in Petunia. *Physiol. Plant.* 115:442-447.
18. Kamemoto, H. and A.R. Kuehnle. 1996. *Breedings Anthurium in Hawaii*. University of Hawaii Press, Honolulu, Hawaii. 132p.
19. Merkle, S.A., W.A. Parrot and B.S. Flinn. 1995. Morgogenic Aspects of Somatic Embryogenesis. In Thorpe, T.A. (Ed.). *In Vitro Embryogenesis in Plants*. Kluwer Academic Publications. Netherlands. p.55-203.
20. 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. p.5:53-71.
21. Morris, S.J., T. Zink, K. Connors and M.F. Allen. 1997. Comperison Between Fluorescein Diacetate and Differential Fluorescent Staining Procedures for Determining Fungal Biomass in Soils. *App. Soil Ecol.* 6:161-167.
22. Norman, D.J. and A.M. Alvarez. 1994. Latent Infections of Iv Vitro Anthurium Caused by *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae*. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 39:55-61.
23. Pacini, E. 1994. Cell Biology of Anthers and Pollen Development. In William, E.G., A.E. Clarke and R.B. Knox (Eds). *Gamete control of self-compatibility and reproductive development in flowering plants*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. p.289-308.
24. \_\_\_\_\_ and G.G. Franchi. 1999. Types of pollen dispersal units and pollen competition. In Clement, C., E. Pacini and J.C. Audran (Eds.). *Anther and Pollen: From Biology to Biotechnol.* Springer. Berlin. p.1-2.
25. Pedroso, M.C. and M.S. Pais. 1994. Induction Microspore Embryogenesis in *Camellia japonica* cv. Elegans. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 37: 129-136.
26. Palmer, C.E. and W.A. Keller. 2005a. Challenges and Limitations to the Use of Haploidy in Crop Improvement. In Palmer, C.E., W.A. Keller and K.J. Kasha (Eds). *Biotechnology in Agriculture and Forestry: Haploids in Crop Improvement II*. Springer-Verlag. Berlin.Heidelberg. p.56:295-303.
27. \_\_\_\_\_ 2005b. Overview of Haploidy. In Palmer, C.E., W.A. Keller and K.J. Kasha (Eds). *Biotechnology in Agriculture and Forestry: Haploids in Crop Improvement II*. Springer-Verlag. Berlin.Heidelberg. p.56:1-9.
28. Prakash, J. and K.L. Giles. 1987. Productions if Doubled Haploids in Oriental Lilies. In Horn W, C.J. Jensen W. Odenbach and O. Schieder (Eds), *Genetic Manipulation in Plant breeding*. de Gruyter, Berlin. p.335-337.
29. Sangwan, R.S. and B.S. Sangwan-Norreel. 1987. Biochemical Cytology of Pollen Embryogenesis. In Giles, K.L. and J. Prakash (Eds). *International Review of Cytology: Pollen: Cytology and Development*. Academic Press Inc. New York. p.107:221-272.
30. Scraag, A.H., E.J. Allan and F. Lackie. 1988. Effect of Shear on the Viability of Plant Cell Suspensions. *Enzyme Microb. Technol.* 10:361-367.
31. 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. p.1:145-176.
32. Sripichitt, P., T. Ozawa, M. Otani and T. Shimada, 2000. Improved Method for Anther Culture of an Indica Rice Cultivar of Thailand. *Plant Prod. Sci.* 3(3):254-256.
33. Van Den Bulk. R.W. and J.M. Van Tuyl. 1997. In vitro Induction of Haploid Plants from the Gametophytes of Lily and Tulip. 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. p.5:73-88.