

PERAKITAN VARIETAS JERUK TANPA BIJI MELALUI PEMULIAAN KONVENSIONAL DAN NONKONVENSIONAL

Development of Seedless Citrus Through Conventional and Non-conventional Breeding

Mia Kosmiatin dan Ali Husni

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian
Jalan Tentara Pelajar No. 3A, Cimanggu, Bogor, 16114
Telp. (0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820
E-mail: borif@indo.net.id

Diterima: 2 Februari 2018; Direvisi: 29 Oktober 2018; Disetujui: 19 November 2018

ABSTRAK

Jeruk dengan biji yang banyak kurang disukai konsumen meskipun rasanya manis. Para pemulia sudah sejak lama melakukan pemuliaan tanaman jeruk untuk mendapatkan kultivar dengan buah tanpa biji (*seedless*). Strategi pemuliaan yang dilakukan untuk mendapatkan buah jeruk *seedless* meliputi penerapan teknik konvensional dan nonkonvensional. Teknik konvensional dikembangkan melalui persilangan seksual terkontrol atau persilangan interploid. Pemindahan karakter *seedless* dengan teknik persilangan seksual harus dilakukan dengan memanipulasi teknik persilangan untuk mendapatkan progeni yang berkarakter *seedless*. Manipulasi teknik persilangan dilakukan dengan modifikasi lingkungan, aplikasi ZPT, pemilihan tetua yang tepat dan penyelamatan embrio. Teknik nonkonvensional yang telah dilakukan dalam pemuliaan jeruk *seedless* meliputi penyelamatan embrio, kultur endosperma, mutagenesis *in vitro*, hibridisasi somatik interspesifik dan interploid, produksi siberid, serta perakitan tanaman transgenik. Saat ini pemuliaan untuk mendapatkan tanaman jeruk dengan karakter *seedless* banyak dilakukan melalui pendekatan manipulasi ploidi dengan target diperolehnya tanaman triploid yang akan menghasilkan buah *seedless*. Balitbangtan sudah berhasil mendaftarkan varietas jeruk tanpa biji, Pamindo Agrihorti (2016) dan SoE86 Agrihorti (2017), yang dihasilkan melalui pemuliaan mutasi. Selain itu juga telah diperoleh beberapa galur jeruk triploid dan jeruk hasil fusiprotoplas yang sedang diujiadaptasikan di dataran rendah dan tinggi.

Kata kunci: *Citrus spp.*, tanpa biji, perakitan tanaman, konvensional, bioteknologi

ABSTRACT

Existence of seeds in the citrus fruit, becomes a major problem that it cannot be received by consumer, even though the fruits has a good taste. Citrus breeders have long been conducting research to improvement of seedless cultivars with the diverse approach. Breeding's strategies to gain seedless character covering conventional and non-conventional techniques. Conventional technique develop through controlled sexual or interploid crossing. Seedless character transfer by sexual crossing technique have to do trough manipulate of crossing technique to gain seedless progeny. Crossing technique manipulate through environment

manipulation, application of plant growth regulators, parent's selections and embryo rescue. Non-conventional technique to seedless improvement cover to embryo rescue, endosperm culture, in vitro mutagenesis, inter species and inter ploidi somatic hybridization, cybrid production, and develop of GMO. Current breeding to improve seedless citrus done by ploidy manipulation approach with the target is triploid plant which produce seedless. Indonesian Agency for Agricultural Research and Development-IAARD have succeeded registering varieties of seedless citrus, Pamindo Agrihorti (2016) and SoE86 Agrihorti (2017), which resulted from mutation breeding. Furthermore there are also various line of triploid citrus and citrus obtained through protoplast fusion and being adaptation tested at lowland and highland.

Keywords: *Citrus spp.*, *seedless*, plant improvement, conventional, biotechnology

PENDAHULUAN

Buah jeruk yang dapat bersaing dipasar global ialah yang berkualitas tinggi dengan rasa manis (organoleptik tinggi), mudah dikupas, warna kulit menarik, dan sedikit biji hingga tanpa biji (*seedless*). Sifat *seedless* merupakan salah satu kriteria penting dalam industri jeruk internasional (Sajid *et al.* 2013). Biji menjadi halangan dalam pemasaran jeruk mandarin meskipun memiliki karakter organoleptik yang tinggi. Hal ini ditunjukkan oleh jeruk impor yang hampir seluruhnya *seedless*. Oleh karena itu, karakter manis pada jeruk menjadi tidak penting secara komersial.

Keberhasilan pembentukan buah jeruk *seedless* secara alami melalui proses partenokarpi alami maupun mutasi spontan kurang dari 0,02% (Ahloowalia dan Khush 2001), sehingga diperlukan teknologipeningkatan peluang pembentukan buah jeruk *seedless*. Kini banyak pemulia tanaman jeruk menggunakan metode rekombinasi seksual pada progeni untuk mendapatkan sifat *seedless*. Metode pemuliaan dengan memanfaatkan bioteknologi juga mulai dikembangkan untuk mendapatkan jeruk *seedless*. Dalam tulisan ini dibahas berbagai pendekatan

untuk merakit varietas jeruk yang memiliki karakter *seedless*.

MEKANISME PEMBENTUKAN BUAH SEEDLESS

Secara alami, beberapa jenis buah-buahan dan sayuran mampu memproduksi buah *seedless*, tetapi jumlahnya kurang dari 0,02%. Potensi pembentukan buah *seedless* yang tinggi umumnya terjadi pada tanaman yang bersifat partenokarpi obligat, sementara pada tanaman yang partenokarpi fakultatif akan membentuk buah berbiji bila terjadi fertilisasi (Aleza *et al.* 2009; Vardi *et al.* 2008). Oleh karena itu, pada tanaman yang bersifat partenokarpi fakultatif perlu dicegah polinasi oleh tanaman lain atau budidaya jeruk perlu dilakukan secara monokultur.

Sifat partenokarpi obligat pada tanaman jeruk cukup tinggi, seperti dijumpai pada jeruk mandarin Satsuma, Pomelo Marsh, dan Navel Washington yang diakibatkan oleh sterilitas gamet yang pada kondisi optimal bisa mencapai 90% *seedless* (Ollitrault *et al.* 2007). Sampai saat ini gen-gen yang mengatur sifat partenokarpi belum diketahui secara jelas, terutama tingkat fertilitas ovul dan abnormalitas polen. Diduga hal ini berkaitan dengan meiosis yang tidak biasa atau abnormal pada saat gametogenesis.

Beberapa jenis jeruk memiliki sifat partenokarpi fakultatif seperti anggur, pisang, dan nanas yang polinasinya diperlukan dalam membentuk buah tetapi fertilisasi tidak terjadi, sehingga bersifat *seedless*. Tanaman yang bersifat partenokarpi fakultatif biasanya dikombinasikan dengan proses pencegahan fertilisasi untuk menghasilkan buah *seedless*. Banyak usaha yang dapat dilakukan untuk mencegah fertilisasi seperti manipulasi lingkungan pada saat polinasi-fertilisasi, aplikasi bahan kimia, dan aberasi kromosom. Secara genetik, sifat partenokarpi fakultatif harus digabungkan dengan sifat *self incompatible-SI* untuk mendapatkan tanaman yang menghasilkan buah *seedless* (Vardi *et al.* 2008). Jenis jeruk yang bersifat partenokarpi fakultatif antara lain jeruk manis Valencia dan Mukaki kishu (Koltunow *et al.* 1998; Yamasaki *et al.* 2009).

Buah *seedless* dapat terbentuk pada saat polinasi terjadi tetapi mengalami kegagalan fertilisasi. Pada kondisi ini buah tetap dapat berkembang apabila didukung oleh zat pengatur tumbuh (ZPT) cukup tinggi untuk mendukung pertumbuhan (Mesejo *et al.* 2014). Beberapa ZPT berperan dalam pertumbuhan buah, diantaranya asam giberelat-GA, sitokinin, dan auksin. Peranan ZPT indogenous dapat diganti dengan ZPT eksogenous (Goetz *et al.* 2006a) sehingga partenokarpi dapat dilakukan secara buatan. Meskipun demikian, aplikasi ZPT sintetik memerlukan biaya tinggi dan pada beberapa jenis buah dapat menyebabkan kecacatan pada karakter yang lain (Vardi *et al.* 2008).

Selain partenokarpi, pembentukan buah *seedless* dapat terjadi karena proses poliploidisasi secara spontan, sehingga memiliki tiga set kromosom atau lebih. Kultivar dengan jumlah kromosom triploid bernilai tinggi karena buah tidak memiliki biji seperti jeruk triploid alami Tahiti Lime yang sudah komersial sejak tahun 1940. Manipulasi tingkat ploidi secara alami maupun diinduksi berperan penting dalam domestikasi dan perkembangan tanaman budi daya. Manipulasi tingkat ploidi berpotensi membawa perubahan secara genotipe maupun fenotipe.

Secara alami, tingkat perubahan ploidi sangat rendah, sekitar 0,02% dan bergantung pada kemampuan partenokarpi, mandul jantan/betina dan inkompatibilitas tanaman asal (Vardi *et al.* 2008). Produksi buah triploid merupakan salah satu indikator keberhasilan upaya peningkatan kualitas buah jeruk segarseedless. Ketidakseimbangan perpasangan kromosom triploid menyebabkan tidak berkembangnya biji sehingga fenomena ini digunakan untuk mengembangkan buah *seedless* (Recupero *et al.* 2005). Pemanfaatan tanaman triploid menjadi penting karena tidak melibatkan modifikasi genetik, sehingga lebih mudah diterima pasar. Tanaman jeruk triploid lebih disukai karena lebih vigor, daun lebih lebar dan tebal, tumbuh lebih cepat, panen lebih baik, dan dapat beradaptasi pada lingkungan yang lebih luas dibanding tanaman jeruk tetraploid (Usman *et al.* 2006). Dengan berbagai kelebihanannya, jeruk triploid memiliki nilai ekonomis yang lebih tinggi dibanding jeruk poliploid, bahkan dengan tanaman diploid sekalipun.

PERSILANGAN SEKSUAL DIPLOID-DIPLOID

Pada jeruk, progeni dengan jumlah set kromosom triploid dan tetraploid, secara spontan dapat terjadi pada benih zigotik hasil persilangan seksual. Dalam beberapa polinasi terbuka, progeni dari tanaman jeruk kultivar Lisbon Lemon, Eureka Lemon, jeruk manis Rubi dan Pomelo Imperial Estelamemiliki triploid yang umum terjadi (Esen dan Soost 1972).

Frekuensi progeni triploid bergantung pada genotipe dengan frekuensinya 1-3% (Sattler *et al.* 2016). Biji triploid spontan dapat dibedakan secara akurat karena ukurannya lebih kecil dari biji diploid, berkisar antara 1/6-1/3. Perbedaan juga terlihat dari perkembangan embrio dan perkecambahan, yang pada jeruk triploid lebih lambat dibanding jeruk diploid pada umur yang sama setelah polinasi (Esen dan Soost 1973). Dengan berkembangnya teknologi *in vitro*, khususnya penyelamatan embrio (*embryo rescue*), biji-biji yang gagal tumbuh dapat dkecambahkan sehingga tanaman triploid dapat diperoleh (Navarro *et al.* 2004).

Kemungkinan adanya penggandaan atau eliminasi kromosom yang terjadi pada sel telur sering mengakibatkan tingkat ploidi embrio menjadi triploid.

Pada embrio triploid, pembelahan kedua saat meiosis tidak terjadi sehingga megaspora fungsional menghasilkan megagametofit diploid (Esen *et al.* 1979). Triploid spontan alami terjadi pada saat gamet diploid yang tidak direduksi bergabung dengan gamet haploid (Sajid *et al.* 2013). Dengan manipulasi lingkungan dan persilangan terkontrol, frekuensi terbentuknya gamet diploid dapat ditingkatkan hingga 1-14% (Aleza *et al.* 2010; Aleza *et al.* 2016). Untuk mendapatkan tanaman triploid, embrio triploid spontan harus dikulturkan secara artifisial - *in vitro*, seperti halnya embrio triploid yang diperoleh dari persilangan interploid. Di Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Moncada, Spanyol, setelah 10 tahun (1996-2006) melakukan persilangan terkontrol diploid-diploid yang bersifat apomitik maupun nonapomitik telah berhasil mendapat sekitar 4.000 progeni triploid yang embrionya diselamatkan secara *in vitro* dan 13 diantaranya telah dilepas sebagai varietas jeruk triploid dengan keunggulan berbeda (Aleza *et al.* 2010), seperti Red Racle (2008), Garbi (2009), Safor (2010).

PERSILANGAN SEKSUAL ANTARA TETUA DIPLOID DAN TETRAPLOID

Menyilangkan tanaman diploid menggunakan tetua betina diploid monoembrionik, yang secara genetik mampu mengurangi pembentukan megaspora dengan persentase yang tinggi, dengan tetua tetraploid, merupakan metode yang umum untuk mendapatkan tanaman triploid (Geraci *et al.* 1982). Persilangan interploid seringkali hanya mampu menghasilkan hibrid triploid yang sangat sedikit sehingga sulit dideteksi dan dipisahkan dengan embrio diploid yang berasal dari tetua betina poliembrionik.

Tanaman tetraploid dapat diperoleh dari autotetraploid dengan induksi penggandaan kromosom menggunakan senyawa pengganda kromosom seperti kolkisin atau *oryzalin* (Dutt *et al.* 2010). Teknik penggandaan kromosom dengan senyawa pengganda kromosom terus berkembang untuk menekan pembentukan sitokimera yang menghasilkan tanaman kimera. Pada awalnya penggandaan kromosom diaplikasikan secara *in vivo* pada tunas aksilar atau *shoot tip* (Wakana *et al.* 2005). Kemudian secara *in vitro* senyawa pengganda kromosom diaplikasikan pada tunas *in vitro*. Untuk menekan pembentukan sitokimera, penggandaan kromosom dilakukan pada tingkat sel pada kalus embriogenik atau suspensi sel yang berasal dari embrio nuselar jeruk yang bersifat apomitik (Dutt *et al.* 2010; Zhang *et al.* 2007). Untuk mendapatkan tanaman tetraploid monoembrionik, aplikasi senyawa pengganda kromosom dilakukan pada ovul atau kalus embriogenik yang diinduksi dari ovul jeruk nonapomitik (Aleza *et al.* 2009).

Tanaman tetraploid juga dapat diperoleh melalui teknik hibridisasi somatik dengan menggabungkan

protoplas yang diperoleh dari sel-sel somatik. Dilaporkan bahwa melalui hibridisasi somatik diperoleh 300 kombinasi progeni hasil fusi intergenera dan interspesies dengan tingkatan ploidi tetraploid (Grosser 2004).

Gugur embrio jeruk dalam persilangan interploid antara tanaman diploid dengan tetraploid menjadi faktor pembatas dalam menghasilkan tanaman triploid. Turunan triploid dapat diselamatkan dengan penyelamatan embrio, misalnya dengan mengkulturkan embrio zigotik muda, 12-15 minggu setelah polinasi (Recupero *et al.* 2005).

Meskipun sulit dan memerlukan waktu yang panjang, beberapa persilangan interploid telah banyak dilakukan antara lain menggunakan tetua jantan poliembrionik tetraploid yang disilangkan dengan tetua betina monoembrionik diploid. Persilangan antara kultivar Satsuma (diploid) dengan tetraploid kultivar Ponkam menghasilkan turunan triploid yang terdapat pada embrio aborsi (biji gagal tumbuh) dan diselamatkan dengan kultur *in vitro* (Junko *et al.* 1997). Lembaga penelitian ISA, Italia, sudah berhasil merakit jeruk triploid Tacle hasil persilangan antara jeruk Clementine dan Taroco (Spiegel-Roy dan Vardi 1992). Pada persilangan dengan tetua jantan tetraploid, polen seringkali mengalami reduksi tetapi polen diploid yang terbentuk lebih berhasil dalam polinasi dan fertilisasi persilangan interploid (Aleza *et al.* 2012).

Jeruk triploid juga dapat diperoleh dengan menyilangkan tetua betina tetraploid dengan polen dari tetua diploid (Sajid *et al.* 2013). Persilangan menggunakan tetua betina tetraploid memberikan rasio triploid normal yang lebih baik dibandingkan dengan tetua betina diploid (Esen dan Soost 1973). Vigoritas tanaman triploid sangat tinggi meskipun perkecambahannya sangat rendah, ukuran biji sedikit lebih besar dibandingkan dengan hasil persilangan interploid resiproknya. Jenis tanaman jeruk triploid pertama hasil persilangan ini adalah Pamelohibrid Oroblando dan Melogold (Soost 1985) tanpa biji meskipun kedua tetuanya (tetraploid dan diploid) memiliki biji.

Teknik persilangan lain untuk mendapatkan tanaman jeruk triploid ialah dengan menyilangkan jeruk tetraploid dengan diploid, kemudian dilakukan silang balik. Antera atau ovul dari hasil silang balik tersebut kemudian dihaploidisasi sehingga diperoleh tanaman haploid dengan tingkatan ploidi triploid. Cara ini sudah dilakukan di New Zealand dan Australia, tetapi tingkat rekombinasinya cukup tinggi sehingga proses seleksi cukup lama dan menyulitkan. Selain itu kultur haploid juga merupakan teknik *in vitro* dengan tingkat kesulitan cukup tinggi.

Dalam persilangan interploid, hal yang harus diperhatikan ialah karakter unggul dari tetua tetraploidnya. Sebagian besar kualitas buah jeruk triploid menyerupai tetua tetraploidnya, kecuali karakter *seedless* (Recupero *et al.* 2005). Dengan demikian, pemilihan tetua diploid yang akan digandakan untuk menjadi tanaman tetraploid merupakan hal penting yang perlu dilakukan sebelum memulai proses pemuliaan interploid.

PEMANFAATAN BIOTEKNOLOGI

Percepatan perbaikan genetik dalam pemuliaan jeruk juga dapat dilakukan dengan memanfaatkan bioteknologi, melalui pemuliaan *in vitro* (kultur embrio, kultur endosperma, mutagenesis, hibridisasi somatik) dan pemuliaan molekuler (GMO).

Teknik Penyelamatan Embrio secara *In Vitro* dengan Kultur Embrio

Persilangan interploid antartetua yang tidak sama tingkat ploidinya umumnya menghasilkan biji abortus dengan tingkatan ploidi embrio triploid (Navarro *et al.* 2004), sehingga embriozotik perlu dikecambahkan secara *in vitro*. Tahapan embriozotik yang dikulturkan mempengaruhi perkecambahan dan perolehan kecambah normal jeruk. Tahapan embrio dewasa, *cotyledonary*, dan 100% dapat berkecambah dengan persentase kecambah normal lebih tinggi daripada mengecambahkan embriozotik dengan perkembangan yang lebih muda (Viloria *et al.* 2005), tetapi pada beberapa persilangan embriozotik sudah gugur sebelum mencapai tahapan embrio zigotik dewasa.

Pada embrio-embrio hasil persilangan interploid, penyelamatan dilakukan secara tidak langsung pada embrio-embrio hibrid yang gagal tumbuh. Teknik ini dapat dilakukan pada embrio pomelo zigotikhibrid yang gugur pada saat masih sangat muda sehingga sulit dikecambahkan. Embrio zigotikmuda ini lebih mudah diinduksi pembentukan kalus embriogeniknya, kemudian kalus diregenerasikan sehingga diperoleh tanaman jeruk triploid (Song dan Deng 2006).

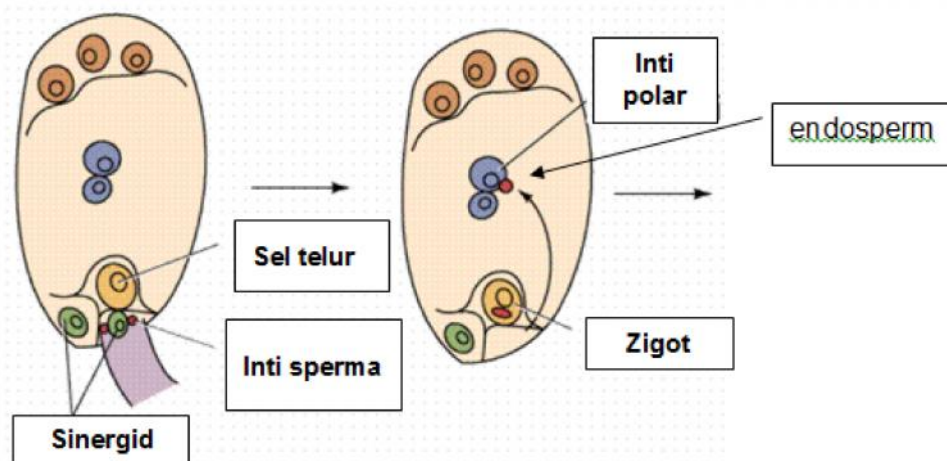
Kultur Endosperma

Endosperma adalah jaringan unik yang merupakan hasil fusi tiga inti haploid yaitu dua inti polar (O) dan satu inti polen (O) (Berger *et al.* 2008), sehingga memiliki tingkatan ploidi triploid (Gambar 1). Pada sebagian besar angiospermae, endosperma merupakan jaringan yang triploid. Dengan berkembangnya teknologi kultur jaringan, saat ini dimungkinkan mengisolasi jaringan endosperma dan meregenerasikan menjadi tanaman triploid (Hoshino *et al.* 2011).

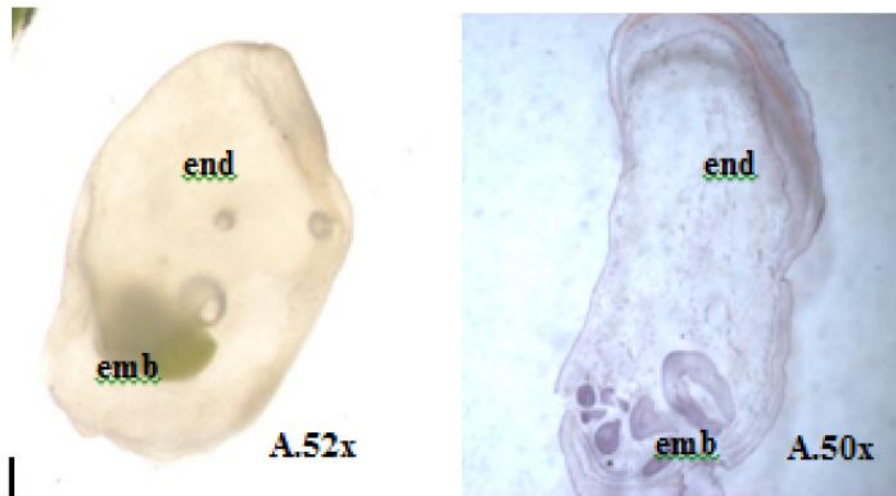
Isolasi jaringan endosperma lebih mudah dilakukan dengan bantuan mikroskop untuk memisahkan dari embrio zigotik dan nuselar (Gambar 2). Pada jeruk tangor manis (*C. reticulata* x *C. sinensis*), isolasi jaringan endosperma dapat dilakukan sejak 8 minggu setelah bunga mekar tetapi belum diketahui tanaman triploidnya (Wu dan Mooney 2002).

Tanaman jeruk siam medan triploid yang diperoleh dengan mengkulturkan jaringan endosperma yang diisolasi dari buah muda dan sudah menghasilkan jeruk *seedless* (Gambar 3). Pada pertengahan tahun 2017, produktivitas jeruk siam medan triploid diuji di dataran tinggi Karo Sumatera Utara dan dataran rendah Banyuwangi Jawa Timur, dengan teknik *top working grafting* pada tanaman jeruk milik petani sebagai batang bawah.

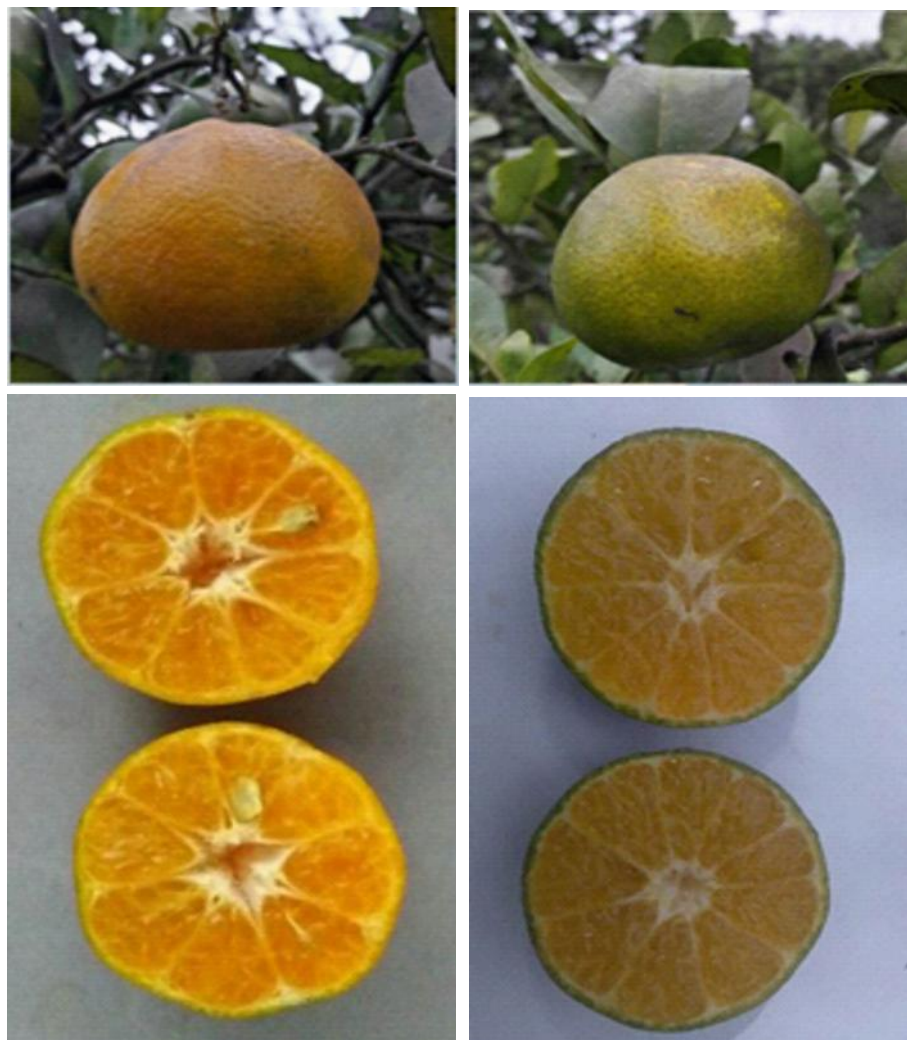
Tanaman triploid dari kultur endosperma hasil polinasi yang terkontrol dapat digunakan dalam pemuliaan jeruk untuk mendapatkan karakter *seedless*. Teknik ini relatif lebih mudah dan murah dibandingkan dengan teknik lain untuk mendapatkan tanaman triploid. Selain itu, teknik ini juga dapat mengatasi kesulitan dalam hibridisasi seksual pada tanaman yang bersifat poliembrioni, apomiksis, dan aborsi embrio.



Gambar 1. Proses pembentukan jaringan endosperm dalam fertilisasi ganda (Sumber: Berger *et al.* 2008).



Gambar 2. Jaringan endosperma yang diisolasi dari biji jeruk siam Simadu Muda, (A) preparat segar dan (B) preparat kering. End=jaringan endosperma berupa *jelly* berwarna putih; emb = embrio zigotik berwarna hijau. (Sumber: Kosmiatin 2013).



Gambar 3. Buah jeruk siam medan triploid yang diregenerasikan dari jaringan endosperma (Sumber: Kosmiatin *et al.* 2017)

Pemuliaan Mutasi

Mutasi spontan pada tanaman jeruk berperan penting dalam pembentukan varietas baru. Beberapa mutan spontan memiliki karakteristik buah yang lebih baik seperti warna buah, masa pemasakan buah yang lebih panjang, dan sifat *seedless*. Secara alami, peristiwa mutasi spontan sangat jarang, tetapi penelitian terus berkembang. Dalam 35 tahun terakhir, FAO/IAEA (International Atomic Energy Agency) mencatat sekitar 2.000 kultivar baru yang dihasilkan dari pemuliaan mutasi telah dilepas (Vardi *et al.* 2008), dan pada tahun 2006 varietas jeruk mandarin Daisy *seedless* hasil pemuliaan mutasi (Roose dan Williams 2007).

Induksi mutasi secara fisik dengan iradiasi sering memanfaatkan *fast neutrons*, sinar X atau sinar *gamma* untuk meningkatkan keberhasilan mutasi, sedangkan mutagen kimia dilaporkan kurang efisien menginduksi mutasi (Van Harten dan Broertjes 1989). Iradiasi diketahui dapat menginduksi aberasi kromosom dan tidak mematikan sel/jaringan, sehingga tanaman mutan dapat diperoleh tetapi pada tanaman berkayu sering kurang menguntungkan karena masa juvenil yang panjang. Pemuliaan tanaman jeruk melalui mutasi memerlukan waktu yang panjang dan lahan yang luas untuk mendapatkan mata tempel dengan pertumbuhan mutan yang stabil (Vardi *et al.* 2008).

Mutasi alami dapat ditemukan pada tanaman jeruk meskipun jumlahnya sangat terbatas. Penggunaan teknik iradiasi sinar gamma dan mutagen kimia mampu meningkatkan mutasi pada sel somatik untuk spesies dan varietas jeruk yang beragam. Keberhasilan dalam mendapatkan mutan stabil sangat ditentukan oleh jaringan/organ yang digunakan sebagai target. Pada Tabel 1 dapat dilihat keuntungan dan kerugian penggunaan jaringan target.

Pemuliaan mutasi sudah banyak dilakukan untuk berbagai tujuan. Pembentukan jeruk *seedless* melalui mutasi seringkali terjadi aberasi kromosom seperti inversi atau translokasi yang dapat menyebabkan keguguran polen atau ovul. Aberasi kromosom dapat meningkatkan atau menurunkan sterilitas gamet jantan maupun betina yang sangat penting untuk partenokarpi, seperti mandarin Clementin *seedless* (Spiegel-Roy dan Goldschmidt 1996). Jeruk *seedless* yang dihasilkan melalui pemuliaan mutasi

diantaranya lemon Kutdiken (*C. limon* (L.) Buró. f) yang berhasil diinduksi pembentukan buah *seedless* yang stabil dengan iradiasi pada tunas aksilar (Gulsen *et al.* 2007). Roose dan Williams (2007) juga melaporkan pomelo hibrid dan mandarin California Money dapat diinduksi pembentukan buah *seedless* dengan iradiasi tetapi pertumbuhannya lambat. Dari hasil pemuliaan mutasi, Universitas California sudah melepas jeruk tango dandaisy *seedless* (Roose dan Williams 2007). Pemuliaan mutasi di Universitas California dirancang seperti terlihat pada Gambar 4. Pemuliaan mutasi tanaman jeruk memerlukan waktu yang panjang dan pengujian bertahap untuk memperoleh mutan yang stabil. Balai Penelitian Jeruk dan Buah Sub-Tropis Balitbangtan berhasil memperoleh tanaman jeruk bali Pamindo Agrihorti pada tahun 2016 dan jeruk SoE86 pada tahun 2017. Induksi mutasi mulai dilakukan sejak 2003 pada bahan tanaman tunas dan diinduksi mutasinya dengan iradiasi sinar gamma.

Induksi mutasi terutama untuk poliploidisasi kromosom juga banyak dilakukan menggunakan senyawa mutagen kolkisin yang dapat menggandakan kromosom. Perlakuan dengan kolkisin umumnya hampir selalu berkaitan dengan kimera dimana sering terjadi percampuran populasi sel somatik dengan berbagai tingkatan ploidi. Kesulitan pemisahan tingkat ploidi yang berbedasehingga teknik ini memerlukan waktu yang panjang dan proses seleksi yang kompleks. Setelah lima tahun perlakuan kolkisin, Wakana *et al.* (2005) berhasil memperoleh jeruk tetraploid. Dilaporkan pula sudah dihasilkan tanaman jeruk tetraploid dan triploid melalui manipulasi kromosom dengan teknik kultur *in vitro* walaupun tingkat keberhasilannya masih sangat rendah (Zhanget *et al.* 2007).

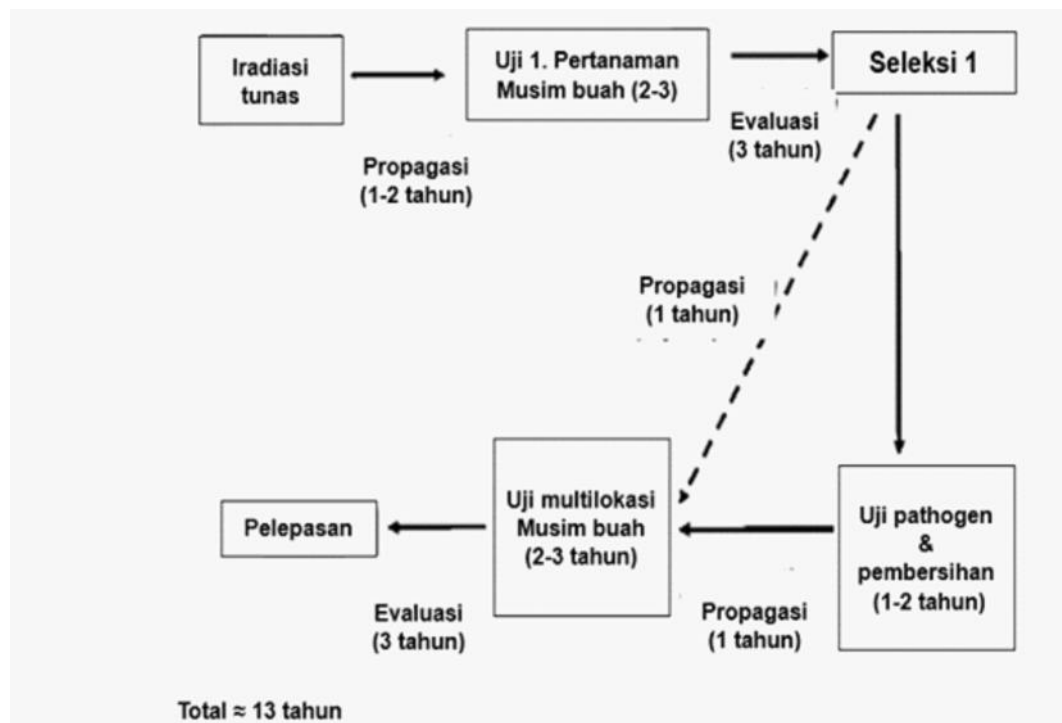
Hibridisasi Somatik

Banyak teknik yang telah dilakukan untuk mendapatkan tanaman tetraploid yang stabil. Hibridisasi somatik antara dua jenis tanaman diploid menghasilkan tanaman allotetraploid. Hibrida somatik jeruk pertamakali dihasilkan oleh Ohgawara *et al.* (1985) dan saat ini telah diperoleh sejumlah hibrida somatik dari inter dan intra genera (Grosser dan Gmitter 2011; Grosser *et al.* 2010) dari

Tabel 1. Keuntungan dan kerugian berbagai jenis/tipe jaringan yang menjadi target mutagen.

Jaringan target	Aplikasi penggunaan	Evaluasi	Khimera	Identifikasi mutan
Polen	Baik	Lama	Tidak ada	Sulit
Biji	Baik	Lama	Rendah	Beragam
Kalus embrionik	Relatif mudah	Lama	Rendah	Mudah
Tunas <i>in vitro</i>	Relatif mudah	Pendek	Tinggi	Mudah
Pucuk	Baik	Pendek	Tinggi	Mudah

Sumber: Roose dan Williams (2007).



Gambar 4. Program pemuliaan mutasi jeruk dengan teknik irradiasi di Universitas California, Amerika Serikat. Sumber: Roosedan Williams (2007).

fusi protoplas antara spesies yang sama maupun berbeda. Pertumbuhan tanaman alotetraploid, sekitar 90% lebih baik dari autotetraploid yang diinduksi mutasinya dengan kolkisin (Wuet *et al.* 2005).

Pendekatan hibridisasi somatik melalui fusi protoplas juga dapat dilakukan untuk menghasilkan tanaman triploid (Grosser 2004). Jika protoplas haploid telah diperoleh kemudian dihibridisasikan dengan protoplas diploid, maka protoplas fusan (protoplas yang sudah berfusi/bergabung) dapat diregenerasikan menjadi tanaman triploid. Keberhasilan dalam memperoleh tanaman triploid dengan teknik ini sangat rendah karena kesulitan mendapatkan protoplas haploid.

Fusi protoplas selain untuk menghasilkan tanaman tetraploid juga digunakan untuk memindahkan sifat dari satu tetua ke tetua lainnya yang tidak dapat dilakukan dengan persilangan seksual biasa. Karakter mandul/steril jantan-CMS yang terdapat dalam genom mitokondria (dalam sitoplasma) yang diturunkan secara maternal hanya terdapat pada jeruk mandarin Satsuma dan Encore (*C. unshiu* And. Dan *C. deliciosa* Ten.) (Yamamoto *et al.* 1997). Dengan teknik hibridisasi untuk menghasilkan sibirid, genom mitokondria dari tanaman CMS dapat digabungkan dengan tanaman diploid yang fértil. Saat ini ada tiga teknik fusi protoplas yang dapat dilakukan untuk mendapatkan tanaman sibirid, yaitu: (1) fusi protoplas simetrik antara protoplas yang disolasi dari kalus embriogenik yang membawa karakter CMS dan jaringan

mesofil daun (Yamamoto dan Kobayashi, 1995; Grosser *et al.* 1996); (2) fusi protoplas asimetrik, salah satu donor protoplas diirradiasi untuk menginaktifkan nukleus (Sigareva dan Earle 1997); dan (3) fusi sitoplas-protoplas atau mikroprotoplas (Louzada *et al.* 2002). Dengan pendekatan teknik fusi protoplas tersebut dapat dipindahkan karakter CMS dari sitoplasma Satsuma ke kultivar jeruk berbiji (Navarro *et al.* 2016), tetapi sampai saat ini belum ada laporan tanaman sibirid yang sudah berbuah.

Teknik hibridisasi somatik sudah dikembangkan oleh French Agricultural research and Development (CIRAD) dan sudah diperoleh 200 jeruk poliploid (Ollitrault *et al.* 1998). Di Indonesia, hibridisasi somatik jeruk telah berhasil dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (Husni 2010) dan telah dihasilkan 90 progeni yang berhasil disambungkan dengan batang bawah JC sertadiinduksi pembentukan buahnya di Balai Penelitian Jeruk dan Buah Sub-Tropika (Martasari 2014). Keberhasilan menggabungkan protoplas dua genom jeruk siam medan (*Citrus nobilis*) dan mandarin Satsuma (*C. unshiu*) dapat menghasilkan karakter organoleptik yang tinggi pada buah (Kosmiatin *et al.* 2017). Mulai tahun 2017, progeni yang dihasilkan dari fusi protoplas diuji adaptasikan pada dataran tinggi dan dataran rendah karena jeruk siam adaptif dikembangkan di dataran rendah sedangkan jeruk keprok lebih adaptif di dataran tinggi.

Teknik fusi protoplas dalam pemuliaan *in vitro* merupakan teknik yang paling sulit, tetapi jeruk merupakan salah satu tanaman berkayu yang respon terhadap kultur *in vitro*. Jeruk siam medan telah dikuasai sistem regenerasinya melalui embriogenesis somatik, sehingga kemampuan ini diandalkan dalam meregenerasi protoplas hasil fusi membentuk tanaman lengkap. Meskipun teknik ini sulit, dapat menghasilkan keragaman yang tinggi sehingga seleksi dapat dilakukan untuk berbagai karakter.

Pemuliaan Molekuler

Pada tanaman yang bersifat partenokarpi, pada saat fertilisasi terjadi peningkatan konsentrasi auksin dan GA₃ endogenous pada jaringan ovul tomat dan beberapa jenis jeruk (Mesejo *et al.* 2013; Bermejo *et al.* 2016). Secara buatan, aplikasi auksin dan GA₃ eksogenous dapat menginduksi pembentukan buah *seedless* dengan ukuran normal seperti pada tomat (Hazra *et al.* 2010). Aplikasi ZPT sangat bergantung pada genotipe dan aplikasinya dilapang relatif mahal serta kurang efektif.

Secara genetik, sifat partenokarpi dapat diperoleh tanaman dengan mengintrogressi gen yang dapat mengontrol ekspresi gen yang mengakumulasi auksin pada jaringan ovarium atau ovul sebelum antesis (Goetz *et al.* 2006). Introgressi gen *def 9-iaaM* yang diisolasi dari *Pseudomonas syringae* dapat meningkatkan sintesis auksin pada ovul (Yin *et al.* 2006). Pada tanaman jeruk, pendekatan pemuliaan molekuler untuk mendapatkan karakter *seedless* telah dilaporkan oleh Liet *et al.* (2003) yang melibatkan gen *barnase suicide*, yang ditargetkan pada integumen biji atau embrio jeruk ponkam dengan promoter spesifik tapetum, sehingga embrio menjadi gugur.

Pemuliaan molekuler untuk mendapatkan karakter *seedless* melalui pendekatan pembentukan tanaman transgenik masih menghadapi tantangan, selain regulasi yang rumit dan panjang juga karena konsumen masih enggan mengonsumsi produk GMO-rekeyasa genetik. Sampai saat ini pemuliaan molekuler untuk karakter *seedless* belum dilakukan karena terkendala oleh ketersediaan gen yang akan diintrogressikan.

KESIMPULAN

Berbagai teknik pemuliaan telah dilakukan untuk mendapatkan buah jeruk *seedless*, baik secara konvensional maupun nonkonvensional. Pada awalnya teknik pemuliaan konvensional menghadapi banyak kendala untuk dapat menghasilkan tanaman yang berbuah *seedless*. Dengan memanipulasi teknik persilangan (lingkungan, aplikasi ZPT, pemilihan tetua yang tepat, dan penyelamatan embrio), kesulitan memperoleh progeni dalam menghasilkan buah

seedless dapat diatasi. Pemilihan diploid yang akan digunakan sebagai tetua, baik melalui persilangan seksual biasa maupun interploid, berperan penting dalam menghasilkan varietas jeruk tanpa biji.

Perkembangan teknologi *in vitro* dan molekuler mendukung teknik manipulasi ploidi dan genetik melalui kultur endosperma, mutagenesis *in vitro*, dan hibridisasi seksual interploid dan interspesies, baik dengan hibridisasi somatik, pembentukan sbrid, maupun transgenik, sehingga memungkinkan dihasilkan tanaman unggul baru yang juga mampu menghasilkan buah jeruk *seedless*. Penggunaan teknik *in vitro* lebih sederhana dan tidak memerlukan regulasi yang panjang dan kompleks. Kultur endosperma menjadi teknik yang paling efisien untuk mendapatkan jeruk tanpa biji, karena sistem regenerasi sudah dikuasai dan segregasi rendah sehingga peluang untuk mendapatkan jeruk tanpa biji yang sama dengan tetuanya lebih tinggi. Saat ini Balitbangtan sudah menghasilkan dua varietas jeruk tanpa biji, Pamindo Agrihorti dan SoE86 Agrihorti. Beberapa kultivar jeruk triploid dan jeruk hasil fusi protoplas sedang diuji adaptasi di kebun-kebun petani.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahloowalia, B.S. and G.S. Khush, G.S. 2001. Renaissance in genetics and its impact on plant breeding. *Euphytica*. 118(2): 99–102.
- Aleza, P., J. Juarez, J. Cuenca, P. Ollitrault, and L. Navarro. 2012. Extensive citrus triploid hybrid production by 2x x 4x sexual hybridizations and parent-effect on the length of the juvenile phase. *Plant cell reports*. 31(9): 1723–1735.
- Aleza, P., J. Juarez, J. Cuenca, P. Ollitrault, and L. Navarro. 2010. Recovery of citrus triploid hybrids by embryo rescue and flow cytometry from 2x x 3x sexual hybridisation and its application to extensive breeding programs. [Online] 1023–1034. Available from: doi:10.1007/s00299-010-0888-7.
- Aleza, P., J. Juarez, P. Ollitrault, and L. Navarro. 2009. Production of tetraploid plants of non apomictic citrus genotypes. *Plant cell Report*. [Online] 28, 1837–1846. Available from: doi:10.1007/s00299-009-0783-2.
- Berger, F., Y. Hamamura, M. Igouf, and T. Higashiyama. 2008. Double fertilization—caught in the act. *Trends in plant science*. 13 (8), Elsevier, 437–443.
- Bermejo, A., B. Martínez-Alcantara, M. Martínez-Cuenca, R. Yuste, C. Mesejo, C. Reig, M. Agustý, E. Primo-Millo, and D. J. Iglesias. 2016. Biosynthesis and Contents of Gibberellins in Seeded and Seedless Sweet Orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) Cultivars. *Journal of plant growth regulation*. 35 (4), Springer, 1036–1048.
- Dutt, M., M. Vasconcellos, K.J. Song, F.G. Gmitter Jr., and J.W. Grosser. 2010. In vitro production of autotetraploid Ponkan mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) using cell suspension cultures. [Online] 235–242. Available from: doi:10.1007/s10681-009-0098-y.
- Esen, A. and R.K. Soost. 1972. Tetraploid progenies from 2x x 4x crosses of citrus and their origin. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 97, 410–414.
- Esen, A. and R.K. Soost. 1973. Precocious development and germination of spontaneous triploid seeds in Citrus. *Journal of Heredity*. 64 (3), Oxford University Press, 147–154.

- Esen, A., R.K. Soost, and G. Geraci. 1979. Genetic evidence for the origin of diploid megagametophytes in Citrus. Oxford University Press, *Journal of Heredity* 70(1): 5–8.
- Geraci, G., A. Strrantino, G. R. Recupero and F. Ruso. 1982. Spontaneous triploidy in progenies of monoembryonic hybrids of Clementine 'Commune x King of Siam'. *Genet. Agri.* 36, 113–118.
- Goetz, M., A. Vivian-Smith, S.D. Johnson, and A.M. Koltunow. 2006. Auxin response factor 8 is a negative regulator of fruit initiation in Arabidopsis. *The Plant Cell*. Am Soc Plant Biol, 18(8): 1873–1886.
- Grosser, J.W. 2004. Applications of somatic hybridization and cybridization in crop improvement, with citrus as a model. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. 40, Society for In Vitro Biology, 17A.
- Grosser, J.W. F.G. Gmitter, Jr., N. Tusa, G.R. Recupero, and P. Cucinotta. 1996. Further evidence of a cybridization requirement for plant regeneration from citrus leaf protoplasts following somatic fusion. *Plant Cell Reports*. 15(9): 672–676.
- Grosser, J.W. J.A. Hym, M. Calovic, H. L. Dong, C. Chen, M. Vasconcellos, F.G. Gmitter. 2010. Production of new allotetraploid and autotetraploid citrus breeding parents: focus on zipperskin mandarins. American Society for Horticultural Science, *HortScience*. 45(8): 1160–1163.
- Grosser, J.W. and F.G. Gmitter. 2011. Protoplast fusion for production of tetraploids and triploids/ : applications for scion and rootstock breeding in citrus. [Online] 343–357. Available from: doi:10.1007/s11240-010-9823-4.
- Gulsen, O.A. Uzun, H. Pala, E. Canihos and G. Kafa. 2007. Development of seedless and Mal Secco tolerant mutant lemons through budwood irradiation. [Online] 112, 184–190. Available from: doi:10.1016/j.scienta.2006.12.040.
- Van Harten, A.M. and C. Broertjes. 1989. Induced mutations in vegetatively propagated crops. *Plant Breeding Reviews*. 6, Wiley Online Library, 55–91.
- Hazra, P., A.K. Dutta, and P. Chatterjee. 2010. Altered gibberellin and auxin levels in the ovaries in the manifestation of genetic parthenocarpy in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Current Science*. JSTOR, 1439–1443.
- Hoshino, Y., T. Miyashita, and T.D. Thomas. 2011. In vitro culture of endosperm and its application in plant breeding: Approaches to polyploidy breeding. *Scientia horticulturae*, Elsevier. 130(1): 1–8.
- Husni, A. 2010. Fusi Protoplas Interspecies Antara Jeruk Siam Simadu (*Citrus nobilis* Lour.) dengan Mandarin Satsuma (*C. unshiu* Marc.). IPB (Bogor Agricultural University).
- Junko, K., K. Tetsuji, K. Yuji, H. Akira, N. Soichi and K. Shozo. 1997. Breeding of Triploid Citrus Cultivars I. Production of Triploids from Satsuma Mandarin. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 66 (1), The Japanese Society for Horticultural Science, 9–14.
- Koltunow, A.M., A. Vivian-Smith and S. R. Sykes. 1998. Evaluation of genes to reduce seed size in Arabidopsis and tobacco and their application to Citrus. 235–251.
- Kosmiatin, M. 2013. Triploid plant formation of tangerine (*Citrus Nobilis* Lour) var simadu through endosperm culture. IPB (Bogor Agricultural University).
- Kosmiatin, M. 2016. Pengembangan jeruk siam medan triolid untuk produksi buaha seedless. Laporan Hasil Penelitian Program KKP3N TA 2016.
- Kosmiatin, M, C Martasari, D sukmadjaja, Y Supriati dan A. Husni. 2017. Aplikasi teknologi kultur in vitro untuk peningkatan kualitas dan perbanyak komoditas penting pertanian. Laporan Hasil Penelitian DIPA BB BIOGEN TA 2017. Bogor.
- Li, D.D., W. Shi, and X.X. Deng. 2003. Factors influencing Agrobacterium-mediated embryogenic callus transformation of Valencia sweet orange (*Citrus sinensis*) containing the pTA29-barnase gene. *Tree physiology*. 23 (17), Heron Publishing, 1209–1215.
- Louzada, E.S., H.S. del Rio, D. Xia, and J. M. Moran-Mirabal. 2002. Preparation and fusion of Citrus sp. microprotoplasts. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 127 (4), American Society for Horticultural Science, 484–488.
- Martasari, C. 2014. Kajian Genetik dan Percepatan Pembungaan Tanaman Hasil Fusi Protoplasma Jeruk Siam Madu (*Citrus nobilis* Lour) dan Mandarin Satsuma (*C. Unshiu* Marc.). Disertasi. Program Doktor Ilmu Pertanian Minat Pemuliaan dan Bioteknologi. Program Pascasarjana Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya. Malang
- Mesejo, C., N. Munoz-Fambuena, C. Reig, A. Martinez-Fuentes, and M. Agusti. 2014. Plant Science Cell division interference in newly fertilized ovules induces stenospermocarpy in cross-pollinated citrus fruit. [Online] 225, 86–94. Available from: doi:10.1016/j.plantsci.2014.05.019.
- Mesejo, C., R. Yuste, A. Martinez-Fuentes, C. Reig, D. J. Iglesias, E. PrimoMillo, and M. Agustý. 2013. Self pollination and parthenocarpic ability in developing ovaries of self incompatible Clementine mandarins (*Citrus clementina*). *Physiologia plantarum*. 148 (1), Wiley Online Library, 87–96.
- Navarro, L., O. Olivares-Fuster, J. Jua rez, P. Aleza, J. A. Pina, J. F. Ballester-Olmos, M. Cervera, C. Fagoaga, N. Duran-Vila, and L. Pena. 2004. Applications of biotechnology to citrus improvement in Spain. *Acta horticulturae*.
- Aleza, P., A Garcia-Lor, J Juarez, L Navarroand & J. Juarez. 2016. Recovery of citrus cybrid plants with diverse mitochondrial and chloroplastic genome combinations by protoplast fusion followed by in vitro shoot , root , or embryo micrografting. [Online] 205–217. Available from: doi:10.1007/s11240-016-0991-8.
- Ohgawara, T. S. Kobayashi, E. Ohgawala, H. Uchimiya and S. Ishii. 1985. Somatic hybrid plants obtained by protoplast fusion between *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. *Theoretical and applied genetics*. 71 (1), Springer, 1–4.
- Ollitrault, P., F. Vanel, Y. Froelicher, D. Dambier. 1998. Creation of triploid Citrus hybrids by electrofusion of haploid and diploid protoplasts. In: *First International Citrus Biotechnology Symposium 535*. pp.191–198.
- Ollitrault, P., D. Dambier, F. Luro, and Y. Froelicher. 2007. Ploidy manipulation for breeding seedless triploid citrus. *Plant Breeding Reviews*. 30, Wiley Online Library, 323–352.
- Recupero, G.R., G. Russo, and S. Recupero. 2005. New Promising Citrus Triploid Hybrids Selected from Crosses between Monoembryonic Diploid Female and Tetraploid Male Parents. 40 (3), 516–520.
- Roose M.L., and T.E. Williams. 2007. 16 Mutation Breeding. *Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology*. CABI, 345.
- Sajid, A., A. S. Khan, S. A. Raza. 2013. *Innovative breeding methods to develop seedless citrus cultivars*. doi: http://dx.doi.org/10.12692/ijb/3.8.191-201.2013
- Sattler, M.C., C.R. Carvalho, and W.R. Clarindo. 2016. The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta*. 243 (2), Springer, 281–296.
- Sigareva, M.A., and E.D. Earle. 1997. Direct transfer of a cold-tolerant Ogura male-sterile cytoplasm into cabbage (*Brassica oleracea* ssp. capitata) via protoplast fusion. *Theoretical and Applied Genetics*. 94 (2), Springer, 213–220.
- Song, J.K. and X.X. Deng. 2006. Induction and genetic identification of embryogenic calli from hybrids of Shatian pummelo. *Agricultural Sciences in China*. Elsevier 5(8): 591–595.
- Soost, R.K. 1985. Melogold, a triploid pummelo-grapefruit hybrid. *HortScience*. 20, 1134–1135.
- Spiegel-Roy, P., and E.E. Goldschmidt. 1996. *The biology of citrus*. Cambridge University Press.

- Spiegel-Roy, P., and Vardi, A. 1992. Shani, Orah'and 'Winola': Three new selections from our breeding program, in: *Proceedings of 7th International Citrus Congress of the International Society, Citriculture, Acireale, Italy*. pp.72-73.
- Usman, M., T. Safed, M. M. Khan and B. Fatima. 2006. Occurrence of spontaneous polyploids in Citrus. *Horticulture Science*. 33(3): 124-129.
- Vardi, A., I. Levin, and N. Carmi. 2008. Induction of Seedlessness in Citrus: From Classical Techniques to Emerging Biotechnological Approaches. 133(1): 117-126.
- Viloria, Z., J. W. Grosser, and B. Bracho. 2005. Immature embryo rescue, culture and seedling development of acid citrus fruit derived from interploid hybridization. [Online] 159-167. Available from: doi:10.1007/s11240-005-0153-x.
- Wakana, A., N. Hanada, S. M. Park, I. Fukudome and K. Kajiwara. 2005. Production of tetraploid forms of acid citrus cultivars by top grafting of shoots with sprouting axially buds treated with colchicine. *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University*. 50(1): 93-102.
- Wu, J.H. and P. Mooney. 2002. Autotetraploid tangor plant regeneration from in vitro Citrus somatic embryogenic callus treated with colchicine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Springer, 70(1): 99-104.
- Wu, J., Ferguson, A.R., and P.A. Mooney. 2005. Allotetraploid hybrids produced by protoplast fusion for seedless triploid Citrus breeding. [Online] 229-235. Available from: doi:10.1007/s10681-005-7009-7.
- Yamamoto, M., R. Matsumoto, N. Okudai, and Y. Yamada. 1997. Aborted anthers of Citrus result from gene-cytoplasmic male sterility. *Scientia Horticulturae*. Elsevier, 70(1): 9-14.
- Yamamoto, M. and S. Kobayashi. 1995. A cybrid plant produced by electrofusion between Citrus unshiu (*Satsuma mandarin*) and *C. sinensis* (sweet orange). *Plant tissue culture letters*. Japanese Society for Plant Cell and Molecular Biology. 12(2): 131-137.
- Yamasaki, A., A. Kitajima, N. Ohara, M. Tanaka, and K. Hasegawa. 2009. Characteristics of arrested seeds in Mukaku Kishu-type seedless citrus. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 78(1): 61-67.
- Yin, Z., R. A. Malinowski, H. Ziolkowska, W. Sommer, Plcader, and S. Malepszy. 2006. The DefH9-iaaM-containing construct efficiently induces parthenocarpy in cucumber. *Cellular & molecular biology letters*. 11(2): 279.
- Zhang, J., M. Zhang, and X. Deng. 2007. Obtaining autotetraploids in vitro at a high frequency in Citrus sinensis. [Online] 211-216. Available from: doi:10.1007/s11240-007-9240-5.