

Kultur *In Vitro* Endosperma, Protokol yang Efisien untuk Mendapatkan Tanaman Triploid secara Langsung

L. Agus Sukamto

Bidang Botani, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Jl. Raya Jakarta-Bogor Km 46, Cibinong 16911
Telp. (021) 87907636, 87907604; Faks. (021) 87907612; E-mail: Lazarus_agus@yahoo.com

Diajukan: 4 Maret 2010; Diterima: 20 Agustus 2010

ABSTRACT

***In Vitro* Culture of Endosperm: An efficient protocol to propagate triploid plants directly. L. Agus Sukamto.**

Triploid plants are very vigorous and beneficial since they generally produce seedless fruits, bigger flowers, and produce more volume of wood than the diploid counterparts. The triploid plants can be produced by crossing diploid and tetraploid plants, but this method is cumbersome and takes a long time. *In vitro* culture of endosperm is an alternative method to produce triploid plants directly. The success of endosperm culture is dependent on many factors, such as maturity of endosperm, presence of the zygotic embryo, culture medium, growth regulators, browning, culture period, an plant species. Generally, a mature endosperm needs an initial association with an embryo to induce cell divisions, while proliferation of an immature endosperms is not dependent on the embryo. Endosperm of most parasitic angiosperms shows direct organogenesis without callus formation. Plants produced from endosperm culture are generally triploid, although some plants possess different ploidy levels.

Keywords: *In vitro* culture, endosperm, propagation of triploid plants, efficient propagation protocol.

ABSTRAK

Kultur *In Vitro* Endosperma, Protokol yang Efisien untuk Mendapatkan Tanaman Triploid secara Langsung. L. Agus Sukamto.

Tanaman triploid adalah sangat vigor dan berharga karena menghasilkan buah tanpa biji, bunga yang lebih besar, dan volume kayu yang lebih besar dibandingkan dengan tanaman normal diploid. Tanaman triploid dapat diperoleh dari persilangan tanaman diploid dengan tetraploid, tetapi cara ini tidak praktis dan memerlukan waktu yang lama. Kultur endosperma secara *in vitro* adalah cara alternatif untuk memperoleh tanaman triploid secara langsung. Keberhasilan kultur endosperma tergantung pada banyak faktor, yaitu umur endosperma, adanya embrio zigot, media kultur, zat pengatur tumbuh, pencoklatan, dan lama dikultur, serta jenis tanamannya. Umumnya, inisiasi endosperma yang tua memerlukan penyertaan embrio untuk menginduksi pembelahan sel, tetapi endosperma yang muda tidak memerlukan embrio untuk inisiasi pembelahan selnya. Kebanyakan endosperma tanaman parasit membentuk suatu organ secara langsung tanpa melalui pembentukan kalus.

Tanaman hasil kultur endosperma kebanyakan adalah triploid, walaupun ada beberapa tanaman yang memiliki tingkat ploidi yang lain.

Kata kunci: Kultur endosperma, *in vitro*, tanaman triploid, protokol yang efisien.

PENDAHULUAN

Endosperma adalah jaringan triploid yang terdapat pada biji, hasil dari penyatuan dua inti polar gamet betina dengan satu inti gamet jantan, yang berbeda dengan embrio dalam jumlah kromosomnya. Endosperma merupakan massa sel parenchym yang relatif homogen, tanpa adanya elemen jaringan pembuluh, sel-selnya bervariasi dalam ukuran, pembelahan, pemisahan kromosom, dan poliploidinya. Endosperma terdapat pada individu yang mencakup lebih dari 81% pada tumbuhan berbunga (Johri dan Bhojwani, 1977; Johri *et al.*, 1980; Thomas dan Chaturvedi, 2008).

Fungsi endosperma adalah memelihara embrio selama pertumbuhan pada fase heterofit dan memberikan sumber energi selama perkecambahan dan pertumbuhan embrio (Johri dan Bhojwani, 1977). Jaringan endosperma ada yang habis dikonsumsi seluruhnya oleh embrio ketika biji menjadi tua, biji tumbuhan tersebut disebut non endosperma, tetapi bila endospermanya tetap ada ketika biji menjadi tua sebagai makanan cadangan dalam bentuk tepung, lemak atau protein, disebut biji yang endosperma (Johri dan Bhojwani, 1977; Johri *et al.*, 1980). Kultur endosperma secara *in vitro* akan mendapatkan tanaman triploid karena endosperma adalah jaringan triploid. Pada tumbuhan yang bijinya non endosperma, pengambilan eksplan endospermanya ketika biji belum tua.

Tanaman triploid ($2n = 3x$) adalah tanaman yang jumlah kromosomnya kelipatan tiga dari kromosom dasarnya ($3n$), buahnya kebanyakan tidak berbiji atau berbiji tapi steril. Tanaman triploid tidak diinginkan bila bertujuan untuk menghasilkan benih yang komersial, tetapi sangat berharga karena memberikan nilai tambah ekonomi yang tinggi dalam memperbaiki kualitas dan kuantitas buah, yaitu buahnya tidak berbiji, lebih besar dan hasilnya lebih produktif, seperti

pada buah pisang, apel, jeruk, anggur, pepaya (Sanford, 1983; Thomas dan Chaturvedi, 2008). Tanaman triploid memberikan keuntungan lain, yaitu pertumbuhan tanamannya lebih cepat dan bunganya lebih besar, seperti pada *Petunia axillaris* (Gupta, 1982), atau dapat dipanen lebih awal dan mendapatkan biomasa kayu yang lebih besar, seperti pada *Populus tremuloides* untuk bahan baku kertas (Johri *et al.*, 1980; Thomas dan Chaturvedi, 2008). Di Indonesia, petai cina (*Leucaena glauca*) triploid menghasilkan biomasa daun yang lebih besar untuk pakan ternak (Komunikasi pribadi dengan Dr. Brewbaker, Profesor Pemulia Tanaman *University of Hawaii*), bawang merah triploid untuk mendapatkan umbi yang lebih besar (Sulistyaningsih, 1999), sedang diteliti semangka triploid (Ir. Sunyoto, Litbang Pertanian), mangga Arumanis dan Gedong Gincu triploid (Dr. Wiendi, IPB), cendana triploid (Dr. Sukamto, Puslit Biologi-LIPI).

MENDAPATKAN TANAMAN TRIPLOID

Tanaman triploid dapat dihasilkan dari persilangan antara tanaman normal diploid ($2n = 2x$) dengan tanaman tetraploid ($2n = 4x$), seperti pada tanaman jeruk (Soost dan Cameron, 1980; Oiyama dan Kobayashi, 1990), dan pepaya (De Zerpa, 1957). Protokol untuk mendapatkan tanaman triploid melalui persilangan, menghadapi banyak kendala, yaitu memerlukan pentahapan/waktu yang panjang untuk mendapatkan tanaman tetraploid, dengan menggandakan jumlah kromosom dan menunggu tanaman tetraploid berbunga, untuk dapat disilangkan dengan tanaman diploid, tanaman tetraploid tingkat sterilitasnya tinggi (Gupta, 1982), daya kecambah biji hasil persilangan sangat rendah karena kegagalan perkembangan endosperma, diikuti dengan keguguran embrio yang berkorelasi dengan perbandingan jumlah kromosom endosperma dengan embrio yang tidak tepat 3 : 2 seperti pada biji yang normal (Lakshmi, 1987; Soost, 1987).

Kultur endosperma merupakan suatu teknik alternatif untuk menghasilkan tanaman triploid secara langsung, hanya melalui satu pentahapan (Lakshmi, 1987). Tanaman triploid hasil kultur endosperma kemungkinan lebih unggul dibandingkan dengan hasil persilangan, disebabkan tidak tereduksinya inti polar ($2n$) waktu fusi pada pusat sel megagametofit (Knight dan Alston, 1969).

FAKTOR KEBERHASILAN KULTUR ENDOSPERMA

Kebhasilan kultur endosperma secara *in vitro* dipengaruhi oleh banyak faktor, di antaranya umur

endosperma penyertaan zigot embrio, pencoklatan (*browning*), dan umur kultur.

Umur Endosperma

Umur endosperma saat dikultur umumnya merupakan fase kritis terhadap respon pertumbuhannya secara *in vitro* (Nag dan Johri, 1971; Tao *et al.*, 2009). Eksplan endosperma yang umurnya terlalu muda atau telah melewati kisaran fase meristematisnya, umumnya tidak respon bila dikultur. Endosperma muda pada fase sel-selnya masih meristematis, umumnya akan respon positif bila dikultur, seperti pada kelapa (Kumar *et al.*, 1985; Ceniza *et al.*, 1992; Sukamto, 1996), jeruk besar dan apel (Wang dan Chang, 1978; Mu dan Liu, 1978), *Morus alba* (Thomas *et al.*, 2000), *Azadirachta indica* (Chaturvedi *et al.*, 2003), endosperma jagung respon pada umur 8-12 hari setelah penyerbukan (HSP) (Sternheimer 1954; Straus dan LaRue, 1954; Tamaski dan Ullstrup, 1958). Endosperma blackberry 28 HSP (Cantoni *et al.*, 2009), endosperma *Citrus grandis* cv White Siamese 84-98 HSP (Gmitter *et al.*, 1990), cv Tosa-Buntan 85-95 HSP (Yang *et al.*, 2000), endosperma *Citrus sinensis* cv Hongjiang respon pada 98-119 HSP (Chen *et al.*, 1990), cv Ridge Pineapple 84-98 HSP (Gmitter *et al.*, 1990), endosperma rye grass 9-10 HSP (Norstog, 1956), padi 4-7 HSP (Nakano *et al.*, 1975), tetapi endosperma padi yang tua juga respon (Bajaj *et al.*, 1980). Endosperma ketimun 7-10 HSP (Nakajima, 1962), endosperma tomat 21 HSP (Kagan-Zur *et al.*, 1990), endosperma walnut respon pada 56 HSP (Tulecke *et al.*, 1988).

Kultur endosperma tua dapat juga respon positif bila dikultur pada tumbuhan *Exocarpus cupressiformis*, *Leptomeria acida*, *Nigella damascena*, *Nuytsia floribunda*, *Osyris wightiana*, *Scurrula pulverulenta*, *Phoradendron tomentosum*, *Dendrophloe falcata*, *Taxillus cunefatus*, *T. Vestitus*, *Leptomeria acida*, *Croton bonplandianum*, *Santalum album*, *Ricinus communis*, *Jatropha panduraefolia*, *Putranjiva roxburghii*, *Sapium sebiferum*, *Coffea arabica*, *Annona squamosa*, *Achras, apel, parsley*, dan *pecan* (Johri dan Bhojwani, 1965; Bhojwani dan Johri, 1970, 1971; Nag dan Johri, 1971; Johri dan Srivastava, 1972; Srivastava, 1973, 1982; Sethi dan Rangaswamy, 1976; Bajaj *et al.*, 1980; Cheema dan Mehra, 1982; Nair *et al.*, 1986; Lakshmi, 1987).

Penyertaan Zigot Embrio

Kultur endosperma tua *Croton*, *Ricinus*, dan *Putranjiva* gagal tumbuh tanpa penyertaan embrio (Srivastava, 1982). Endosperma tua *A. squamosa* hanya membentuk kalus bila dikultur setelah pembentukan akar 2-4 hari (Nair *et al.*, 1986). Respon terbaik terjadi pada kultur endosperma *C. sinensis* dengan

penyertaan embrio setelah 2 hari, tetapi responnya negatif setelah 8 hari ditanam (Chen *et al.*, 1990).

Penyertaan zigot embrio tidak diperlukan untuk inisiasi pembentukan kalus pada endosperma tumbuhan parasitis, seperti pada *D. falcata*, *N. floribunda*, *T. cunefatus*, *T. Vestitus*, dan *L. acida* (Nag dan Johri, 1971). Lakshmi (1987) berhasil mendapatkan tanaman cendana dari kultur endosperma yang berasal dari buah yang hijau dengan atau tanpa penyertaan endosperma. Kultur endosperma juga berhasil tumbuh tanpa penyertaan embrio pada *Actinidia* (Mu *et al.*, 1990), *C. grandis* dan *C. sinensis* (Wang dan Chang, 1978), pir (Zhao, 1988), pecan, dan walnut (Cheema dan Mehra, 1982). Penyertaan embrio dapat digantikan dengan pencelupan eksplan endosperma dalam larutan asam giberelin (GA) 1-2 mg/l (Johri dan Bhojwani, 1977; Srivastava, 1982; Nair *et al.*, 1986) atau zeatin 1 mg/l (Lakshmi, 1987). Kumar *et al.* (1985) berhasil mengkulturkan endosperma dengan penyertaan embrio yang membentuk kalus pada kelapa cv West Coast Tall, tetapi Fisher dan Tsai (1978) berhasil mengkulturkan endosperma tanpa penyertaan embrio yang membentuk kalus pada kelapa cv Golden Malayan Dwarf, Sukamto (1996) berhasil mengkulturkan endosperma kelapa tanpa penyertaan embrio yang membentuk kalus lebih dari 97% dan dapat membentuk primordia tunas pada kelapa cv Samoan Dwarf. Kultur endosperma muda, juga ada yang memerlukan penyertaan embrio seperti pada tanaman *Azadirachta indica* (Chaturvedi *et al.*, 2003) dan *M. alba* (Thomas *et al.*, 2000).

Formulasi Media

Media kultur yang umum digunakan adalah formulasi White (W) atau Murashige dan Skoog (MS). Media MS lebih sering digunakan karena kandungan garam anorganik dan nitrogen yang lebih besar (Chen *et al.*, 1988). Pertumbuhan jaringan lebih baik dengan menggunakan zat pematat phytigel dibandingkan dengan agar, karena kemurnian dan kandungan substansi perangsang pada phytigel (Ladyman dan Girard, 1991). Kultur endosperma *A. indica* tidak mengalami callogenesis tanpa penambahan zat pengatur tumbuh auksin, seperti 2,4-dichlorophe-noxyacetic acid (2,4-D), α -naphthalene acetic acid (NAA), indole-3-acetic acid (IAA), atau kombinasi dengan sitokinin, seperti 6-benzylamino purine (BA) (Chaturvedi *et al.*, 2003). Kultur endosperma tua *Actinidia deliciosa* cv Hayward memproduksi kalus terbanyak pada media MS dengan penambahan 2 mg/l 2,4-D dan 5 mg/l kinetin (Kn) (Goralski *et al.*, 2005). Tetapi kultur endosperma kelapa tidak memerlukan auksin untuk callogenesis (Sukamto, 1996).

Auksin 2,4-D berkonsentrasi tinggi diperlukan terutama bila penyertaan arang aktif untuk inisiasi kalus dari endosperma kelapa (Kumar *et al.*, 1985; Ceniza *et al.*, 1992; Sukamto, 1996). 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid (picloram), merangsang organogenesis lebih baik dibandingkan dengan 2,4-D pada kalus endosperma kelapa (Sukamto, 1996).

Peranan sitokinin penting dalam media kultur endosperma, yaitu untuk memproduksi tunas pada endosperma *Taxillus vestitus* dengan Kn 2×10^{-5} M (Johri dan Nag, 1970), endosperma cendana dengan Kn dan BA (Lakshmi *et al.*, 1980), endosperma srikaya (Nair *et al.*, 1986), endosperma *Actinidia deliciosa* cv Hayward dengan thidiazuron (TDZ) konsentrasi 0,5 mg/l (Goralski *et al.*, 2005), dan endosperma kelapa dengan BA konsentrasi 10^{-5} M (Sukamto, 1996). Regenerasi tunas *A. deliciosa* cv Hayward hanya terjadi dengan tambahan TDZ (Goralski *et al.*, 2005), tunas *A. indica* dengan penambahan BA, Kn, TDZ, atau BA + IAA (Chaturvedi *et al.*, 2003).

Pencoklatan

Pencoklatan (*browning*) yang terjadi dan apabila parah menjadi hitam pada eksplan sering dihubungkan dengan kegagalan eksplan untuk hidup. Komponen fenolik yang teroksidasi sering keluar dan masuk dalam media dengan terlukanya jaringan yang menyebabkan pencoklatan atau penghitaman eksplan (Anderson, 1987). Endosperma yang muda lebih respon bila dikultur dibandingkan dengan yang telah dewasa (Cheema dan Mehra, 1982; Sukamto, 1996) disebabkan karena eksplan yang telah tua mengeluarkan hasil oksidasi yang lebih banyak (Preece dan Compton, 1991). Tetapi pencoklatan tidak selalu berakibat kegagalan, karena ada kultur yang berhasil walaupun eksplan mengalami pencoklatan berat menjadi hitam pada kultur endosperma kelapa cv Samoan Dwarf (Sukamto, 1996).

Umur Kultur

Selaras dengan umur kultur yang makin tua, sel-sel dalam kalus meningkat ploidinya dan kehilangan potensi regenerasinya (Reinert dan Backs, 1968; Johri dan Srivastava, 1973). Umur kalus *C. sinensis* 6 minggu dan 14 minggu sebelum disubkultur menghasilkan 10 lipatan dan 100 lipatan jumlah embrioidnya dibandingkan dengan kalus umur 3 minggu, tetapi kalus umur 20 minggu kehilangan totipotensinya (Kochba dan Button, 1974). Sel-sel diploid menurun dari 100% menjadi 71% dalam waktu 1 bulan dan menjadi 33% dalam waktu 3 bulan pada kultur *C. limon* (Murashige *et al.*, 1967). Kapasitas regenerasi masih bertahan selama setengah tahun pada kultur endosperma

parsley (Masuda *et al.*, 1977), 1 tahun pada kultur endosperma cendana (Lakshmi *et al.*, 1980), 2 tahun pada kultur endosperma *Putranjiwa*, dan 30 bulan pada kultur endosperma *Dendrophthoe* dan *Taxillus* (Johri dan Srivastava, 1973; Johri dan Nag, 1974).

Kehilangan totipotensi berhubungan dengan terjadinya pembelahan nukleus abnormal, seperti pada kultur endosperma ketimun (Nakajima, 1962), penggantian kromosom dan berbagai jenis mitosis yang tidak beraturan, seperti *chromosom bridges* dan *lagging chromosomes* pada kultur jagung, *Croton*, *Jatropha*, dan *Lolium* (Johri dan Bhojwani, 1977). Tetapi kalus endosperma kelapa masih belum kehilangan totipotensinya setelah 17 bulan kultur (Sukamto, 1996), kultur endosperma *rye grass* masih tetap triploid walaupun telah berumur 10 tahun (Norstog *et al.*, 1969).

TANAMAN HASIL KULTUR ENDOSPERMA SECARA *IN VITRO*

Kultur endosperma telah berhasil tumbuh dan berdiferensiasi menjadi tunas atau tanaman muda seperti pada parsley (Masuda *et al.*, 1977), jagung, *R. communis*, *E. cupressiformis*, *Actinidia chinensis*, *Codiaeum variegatum*, *S. pulverulenta*, *P. roxburghii*, *D. falcata*, *T. cuneatus*, *T. vestitus*, *J. panduraefolia*, *Prunus persica*, *Pyrus malus*, *Juglans regia*, *C. grandis*, *C. sinensis*, *S. album* (Rangaswamy dan Rao, 1963; Satsangi dan Ram, 1965; Srivastava, 1971; Johri dan Bhojwani, 1977; Lakshmi *et al.*, 1980; Tulecke *et al.*, 1988; Chen *et al.*, 1990) *A. squamosa* (Nair *et al.*, 1986), pir (Zhao, 1988), loquat (Chen *et al.*, 1988), *A. chinensis* (Gui *et al.*, 1988),

Umumnya tanaman hasil kultur endosperma secara *in vitro* adalah triploid, seperti pada *M. alba* (Thomas *et al.*, 2000), *C. grandis* "Tosa-Buntan", dan *A. deliciosa* cv Hayward (Goralski *et al.*, 2005). Tetapi tidak semua tanaman yang dihasilkan adalah triploid, yaitu 66% lebih triploid seperti pada *A. indica* (Chaturvedi *et al.*, 2003), sebagian besar adalah diploid pada parsley (Masuda *et al.*, 1977), 60% dodecaploid ($2n = 12x$) dan 40% hexaploid ($2n = 6x$) pada tanaman *Diospyros kaki* (Tao *et al.*, 2009).

PENUTUP

Keberhasilan penelitian kultur jaringan endosperma perlu memperhatikan kelima faktor tersebut di atas. Secara umum eksplan endosperma dari buah yang muda lebih respon dikultur secara *in vitro* dibandingkan dengan endosperma dari buah yang lebih tua. Kultur endosperma tua umumnya memerlukan penyertaan zigot embrio, sedangkan kultur endosperma

muda tidak memerlukan penyertaan embrio untuk callogenesis. Respon kultur endosperma juga tergantung pada jenis tanamannya. Kultur endosperma umumnya akan menghasilkan tanaman triploid, walaupun ada tanaman yang tingkat ploidinya lain. Tanaman triploid memberikan nilai tambah secara ekonomi untuk tujuan menghasilkan buah tanpa biji (*seedless*), bunga yang besar, dan biomasa daun/kayu yang besar.

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, P.G. 1987. Micropropagation of woody plants. p. 37-52. In P.G. Alderson and W.M. Dullforce (eds.) Micropropagation in Horticulture, Practice and Commercial Problems. The Univ. Nottingham Trent Print Unit.
- Bajaj, Y.P.S., S.S. Saini, and M. Bidani. 1980. Production of triploid plants from the immature and mature endosperm cultures of rice. Theor. Appl. Genet. 80:785-790.
- Bhojwani, S.S. and B.M. Johri. 1970. Cytokinin-induced shoot bud differentiation in mature endosperm of *Scurrula pulverulenta*. Z. Pflanzenphysiol. 63:269-275.
- Bhojwani, S.S. and B.M. Johri. 1971. Morphogenetic studies on cultured mature endosperm of *Croton bonplandianum*. New. Phytol. 70:761-766.
- Cantoni, L., G. Berardi, and P. Rosati. 2009. Callus induction from endosperm culture of blackberry. http://www.actahort.org/members/showpdt?booknrnr=352_20=abstract. [18 Februari 2009].
- Ceniza M.S., S. Ueda, and Y. Sugimura. 1992. *In vitro* culture of coconut endosperm: Callus induction and its fatty acids. Plant Cell Rep. 11:546-549.
- Chaturvedi, R., M.K. Razdan, and S.S. Bhojwani. 2003. An efficient protocol for the production of triploid plants from endosperm callus of neem, *Azadirachta indica* A. Juss. J. Plant. Physiol. 160(5):557.
- Cheema, G.S. and P.N. Mehra. 1982. Morphogenesis in endosperm cultures. p. 111-112. In A. Fujiwara (ed.) Proc. 5th Int. Cong. on Plant Tissue Culture. The Japanese Association of Plant Tissue Culture. Tokyo.
- Chen, Z.G., S.Q. Lin, and Q.L. Lin. 1988. The development of plantlets from the endosperm of loquat. p. 363-364. In Genetic Manipulation in Crops. Proc. Int. Symp. Genetic Manipulation in Crops, Beijing.
- Chen, R.Z., G.G. Li, L.Y. Zhang, and C.Y. Kuo. 1990. Somatic embryogenesis of endosperm of sweet orange (*Citrus sinensis* cv Hongjiang) *in vitro* culture. p. 182-187. In Proc. Int. Citrus Symp. Guangzhou, China.
- De Zarpa, D.M. 1957. Triploides de *Carica papaya* (Triploids of *Carica papaya*). Agronomia Tropical VII(2):83-86.
- Fisher, J.B. and J.H. Tsai. 1978. *In vitro* growth of embryos and callus of coconut palm. In Vitro 14(3):307-311.

- Gmitter, F.G.Jr., X.B. Ling, and X.X. Deng. 1990. Induction of triploid *Citrus* plants from endosperm calli *in vitro*. *Theor. Appl. Gen.* 80:785-790.
- Goralski, G., M. Popielarska, H. Slesak, D. Siwinska, and M. Batycka. 2005. Organogenesis in endosperm of *Actinidia deliciosa* cv Hayward cultured *in vitro*. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 47(2):121-128.
- Gui, Y.L., S.R. Gu, and T.Y. Xu. 1988. Differentiation of organs in endosperm culture of Chinese gooseberry. p. 364-366. *In Genetic Manipulation in Crops. Proc. Int. Symp. Genetic Manipulation in Crops, Beijing.*
- Gupta, P.P. 1982. Genesis of microspore-derived triploid petunias. *Theor. Appl. Genet.* 61:327-331.
- Johri, B.M. and S.S. Bhojwani. 1965. Growth response of mature endosperm in cultures. *Nature* 298:1345-1347.
- Johri, B.M. and P.S. Srivastava. 1972. *In vitro* growth response of mature endosperm of *Ricinus communis* L. p. 339-358. *In Y.S. Murty, B.M. Johri, H.Y. Mohan Ram, and T.M. Varghese (eds.) Advances in Plant Morphology. Sarita Prakashan, Meerut, India.*
- Johri, B.M. and P.S. Srivastava. 1973. Morphogenesis in endosperm cultures. *Z. Pflanzenphysiol.* 70:285-304.
- Johri, B.M. and K.K. Nag. 1974. Cytology and morphogenesis of embryo and endosperm tissues in *Dendrophthoe* and *Taxillus*. *Cytologia* 39:801-813.
- Johri, B.M. and S.S. Bhojwani. 1977. Triploid plants through endosperm culture. p. 398-411. *In J. Reinert and Y.P.S. Bajaj (eds.) Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue, and Organ Culture. Springer-Verlag, Berlin.*
- Johri, B.M., P.S. Srivastava, and A.P. Raste. 1980. Endosperm culture. p. 157-182. *In I.K. Vasil (ed.) Int. Rev. Cytology, Suppl. 11B, Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture.*
- Kagan-Zur, V., D. Mills, and Y. Mizrahi. 1990. Callus formation from tomato endosperm. *Acta Hort.* 280:139-142.
- Knight, R.L. and F.H. Alston. 1969. Developments in apple breeding. *Rep. East Malling Res. Stat.* 1968:125-132.
- Kochba, J. and J. Button. 1974. The stimulation of embryogenesis and embryoid development in habituated ovular callus from the "Shamouti" orange (*Citrus sinensis*) as affected by tissue age and sucrose. *Z. Pflanzenphysiol.* 73:415-421.
- Kumar, P.P., C.R. Raju, M.C. Mohan, and R.D. Iyer. 1985. Induction and maintenance of friable callus from cellular endosperm of *Cocos nucifera* L. *Plant Sci.* 40:203-207.
- Ladyman, J.A.R. and B. Girard. 1991. Non-hormonal factors that improve the multiplication and development of somatic embryos of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Acta Horticulturæ* 300:233-236.
- Lakshmi S.G. 1987. Triploids. p. 269-284. *In J.M. Bonga and D.J. Durzan (eds.) Cell and Tissue Culture in Forestry. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands.*
- Lakshmi S.G., N.V. Raghva Ram, and C.S. Vaidyanathan. 1980. Triploid plants from endosperm culture of sandalwood by experimental embryogenesis. *Plant Sci. Lett.* 20:63-69.
- Masuda, K., Y. Koda, and Y. Okazawa. 1977. Callus formation and embryogenesis of endosperm tissues of parsley seed cultured on hormone free medium. *Physiol. Plant* 41:135-138.
- Mu, S.K. and S.C. Liu. 1978. Cytological observations on callus derived from apple endosperm cultured *in vitro*. p. 507-510. *In Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture. Science Press, Peking.*
- Mu, S.K., L.G. Fraser, and C.F. Harvey. 1990. Initiation of callus and regeneration of plantlets from endosperm of *Actinidia* interspecific hybrids. *Scientia Horticulturæ* 44:107-117.
- Murashige, T., R. Nakano, and D.P.H. Tucker. 1967. Histogenesis and rate of nuclear change in *Citrus limon* tissue *in vitro*. *Phytomorphology* 17:469-476.
- Nag, K.K. and B.M. Johri. 1971. Morphogenic studies on endosperm of some parasitic angiosperm. *Phytomorphology* 21:202-218.
- Nair, S., M.V. Shirgurker, and A.F. Mascarenhas. 1986. Studies on endosperm culture of *Annona squamosa* Linn. *Plant Cell Rep.* 5:132-135.
- Nakajima, T. 1962. Physiological studies of seed development, especially embryonic growth and endosperm development. *Bull. Univ. Osaka Pref. Ser. B.* 13:13-48.
- Nakano, H., T. Tashiro, and E. Maeda. 1975. Plant differentiation in callus tissue induced from immature endosperm of *Oryza sativa* L. *Z. Pflanzenphysiol.* 76:444-449.
- Norstog, K. 1956. Growth of rye grass endosperm *in vitro*. *Bot. Gaz.* 117:253-259.
- Norstog, K., W.E. Wall, and G.P. Howland. 1969. Cytological characteristics of ten-year-old rye grass endosperm tissue cultures. *Bot. Gaz.* 130:83-86.
- Oiyama, I. and S. Kobayashi. 1990. Polyembryony in underdeveloped monoembryonic diploid seeds crossed with a *Citrus* tetraploid. *HortScience* 25(10):1276-1277.
- Preece, J.E. and M.E. Compton. 1991. Problems with explant exudation in micropropagation. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 17:168-189.
- Rangaswamy, N.S. and P.S. Rao. 1963. Experimental studies on *Santalum album* L.-establishment of tissue culture of endosperm. *Phytomorphology* 13(4):450-454.
- Reinert, J. and D. Backs. 1968. Control of totipotency in plant cells growing *in vitro*. *Nature* 220:1340-1341.
- Sanford, J.C. 1983. Ploidy manipulations. p. 100-123. *In J.N. Moore and J. Janick (eds.) Methods in Fruit Breeding. Purdue Univ. Press. Indiana.*
- Satsangi, A. and H.Y.M. Ram. 1965. A continuously growing tissue culture from the mature of *Ricinus communis* L. *Phytomorphology* 15(1):26-30.

- Sethi, M. and N.S. Rangaswamy. 1976. Endosperm embryoids in cultures of *Nigella damascena*. *Curr. Sci.* 45(3):109-111.
- Soost, R.K. 1987. Breeding citrus-genetics and nucellar embryony. p. 83-110. *In* A.J. Abbott and R.K. Atkin (eds.) *Improving Vegetatively Propagated Crops*. Academic Press, London.
- Soost, R.K. and J.W. Cameron. 1980. "Oroblanco", a triploid pummelo-grapefruit hybrid. *HortScience* 15(5):667-669.
- Srivastava, P.S. 1971. *In vitro* induction of triploid roots and shoots from mature endosperm of *Jatropha panduraefolia*. *Z. Pflanzenphysiol.* 66:93-96.
- Srivastava, P.S. 1973. Formation of triploid plantlets in endosperm cultures of *Putranjiva roxburghii*. *Z. Pflanzenphysiol.* 69:270-273.
- Srivastava, P.S. 1982. Endosperm culture. p. 175-193. *In* B.M. Johri (ed.) *Experimental Embryology of Vascular Plants*. Springer-Verlag, Berlin.
- Sternheimer, E.P. 1954. Method of culture and growth of maize endosperm *in vitro*. *Bull. Torrey Bot. Club* 81:111-113.
- Straus, J. and C.D. LaRue. 1954. Maize endosperm tissue grown *in vitro* 1. Culture requirements. *Am. J. Bot.* 41:687-694.
- Sukanto, L.A. 1996. Endosperm culture of coconut. Disertasi S3. University of Hawaii, USA. 161 p.
- Sulistyaningsih, E. 1999. Morphological and cytological characters of triploid shallot (*Allium cepa* L. Aggregatum group). *J. Penelitian Pertanian Tanaman Pangan* 18:85-88.
- Tao, R., K. Ozawa, M. Tamura, and A. Sugiura. 2009. Dodecaploid plant regeneration from endosperm culture of persimmon (*Diospyros kaki* L.). http://www.pubhort.org/members/showdocument?booknrnrnr=436_12=abstract. [18 Februari 2009].
- Tamaski, T. and A.J. Ullstrup. 1958. Cultivation *in vitro* of excised endosperm and meristem tissues of corn. *Bull. Torrey Bot. Club.* 85(4):260-272.
- Thomas T.D., A.K. Bhatnagar, and S.S. Bhojwani. 2000. Production of triploid plants of mulberry (*Morus alba* L.) by endosperm culture. *Plant Cell Rep.* 19(4):395-399.
- Thomas, T.D. and R. Chaturvedi. 2008. Endosperm culture: A novel method for triploid plant. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 93(1):1-14.
- Tulecke, W., G. Mc Granaham, and H. Ahmadi. 1988. Regeneration by somatic embryogenesis of triploid plants from endosperm of walnut, *Juglans regia* L. cv Manregian. *Plant Cell Rep.* 7:301-304.
- Wang, T.Y. and C.J. Chang. 1978. Triploid *Citrus* plantlet from endosperm culture. p. 463-467. *In* Proc. Symp. Plant Tissue Culture. Science Press, Peking, China.
- Yang, X., A. Kitajima, and K. Hasegawa. 2000. Callus induction and embryoid regeneration from the endosperm culture of "Tosa-Buntan" pummelo (*Citrus grandis* [L.]). *Environment Control Biol.* 38(4):241-246.
- Zhao, H.X. 1988. Induction of endosperm plantlets of "Jinfeng" pear *in vitro* and their ploidy. p. 123-124. *In* Genetic Manipulation in Crops. Proc. Int. Symp. Genetic Manipulation in Crops. Beijing.
-