

## MORFOLOGI BUNGA YANG SESUAI BAGI KULTUR MIKROSPORA PADA TANAMAN JARAK PAGAR (*Jatropha curcas* L.)

### Appropriate Morphology of Physic Nut (*Jatropha curcas* L.) Flowers for Microspore Culture

SUAIB<sup>\*)</sup>, MAKMUR JAYA ARMA, DAN MUHIDIN

*Jurusan Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Halu Oleo, Kendari*

#### ABSTRACT

An experiment aimed in gaining information on morphological characteristics of *Jatropha curcas* (L.) containing high frequency of uninucleate microspores has been done. This was important due to the successful application of experiment in haploid technique through anther or microspore culture is strongly determined by the availability of information from basic research such as appropriate morphology of the flowers. This scientific article, in our knowledge, was an early explanation of the initial steps of whole procedures in the microspore culture of *Jatropha curcas* (L.). Results of the research showed that the morphological features of flower that contained high frequency of mid- and late-uninucleate microspores was that the flowers must be in the range of 2 to 3 mm in length. Such flowers contained yellowish anthers.

Key words: Flowers length, mid- and late-uninucleate, morphology, physic nut, microspore

#### PENDAHULUAN

Kultur antera atau kultur mikrospora merupakan teknik perbanyak tanaman yang jauh lebih efisien dari kultur jaringan meristem pucuk/tunas, kultur suspensi sel, dan kultur protoplas. Hal ini dapat dicapai karena jumlah mikrospora dalam satu bunga, jauh lebih banyak jika dibandingkan dengan jumlah sel pada jaringan meristem pucuk/tunas, suspensi sel, dan protoplas pada penggunaan satu pohon sumber eksplan. Setiap mikrospora berpeluang untuk berkembang menjadi individu tanaman lengkap apabila dikulturkan di dalam medium yang kaya nutrisi karena sel tersebut memiliki sifat totipotensi. Dengan demikian pengkajian penggunaan kultur mikrospora bagi perbanyak bibit unggul tanaman jarak pagar sangat perlu dilakukan.

Penelitian kultur antera dan atau kultur mikrospora pada tanaman jarak pagar hingga saat ini belum pernah dilaporkan. Akan tetapi, apabila kultur mikrospora berhasil dengan

baik pada tanaman jarak pagar sebagaimana telah berhasil dengan baik pada berbagai jenis tanaman lainnya, akan berimplikasi paling sedikit pada dua manfaat. *Pertama*, diperoleh bibit dalam jumlah yang lebih banyak pada waktu yang lebih singkat, dan *ke dua*, diperoleh bibit baru berupa tanaman haploid ganda (*doubled haploid*) dengan konstitusi genetik homozigot sempurna. Sifat atau sifat-sifat yang dimiliki oleh tanaman haploid ganda disandakan oleh gen atau gen-gen homozigot. Dengan demikian, tanaman yang berkonstitusi genetik homozigot sempurna akan lebih optimal dalam mengekspresikan sifat atau sifat-sifatnya jika dibandingkan dengan tanaman yang berkonstitusi genetik heterozigot.

Setiap pohon tanaman jarak pagar dapat menghasilkan beberapa tangkai bunga, dan setiap bunga terdiri dari banyak kuncup bunga. Setiap kuncup bunga memiliki beberapa kepala sari/antera (*anthers*) yang mengandung dua ruang sari (*theca*). Setiap satu ruang sari terdapat paling sedikit 1.000 butir mikrospora (*microspores*) tergantung varietas dan ukuran kepala sarinya. Dengan demikian setiap tangkai bunga akan terdapat

<sup>\*)</sup> Alamat korespondensi:  
Email : suaib\_06@yahoo.co.id

jutaan mikrospora, suatu jumlah yang jauh melebihi jumlah sel meristematik bagi satu tanaman sumber eksplan.

Mikrospora adalah sel tunggal yang memiliki informasi genetik yang lengkap dalam formasi separuh dari genom lengkapnya (*haploid*). Melalui kultur *in vitro*, setiap mikrospora berpotensi untuk berdiferensiasi menjadi satu tanaman lengkap dengan konstitusi genetik haploid. Tanaman haploid yang dihasilkan akan memproduksi tepung sari yang steril sehingga akan gagal menghasilkan buah atau biji. Akan tetapi, melalui penggandaan kromosom selama kultur mikrospora akan menghasilkan tanaman haploid ganda yang fertil dan dapat berbuah.

Untuk mendapatkan tanaman fertil dari kultur mikrospora, pada fase tertentu selama kultur *in vitro* dilakukan penggandaan kromosom menggunakan bahan kimia mutagen. Bahan kimia mutagen yang umum digunakan adalah *colchicine*, apabila frekuensi tanaman haploid ganda yang dihasilkan secara spontan sangat rendah. Selain *colchicine*, beberapa jenis bahan kimia lain dari kelompok herbisida juga dilaporkan mempunyai cara kerja yang sama dengan *colchicine* dalam menggandakan kromosom tanaman. Herbisida dimaksud adalah *amiprofosmethyle*, *oryzalin*, dan *trifluralin* (Hansen dan Andersen, 1996).

Mikrospora yang dikulturkan secara *in vitro* akan berdiferensiasi membentuk proembrio, embrio, dan tanaman hijau dan lengkap apabila kebutuhan nutrisi dan faktor lain bagi perkembangannya terpenuhi selama kultur, sebaliknya akan melalui jalur pembentukan kalus apabila tidak terpenuhi. Pada fase kultur inilah diperlukan pengkajian yang seksama untuk mengidentifikasi dan merumuskan faktor-faktor yang menentukan diferensiasi mikrospora menjadi embrio, dan tanaman hijau dan lengkap.

Budidaya tanaman jarak pagar sangat mudah dilakukan karena mudah tumbuh, mempunyai spektrum wilayah pertumbuhan yang luas, dan tidak terlalu mensyaratkan suatu jenis tanah yang khusus. Akan tetapi, untuk kegiatan pembudidayaan yang luas dihadapkan pada masalah penyediaan bibit yang banyak pada waktu yang singkat. Untuk memecahkan masalah di atas, penyediaan bibit melalui teknik kultur jaringan dapat

diterapkan sebagaimana telah berhasil diperoleh dari banyak penelitian. Satu di antara banyak penelitian itu adalah yang dilakukan oleh Rajore dan Batra (2005) dimana dengan menggunakan meristem pucuk dapat meregenerasikan sejumlah tanaman baru.

Akan tetapi, melalui kultur sel-sel meristem mempunyai kelemahan jika dibandingkan dengan kultur antera dan atau kultur mikrospora. Kelemahan-kelemahan kultur sel meristem antara lain: (1) jumlah sel meristem pada satu pohon sumber eksplan lebih sedikit dari pada jumlah sel mikrospora yang terdapat di dalam antera, (2) tidak memperbaiki sifat mewaris pada tanaman, sedangkan melalui kultur antera dan atau mikrospora dapat dicapai perbaikan genetik tanaman karena status genetiknya berubah menjadi haploid ganda, dan (3) berpeluang menghasilkan individu baru tanaman yang memiliki sifat inferior karena fenomena variasi somaklon.

Berbagai faktor yang mempengaruhi embriogenesis mikrospora dan regenerasi "plantlet" menentukan efisiensi dan efektifitas kultur mikrospora. Kush dan Virmani (1996), Palmer dan Keller (1997), Bhojwani dan Bhatnagar (1999), Wang *et al.* (2000), dan Segui-Simarro dan Nuez (2007) menyatakan bahwa paling sedikit terdapat lima faktor yang mempengaruhi pembentukan embrio melalui kultur mikrospora. Kelima faktor dimaksud adalah: (1) genotipe tanaman donor, (2) kondisi pertumbuhan tanaman donor, (3) tahap perkembangan mikrospora, (4) praperlakuan, dan (5) medium kultur.

Khusus untuk tahap perkembangan mikrospora, secara alamiah mikrospora akan berkembang menjadi sel gamet jantan dan berperan dalam zigot bagi proses pembentukan buah. Akan tetapi, secara artifisial mikrospora dapat diinduksi untuk membentuk kalus atau embrio selama kultur *in vitro*. Selanjutnya diregenerasikan hingga menjadi embrio dan tanaman. Mikrospora harus berada pada tahap perkembangan yang sesuai, yakni mulai dari tahap uni-nukleat tengah "mid-uninucleate" hingga tahap binukleat awal "early-binucleate" bagi tanaman yang responsif.

Dalam kultur mikrospora akan dihasilkan tanaman baru dengan konstitusi genetik separuh (*haploid*) dari genom penuhnya.

Haploid yang dilambangkan sebagai  $n$  adalah organisme, sel, atau inti sel yang memiliki hanya satu salinan kromosom dari setiap kromosomnya (Maclean, 1987). Dengan demikian, tanaman haploid adalah tanaman yang hanya memiliki setengah dari genom lengkapnya, sedangkan tanaman haploid ganda adalah tanaman yang memiliki genom haploid yang berganda.

Menurut Jhri dan Rao (1984) dan Morrison dan Evans (1988), bahwa kultur mikrospora bermanfaat untuk : (1) perbaikan klon, (2) menyingkat program pemuliaan tanaman, dan (3) memudahkan seleksi secara langsung pada suatu sifat karena disandikan oleh alel atau alel-alel homozigot sehingga ekspresi sifat tersebut menjadi optimal. Sementara itu, Shariatpanahi *et al.* (2006) dan Rimbera *et al.* (2007) mengemukakan bahwa manfaat pembentukan tanaman haploid melalui kultur mikrospora pada tanaman menyerbuk sendiri adalah untuk: (1) mempercepat program pemuliaan tanaman, (2) memperbaiki efisiensi seleksi, (3) mendeteksi ketertautan dan interaksi gen, (4) menduga varians genetik dan jumlah gen bagi sifat-sifat kuantitatif, (5) menghasilkan translokasi genetik, (6) menghasilkan galur-galur dengan penambahan kromosom dan substitusi, dan (7) memudahkan studi transformasi genetik dan mutasi.

Suatu sifat yang disandikan oleh alel resesif akan tertutupi oleh alel dominan bila berada pada konstitusi heterozigot. Akan tetapi, bila suatu sifat disandikan oleh alel heterozigot maka tanaman tersebut akan mempunyai individu mikrospora dengan konstitusi genetik haploid yang berbeda dan masing-masing membawa alel resesif atau dominan dari sifat tersebut. Bila mikrospora dimaksud dikulturkan, alel resesif tersebut akan segera terdeteksi hanya dalam generasi pertama hasil kultur mikrospora. Dengan demikian, suatu sifat yang disandikan oleh alel resesif atau alel dominan, dengan mudah dapat dilakukan seleksi lebih awal.

Tulisan ini membahas ciri morfologi bunga tanaman jarak pagar yang banyak (lebih dari 50 %) mengandung mikrospora pada tahap uninukleat tengah hingga uninukleat akhir. Informasi ciri morfologi ini sangat menentukan keberhasilan pelaksanaan kultur antera dan atau kultur mikrospora karena pada fase mikrospora seperti inilah yang bisa

membelokkan arah perkembangan mikrospora dari status fungsional sebagai sel jantan (tepung sari, "pollen grains") menjadi embrio dan "plantlet" selama kultur *in vitro*.

## BAHAN DAN METODE

Satu batang tanaman donor sepanjang 20-30 cm yang diperoleh dari petani, ditanam di dalam polibag berukuran 35-45 cm yang berisi medium tanaman tanah lapisan atas dan pupuk kandang dengan perbandingan yang sama. Sebanyak 17 polibag yang berisi masing-masing satu batang tanaman donor, ditata di lapangan tanpa pola rancangan tertentu. Setelah tumbuh, tanaman dipelihara hingga berbunga dengan pemberian pupuk NPK pada dosis yang sesuai, penyiraman medium tanaman secara berkala sesuai kebutuhan, dan pencegahan pengganggu dengan pestisida.

Setelah berbunga, tangkai bunga dipetik dari pohon utamanya, kemudian beragam ukuran (diameter dan panjang) bunga diukur. Dengan menggunakan sepasang pinset berujung runcing, antera dikeluarkan dari dalam bunga kemudian diletakkan di atas "deckglass" yang telah ditetesi larutan 3% sukrosa. Mikrospora dikeluarkan dari dalam antera dengan membelah dinding antera, sedangkan kotoran berupa serpihan antera dibuang kemudian ditutup dengan "coverslip". Tahap perkembangan mikrospora diamati dengan mikroskop cahaya dalam dua kategori, yaitu: (1) "uninucleate", dan (2) "bi- dan multinucleate". Ciri masing-masing tahap perkembangan mikrospora mengacu pada Zhang *et al.*, (2005) dan Gonzalez dan Jouve (2005).

Variabel yang diamati pada penelitian ini adalah: (1) jumlah bunga setiap tandan; (2) panjang dan diameter bunga; (3) panjang dan lebar antera untuk semua ukuran bunga; (4) klasifikasi mikrospora berdasarkan fase-fase perkembangannya melalui pewarnaan inti, dan (5) melakukan pencatatan informasi kualitatif lainnya yang berkaitan dengan morfologi bunga.

Data hasil perhitungan ditabulasi, kemudian dihitung nilai rerata dan simpangan bakunya. Semua perhitungan dilakukan dengan paket Statistika SAS (SAS Institute Inc., 1989-1996) menggunakan komputer.

## HASIL

Penanaman tanaman jarak pagar sebagai sumber mikrospora dilakukan sebanyak dua kali. Pertama dilakukan untuk tiga pot tanaman, dan kedua untuk 14 pot tanaman. Setiap pot terdiri dari satu batang atau satu pohon, sehingga seluruhnya terdapat 17 pot atau 17 pohon. Sedangkan pemeliharaan tanaman dilakukan dalam bentuk pemupukan Urea, TSP, dan KCl, berturut-turut dengan dosis 200, 100, dan 100 kg ha<sup>-1</sup>. Penyiraman

medium tanam dilakukan secara berkala sesuai fase pertumbuhan dan kebutuhan tanaman. Pencegahan jasad pengganggu pertumbuhan tanaman dilakukan secara fisik dengan membunuh langsung jasad sasaran, dan secara kimiawi dilakukan dengan penyemprotan menggunakan insektisida atau pestisida.

Penampilan pertumbuhan dan perkembangan tanaman jarak pagar sumber mikro-spora sebagai eksplan dalam penelitian ini di perlihatkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Pertumbuhan dan perkembangan tanaman jarak pagar sebagai sumber eksplan

Penentuan ciri morfologi bunga yang mengandung mikrospora yang sesuai bagi kultur mikrospora, meliputi: (1) menghitung jumlah bunga setiap tandan; (2) mengukur panjang dan diameter setiap bunga; (3) mengukur panjang dan lebar antera untuk semua ukuran bunga; (4) mengisolasi, menghitung, dan mengklasifikasikan mikrospora berdasarkan fase perkembangannya melalui pewarnaan inti, dan (5) melakukan pencatatan informasi kualitatif lainnya yang berkaitan dengan morfologi bunga. Umur pohon mulai berbunga

pertama, lama waktu yang diperlukan sejak inisiasi kuncup bunga hingga panen tandan atau rangkaian bunga untuk siap digunakan bagi pengamatan morfologi tandan atau rangkaian bunga.

Rerata panjang, jumlah cabang, dan jumlah bunga dari 10 rangkaian bunga disajikan pada Tabel 1, sedangkan morfologi ke sepuluh rangkaian bunga sebagai sampel dalam penelitian ini disajikan pada Gambar 2. Sementara itu, rerata lebar dan panjang bunga berturut-turut dicantumkan pada Tabel 2 dan Tabel 3.

Tabel 1. Rerata panjang rangkaian bunga, jumlah cabang bunga, dan jumlah bunga

Nomor Bunga	Panjang rangkaian bunga (cm)	Jumlah cabang bunga (buah)	Jumlah bunga (buah)
1	6,75	4	28
2	8,50	12	72
3	8,50	8	45
4	9,00	12	64
5	8,00	6	20
6	8,50	6	20
7	7,50	10	50
8	9,00	14	87
9	7,50	8	44
10	8,50	8	34
Total	81,75	88	464



Gambar 2. Morfologi 10 rangkaian bunga tanaman jarak pagar yang diamati dalam penelitian.

Tabel 2. Rerata lebar bunga

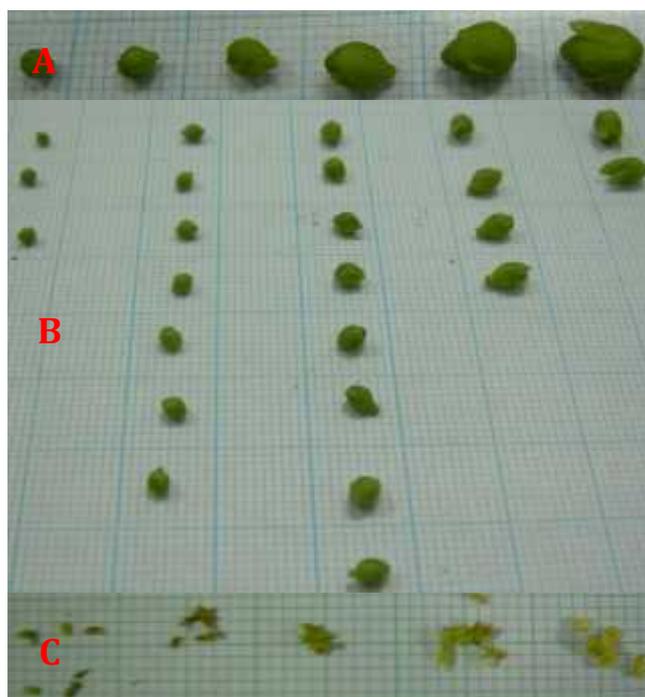
Nomor Bunga	Jumlah Bunga Menurut Ukuran Lebar (milimeter)						Total
	< 2	2 - < 3	3 - < 4	4 - < 5	5 - < 6	6 >	
1	2	3	7	6	5	5	28
2	6	13	18	20	10	5	72
3	11	9	8	7	6	4	45
4	8	6	9	10	13	18	64
5	3	2	5	3	4	3	20
6	2	3	3	6	3	3	20
7	3	4	3	14	12	14	50
8	4	14	16	16	17	20	87
9	2	4	9	8	10	11	44
10	2	3	5	6	4	14	34
Total	43	61	83	96	84	97	464
Rerata	4,3	6,1	8,3	9,6	8,4	9,7	46,6
Std. Dev.	3,09	4,38	5,10	5,38	4,70	6,50	22,41

Demikian pula, penampilan masing-masing bunga menurut enam klasifikasi panjang dan lebar bunga ditampilkan pada Gambar 3.

Pengukuran rerata panjang bunga menurut 10 rangkaian bunga yang digunakan dalam penelitian ini menunjukkan ukuran yang beragam. Hasil analisis masing-masing kelas ukuran panjang individu bunga, juga menunjukkan variabilitas yang beragam. Bunga tanaman jarak pagar mempunyai lebar dan panjang yang hampir sama sehingga ukuran panjang relatif sama dengan lebarnya, kecuali bagi bunga yang telah memasuki fase

penyerbukan atau fase dimana bakal biji telah terbentuk. Bunga pada tahap ini mempunyai ukuran panjang yang lebih besar dari lebar bunga sehingga bunga tersebut nampak lebih panjang.

Berdasarkan tahap perkembangan mikrospora, frekuensi mikrospora uninukleat tengah dan akhir diperoleh pada bunga dengan lebar dan panjang 2-3 mm (Tabel 5). Bunga yang berukuran panjang dan atau lebar lebih dari 3 mm adalah morfologi yang tidak sesuai bagi pelaksanaan kultur mikrospora secara *in vitro*.



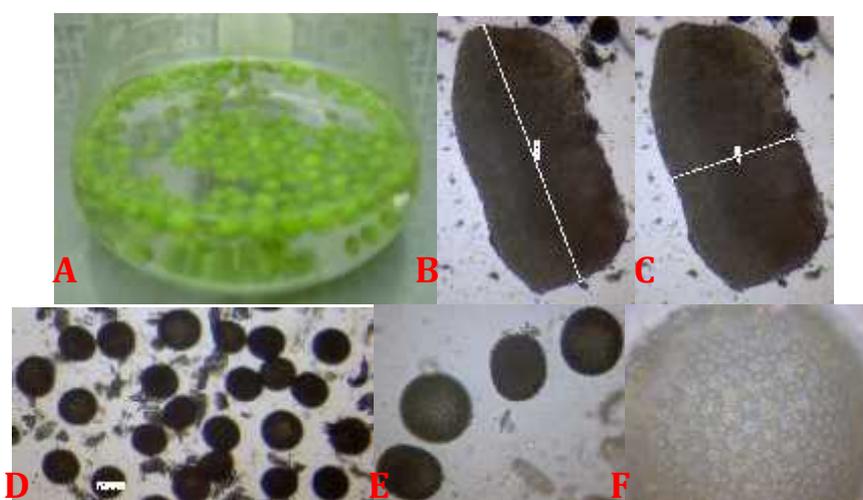
Gambar 3. Penampilan ukuran panjang dan lebar individu bunga tanaman jarak pagar.

Tabel 3. Rerata panjang bunga

Nomor Bunga	Jumlah Bunga Menurut Ukuran Panjang (milimeter)						Total
	< 2	2 - < 3	3 - < 4	4 - < 5	5 - < 6	6 >	
1	4	5	6	8	4	1	28
2	8	16	20	24	12	2	72
3	12	8	11	6	8	0	45
4	0	4	6	9	30	15	64
5	2	3	4	6	5	0	20
6	0	0	4	8	2	6	20
7	2	1	3	14	16	14	50
8	8	16	15	14	10	24	87
9	4	6	12	14	8	0	44
10	0	3	6	8	3	14	34

Tabel 4. Rerata persentase (%) mikrospora uninukleat tengah dan akhir menurut panjang dan lebar bunga

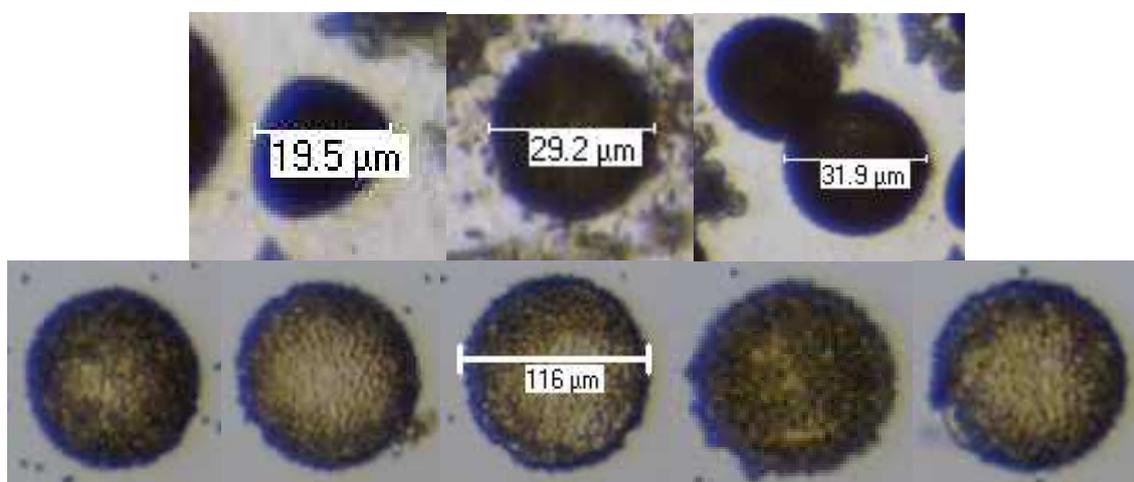
Ulangan	Persentase Mikrospora Uninukleat Tengah dan Akhir Menurut Ukuran Panjang dan Lebar Bunga (milimeter)					
	< 2	2 - < 3	3 - < 4	4 - < 5	5 - < 6	6 >
1	20,46	80,68	10,24	2,86	0,00	0,00
2	18,26	89,76	5,83	0,82	0,00	0,00
3	10,36	86,94	4,42	1,84	0,00	0,00
Total	49,08	257,38	20,49	5,52	0,00	0,00
Rerata	16,36	85,79	6,83	1,84	0,00	0,00
Std. Dev.	5,31	4,65	3,04	1,02	0,00	0,00



Gambar 4. Sterilisasi bunga (A) sebelum isolasi antera (B dan C) dan mikrospora (D, E dan F).

Sementara itu, penampilan mikrospora embriogenik setelah mendapat praperlakuan stres menunjukkan perubahan morfologi, yaitu semakin bertambahnya ukuran mikrospora. Besarnya perubahan ukuran

karena bertambahnya volume mikrospora minimal sebesar 100% atau paling kecil dua kali lebih besar dari ukuran mikrospora non-embriogenik atau mikrospora yang belum mendapat praperlakuan stres (Gambar 5).



Gambar 5. Morfologi berbagai mikrospora non-embriogenik (panel atas) dan mikrospora embriogenik (panel bawah) setelah mendapat kombinasi praperlakuan stres suhu, lama inkubasi, dan medium starvasi.

## PEMBAHASAN

Pengamatan morfologi bunga yang mengandung mikrospora uninukleat terbanyak tidak ditentukan oleh panjang rangkaian bunga, akan tetapi lebih ditentukan oleh panjang dan lebar bunga. Hal ini terlihat dari populasi mikrospora uninukleat yang lebih besar yang sangat berhubungan dengan ukuran bunga, bukan ukuran rangkaian bunga. Bunga dengan lebar dan panjang 2-3 mm, mengandung mikrospora uninukleat tengah dan akhir yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan bunga dengan lebar dan panjang kurang dari 2 mm atau lebih dari 3 mm. Bahkan bunga dengan panjang dan lebar < 2 mm mengandung mikrospora uninukleat awal yang lebih tinggi, sedangkan bunga dengan panjang dan lebar > 3 mm mengandung tepung sari dengan frekuensi yang lebih tinggi (Tabel 5).

Fenomena di atas umumnya telah dilaporkan oleh banyak peneliti atau kelompok peneliti pada berbagai tanaman budidaya. Tanaman-tanaman dimaksud seperti tanaman tembakau (Volcov *et al.*, 2005), *Brassica* (Zhang *et al.*, 2006), kedelai (Rodrigues *et al.*, 2006), tomat (Segui-Semarro dan Nuez, 2007), dan kentang (Panahandeh *et al.*, 2008). Bagi tanaman jarak pagar, selain morfologi bunga berupa panjang dan lebar bunga, umur bunga juga menentukan frekuensi mikrospora uninukleat tengah dan akhir. Semakin tua umur bunga akan semakin tinggi frekuensi mikrospora pada tahap lebih lanjut atau polen sehingga tidak sesuai untuk digunakan sebagai eksplan bagi penyelenggaraan kultur mikrospora secara *in vitro*.

Selain itu, ukuran antera bagi beberapa spesies tanaman juga berhubungan erat dengan fase perkembangan mikrospora. Pada tanaman cabai, ukuran dan warna antera diketahui berpengaruh terhadap fase perkembangan mikrospora (Indrianto *et al.*, 2004; Supena *et al.*, 2006). Indrianto *et al.* (2004) menguraikan bahwa mikrospora tanaman cabai besar pada tahap *tetrad* hanya dijumpai pada kuncup bunga yang berukuran 0,3-0,5 cm. Antera yang berwarna hijau muda, sebagian hijau dan sebagian ungu, akan mengandung mikrospora uninukleat. Setelah bunga berukuran 0,6-0,8 cm dan anteranya berwarna ungu muda, bunga hanya akan

mengandung mikrospora binukleat. Dengan demikian, tahap perkembangan mikrospora di dalam antera sangat ditentukan oleh ukuran bunga dan antera, sehingga penggunaan ciri morfologi bunga atau ukuran kuncup merupakan cara yang tepat dalam menentukan tahap perkembangan mikrospora.

## SIMPULAN DAN SARAN

Hasil percobaan dapat disimpulkan bahwa morfologi bunga tanaman jarak pagar yang sesuai bagi kultur mikrospora adalah ketika bunga mempunyai panjang dan lebar antara 2-3 mm, dan berumur hanya setelah beberapa hari setelah inisiasi bunga, dan dengan antera berwarna kuning muda.

Dari hasil penelitian ini bisa dijadikan sebagai informasi awal bagi penelitian-penelitian lebih lanjut sehingga bisa ditemukan formula yang lebih sesuai bagi tanaman jarak pagar.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bhojwani SS, Bhatnagar SP, 1999. The embryology of angiosperms. 4<sup>th</sup> revised and enlarged edition, pp. 308-321. Vikas Publishing House PVT.LTD.
- Gonzalez JM, Juvé N. 2005. Microspore development during *in vitro* androgenesis in triticale. *Biologia Plantarum*, 49(1): 23-28.
- Hansen NJP, Andersen SB, 1996. *In vitro* chromosome doubling potential of colchicine, oryzalin, trifluralin, and APM in *Brassica napus* microspore culture. *Euphytica*, 88: 159-164.
- Indrianto A, Semiarti E, Surifah, 2004. Produksi galur murni melalui induksi embriogenik mikrospora cabai merah dengan stres. *Zuriat*, 15(2): 133-139.
- Jhri BM, Rao PS. 1984. *Experimental embryology*. Dalam: Jhri BM (ed.). *Embryology of Angiosperms*. pp. 735-802. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.
- Kush GS, Virmani SS. 1996. *Haploids in plant breeding*. Dalam: Jain SM, Sopory SK, Veilleux RE. (eds.) *In Vitro Haploid Production in Higher Plants*. Vol.1. Fundamental Aspects and Methods. pp.12-17. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- Maclean N. 1987. *Macmillan Dictionary Of Genetics and Cell Biology*. Macmillan Reference Books. The Macmillan Press Ltd. London Basingstoke, 422pp.
- Morrison RA, Evans DA. 1988. Haploid plants from tissue culture: New plant varieties in a

- shortened time frame. *Bio/ Technology*, 6: 684-690.
- Panahandeh J, Valizadeh M, Khosroshahly M, Yermishin AP, Khoei FR, Mahna N. 2008. Microsporogenesis and crossing behavior of a tetraploid, interspecific inter-EBN hybrid potato. *Scientiae Horticulturae*, doi:10.1016/j.scienta.2008.02.006
- Palmer CE, Keller WA. 1997. *Pollen embryos*. Dalam: Shrivanna KR, Sawney VK (eds.). *Pollen Biotechnology for Crop Production and Improvement*. pp. 392-422. Cambridge University Press. U.K.
- Rajore S, Batra A. 2005. Efficient plant regeneration via shoot tip culture in *Jatropha curcas* L. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 14: 73-75.
- Rimbera FK, Adaniya S, Ishimine Y, Etoh T. 2007. Morphology of papaya plants derived via anther culture. *Scientia Horticulturae*, 111: 213-219.
- Rodrigues LR, Camargo-Forte B.de, Bodanese-Zanettini MH. 2006. Isolation and culture of soybean (*Glycine max* L. Merrill) microspores and pollen grains. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49(4): 537-545.
- SAS Institute Inc. 1989-1996. *SAS/STAT User's Guide Release 6.12*. SASInstitute, Inc., Cary, N.C.
- Segui-Simarro JM, Nuez F. 2007. Embryogenesis induction, callogenesis, and plant regeneration by in vitro culture of tomato isolated microspores and whole anthers. *Journal of Experimental Botany*, doi: 10.1093/jxb/erl271.
- Shariatpanahi ME, Belogradova K, Hessamvasiri L, Heberle-Bors E, Touraev A. 2006. Efficient embryogenesis and regeneration in freshly isolated and cultured wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores without stress pretreatment. *Plant Cell Reports*, DOI 10.1007/s00299-006-0205-7.
- Supena EDJ, Muswita W, Suharsono S, Custers JBM. 2006. Evaluation of crucial factors for implementing shed-microspore culture of Indonesian hot pepper (*Capsicum annum* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae*, 107: 226-232.
- Volcov RA, Irina, Panchuk I, Schoffl F. 2005. Small heat shock proteins are differentially regulated during pollen development and following heat stress in tobacco. *Plant Molecular Biology*, 57:487-502.
- Wang M, Van Bergen S, Van Duijn B. 2000. Insight into a key developmental switch and its importance for efficient plant breeding. *Plant Physiology*, 124: 523-530.
- Zhang Z, Lu Y, Liu X, Feng J, 2005. Nuclear and cell migration during pollen development in rice (*Oryza sativa* L.). *Sex Plant Reproduction*, 17: 297-302.
- Zhang SF, Ma CZ, Zhu JC, Wang JP, Wen YC, Fu TD, 2006. Genetic analysis of oil content in *Brassica napus* L. using mixed model of major gene and polygene. *Acta Genetica Sinica*, 33 (2): 171-180.