

5
PROSIDING

SEMINAR NASIONAL BIOLOGI KE-XIX

MAKASSAR, 9 - 10 JULI 2008

**TANTANGAN BIOLOGI DALAM MENGHADAPI
"GLOBAL WARMING"**

PENYUNTING

**Magdalena Litaay
Fachruddin
Eddy Soekendarsi
A. Zulkifli AS**

PERHIMPUNAN BIOLOGI INDONESIA CABANG SULSEL

DAN

UNIVERSITAS HASANUDDIN



PERLAKUAN ANTIBIOTIK UNTUK IMPLEMENTASI KULTUR SEBAR-MIKROSPORA ANTERA CABAI PADA MEDIA DUA-LAPIS

ENCE DARMO JAYA SUPENA

Departemen Biologi, FMIPA-IPB dan

Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi IPB

Jl. Kamper, Kampus IPB Darmaga, Darmaga, Bogor 16680

Telepon: 0251-621257; Faksimile: 0251-621724; E-mail: e-darmo@indo.net.id

ABSTRAK

Prosedur yang efisien untuk memproduksi tanaman haploid ganda (HG) beberapa genotipe cabai Indonesia melalui kultur antera dalam sistem media dua-lapis telah berhasil dilakukan di Belanda melalui proyek kerjasama Indonesia-Belanda (BIORIN). Implementasi prosedur ini pada kondisi lokal di Bogor mendapat hambatan, terutama masalah kontaminasi pada kultur dan kondisi lingkungan pertumbuhan tanaman sumber eksplan yang berbeda. Kriteria kuncup bunga sumber eksplan pada HG Galaxy untuk fase perkembangan mikrospora lebih dari 50% pada fase akhir berinti tunggal adalah ketika petal sama tinggi sampai sedikit lebih dari sepal, dan dicirikan dari munculnya warna ungu pada ujung antera sampai setengah dari panjang antera. Penanganan masalah kontaminasi kultur *in vitro* berhasil dilakukan dengan menambahkan kombinasi antibiotik Rifampisin 10 mg/l dan Timentin 400 g/l dalam medium cair. Prosedur hasil adaptasi ini telah berhasil dicobakan untuk beberapa kultivar cabai lokal, misalnya Tanjung. Pengecambahan dan aklimatisasi berhasil dilakukan dengan tahapan mengecambahkan embrio lengkap pada media-agar ½ MS dalam botol kultur, aklimatisasi dilakukan pada campuran media tanah:kasting:arang sekam (1:1:1) dengan pengaturan kelembaban. Prosedur yang telah diadaptasi pada kondisi lokal ini akan menjadi dasar untuk memproduksi secara cepat tanaman HG cabai kultivar lokal, untuk selanjutnya dilakukan persilangan dialel sebagai upaya untuk memperoleh beberapa kandidat varietas hibrida cabai unggul berbasis kultivar lokal.

Keywords: cabai, antera, haploid ganda, antibiotik

PENDAHULUAN

Cabai (*Capsicum annum* L.) meskipun merupakan komoditas sayuran terpenting di Indonesia, namun produktivitasnya masih rendah (rata-rata 5.6 ton/ha) dengan kisaran produktivitas antar daerah yang sangat lebar mulai dari 1.74 ton/ha di Sulawesi Tenggara sampai 12.45 ton/ha di Jawa Barat (Deptan, 2007). Faktor penyebab rendahnya produktivitas cabai ini, diantaranya karena kualitas benih yang digunakan masih rendah. Benih yang digunakan oleh sebagian besar petani masih diproduksi sendiri yaitu hasil perbanyakan dengan cara membiarkan terjadi penyerbukan terbuka secara alami. Oleh karenanya, upaya untuk menyediakan benih-benih berkualitas dan berdaya hasil tinggi merupakan langkah yang sangat strategis dalam upaya meningkatkan produktivitas cabai di Indonesia.

Benih cabai berkualitas yang sudah mulai dikenal oleh petani diantaranya adalah dalam bentuk benih hibrida. Untuk mengembangkan benih hibrida dibutuhkan galur-galur murni cabai sebagai calon tetua. Pembentukan galur murni dapat dilakukan secara konvensional melalui penyerbukan sendiri terkendali, namun membutuhkan waktu yang lama sampai tujuh generasi. Oleh karenanya dibutuhkan introduksi teknik untuk meningkatkan efektivitas dan efisiensi pembentukan galur murni ini. Salah satu teknologi yang potensial untuk tujuan ini adalah teknologi haploid.

Dengan teknologi haploid, embrio dapat diregenerasikan secara *in vitro* dari sel gamet dan selanjutnya tanaman haploid dapat dibentuk dari embrio tersebut. Tanaman haploid ganda (HG) yang berarti homosigot untuk seluruh lokusnya atau dapat dipastikan galur murni dapat diperoleh

melalui penggandaan kromosom secara spontan, ataupun melalui induksi penggandaan kromosom dengan senyawa kimia kolkisin pada berbagai fase haploid (Jansen, 1974). Teknologi haploid ini merupakan metode yang paling efisien untuk menghasilkan tanaman HG karena hanya membutuhkan 1-2 generasi saja (Ferrie *et al.* 1994). Introduksi dan pengembangan teknologi haploid ini akan mempercepat program penelitian genetika dan pemuliaan cabai di Indonesia yang pada umumnya masih menggunakan metode konvensional.

Teknologi haploid pada cabai yang pertama kali dinilai berhasil adalah sistem kultur antera pada media padat yang dikembangkan oleh Sibi *et al.* (1979) dan selanjutnya diperbaiki oleh Dumas de Vaulx *et al.* (1981). Prosedur ini telah dimanfaatkan untuk memproduksi tanaman HG untuk program pemuliaan tanaman cabai paprika (Dumas de Vaulx dan Pochard 1986; Daubèze *et al.*, 1990; Caranta *et al.*, 1996). Namun metode yang dikembangkan untuk cabai paprika ini, tidak cocok untuk tanaman cabai tipe cayane, seperti cabai besar dan cabai keriting Indonesia (Supena *et al.*, 2006a). Sistem lain untuk memproduksi tanaman HG cabai paprika adalah dengan melakukan subkultur atau langsung mengkultur antera pada media dua-lapis (Morrison *et al.*, 1986; Dolcet-Sanjuan *et al.*, 1997). Sedangkan metode kultur isolasi mikrospora frekuensi keberhasilan masih sangat rendah dan embrio yang dihasilkan masih sangat sedikit atau belum efisien (Supena *et al.*, 2006a, Kim *et al.*, 2008).

Penelitian untuk mengembangkan prosedur yang efisien dalam memproduksi tanaman HG beberapa genotipe cabai Indonesia telah dilakukan di Wageningen, Belanda dalam proyek Biotechnology Research Indonesia-Netherlands

(BIORIN). Prosedur kultur sebar-mikrospora (KSM) telah berhasil dikembangkan, dan ternyata lebih efisien dalam memproduksi tanaman HG daripada semua prosedur yang telah dilaporkan sebelumnya untuk cabai (Supena *et al.*, 2006a). Prosedur ini tentunya sangat berpotensi dan perlu segera diadaptasikan dan diterapkan pada kondisi lokal di Indonesia karena akan dapat mempercepat pembentukan galur murni dan selanjutnya akan meningkatkan efisiensi program pemuliaan cabai di Indonesia, khususnya dalam pengembangan varietas hibrida cabai berbasis kultivar lokal.

Penerapan metode KSM pada kondisi lokal menghadapi beberapa kendala, diantaranya adalah kondisi lingkungan yang berbeda, dan besarnya tingkat kontaminasi kultur yang berasal dari sumber eksplan sebagai konsekuensi sulitnya menumbuhkan sumber eksplan yang sehat pada kondisi iklim tropik. Dalam makalah ini disajikan upaya untuk mengatasi masalah tersebut untuk menerapkan metode KSM dalam memproduksi tanaman HG kultivar cabai lokal pada kondisi lokal di Bogor.

METODE PENELITIAN

Bahan tanaman dan karakterisasi fase perkembangan mikrospora

Benih cabai haploid ganda (HG) Galaxy hasil penyerbukan sendiri tanaman HG produksi kultur sebar-mikrospora di Wageningen digunakan sebagai bahan untuk tanaman model dalam penelitian ini. Seri ukuran kuncup bunga dianalisis tahapan perkembangannya menggunakan teknik pengamatan di bawah mikroskop flourescense yang dilengkapi filter-UV dengan pewarnaan 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Antera dari kuncup bunga dengan kandungan mikrospora pada fase akhir berinti tunggal lebih dari 50%, dengan frekuensi fase tengah berinti tunggal dan polen fase awal berinti dua masing-masing tidak melebihi 20% dan 50%, digunakan sebagai eksplan (Supena *et al.*, 2006a).

Prosedur kultur sebar-mikrospora

Prosedur kultur sebar-mikrospora yang telah dikembangkan oleh Supena *et al.* (2006a) digunakan pada penelitian ini. Prosedur ini menggunakan sistem medium dua lapis, yaitu media cair di atas media padat yang keduanya mengandung unsur hara makro, mikro dan vitamin media dasar Nitsch (Nitsch & Nitsch, 1969) dengan sumber karbon maltosa (20g/l). Khusus untuk media padat ditambahkan juga gelrite (2g/l) dan arang aktif (10g/l). Kedua media disterilisasi dengan autoklaf yang sebelumnya pH medium dibuat menjadi 5.8. Untuk cawan petri yang digunakan (ukuran diameter 6 cm) dibutuhkan sekitar 3 ml media padat dan ditambahkan 3 ml media cair di atas media padat sesaat sebelum kultur.

Kuncup bunga sumber eksplan dipanen pada pagi hari dan segera dimasukkan ke dalam cawan Petri yang dilembabkan dengan kertas merang basah untuk selanjutnya diinkubasi pada suhu 6-11°C selama satu hari sebagai praperlakuan. Sebelum antera diisolasi, kuncup bunga disterilisasi dalam alkohol 70% selama 30 detik, dibilas 3 kali dengan air steril, direndam dalam NaOCl 2% yang ditambah Tween-20 0.05% (v/v) selama 10 menit, dan selanjutnya dibilas 3 kali dengan air steril masing-masing selama 10, 5 dan 1 menit. Selanjutnya antera diisolasi secara aseptik dan dikulturkan pada media dua lapis. Kultur diinkubasi pada suhu 6-11°C selama satu minggu pertama dan selanjutnya diinkubasi pada suhu 25-28°C, keduanya selalu diinkubasi pada kondisi gelap.

Setelah masa inkubasi 7-8 minggu dari kultur, embrio lengkap dan dewasa yang terbentuk segera dipindahkan pada media perkecambahan yang mengandung unsur hara makro, mikro dan vitamin MS (Murashige dan Skoog, 1962) setengah konsentrasi, sukrosa 2%, 6-benzylaminopurine 0.1 µM, dan gelrite 2 g/l. Kultur diinkubasi dalam ruangan dengan penyinaran 16 jam terang dengan intensitas 25-30 µmol.m⁻².s⁻¹ pada suhu sekitar 25°C. Setelah 3-4 minggu, kecambah pada fase 1-2 daun setelah kotiledon disubkultur ke media vermikulit, kompos, atau sekam padi, sesuai dengan perlakuan percobaan untuk persiapan aklimatisasi. Bibit pada fase enam daun dalam media terpilih dipindah tanamkan ke media tanah-kompos-arang sekam (3:1:1) dalam polybag yang ditempatkan di rumah kaca/plastik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

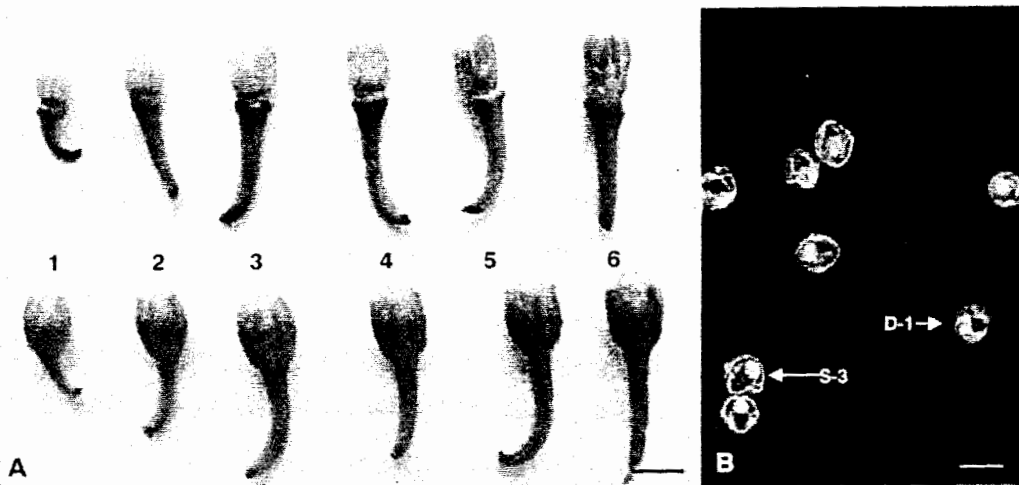
Hubungan morfologi kuncup bunga, antera dan fase perkembangan mikrospora

Hasil pengamatan morfologi kuncup bunga yang dikorelasikan dengan kandungan fase perkembangan mikrospora disajikan pada tabel 1 dan gambar 1. Kriteria kuncup bunga untuk fase perkembangan mikrospora yang diinginkan, yaitu lebih dari 50% mikrospora pada fase akhir berinti tunggal dengan frekuensi fase tengah berinti tunggal dan fase awal berinti dua masing-masing tidak melebihi 20% dan 50%, adalah ketika petal sama tinggi sampai sedikit lebih dari sepal. Penanda yang lebih akurat lagi adalah dari ciri morfologi antera ketika munculnya warna ungu pada ujung antera sampai warna ungu tersebut setengah dari panjang antera. Hasil ini sesuai dengan hasil pengamatan di Wageningen, Belanda seperti yang dilaporkan Supena *et al.* (2006a). Oleh karenanya untuk kepentingan praktis dalam menduga fase perkembangan mikrospora kuncup bunga berbagai kultivar lokal cabai yang digunakan untuk memproduksi tanaman HG cukup menggunakan kriteria ciri kuncup bunga dan warna antera

Tabel 1. Hubungan antara morfologi kuncup bunga, warna ungu pada antera dan fase perkembangan mikrospora pada tanaman haploid ganda Galaxy

Morfologi kuncup bunga pada beberapa stadia perkembangan (lihat gambar 1)	Keberadaan warna ungu pada antera	Fase perkembangan mikrospora (%)				
		S-1	S-2	S-3	D-1	D-2
1	Belum ada	27	53	20	0	0
2	Hanya bagian ujung	0	44	56	0	0
3	1/3 panjang antera	0	7	76	17	0
4	1/2 panjang antera	0	0	59	41	0
5	3/4 panjang antera	0	0	5	51	44
6	Seluruh antera	0	0	0	9	91

Keterangan: S-1 (fase awal berinti tunggal); S-2 (fase tengah berinti tunggal); S-3 (fase akhir berinti tunggal); D-1 (fase awal berinti dua); D-2 (fase akhir berinti dua menjelang polen atau serbuk sari dewasa)



Gambar 1. Morfologi kuncup bunga, antera, dan fase perkembangan mikrospora. Perbandingan petal dan sepal pada kuncup bunga (A bawah) dan ciri warna ungu pada antera (A atas) pada seri perkembangan kuncup bunga tanaman haploid ganda Galaxy. Angka menunjukkan tahapan perkembangan kuncup bunga seperti pada tabel 1. Mikrospora dengan pewarnaan DAPI (B) pada fase akhir berinti tunggal (S-3), dan fase awal berinti dua (D-1). Garis pada A = 3 mm dan B = 30 µm.

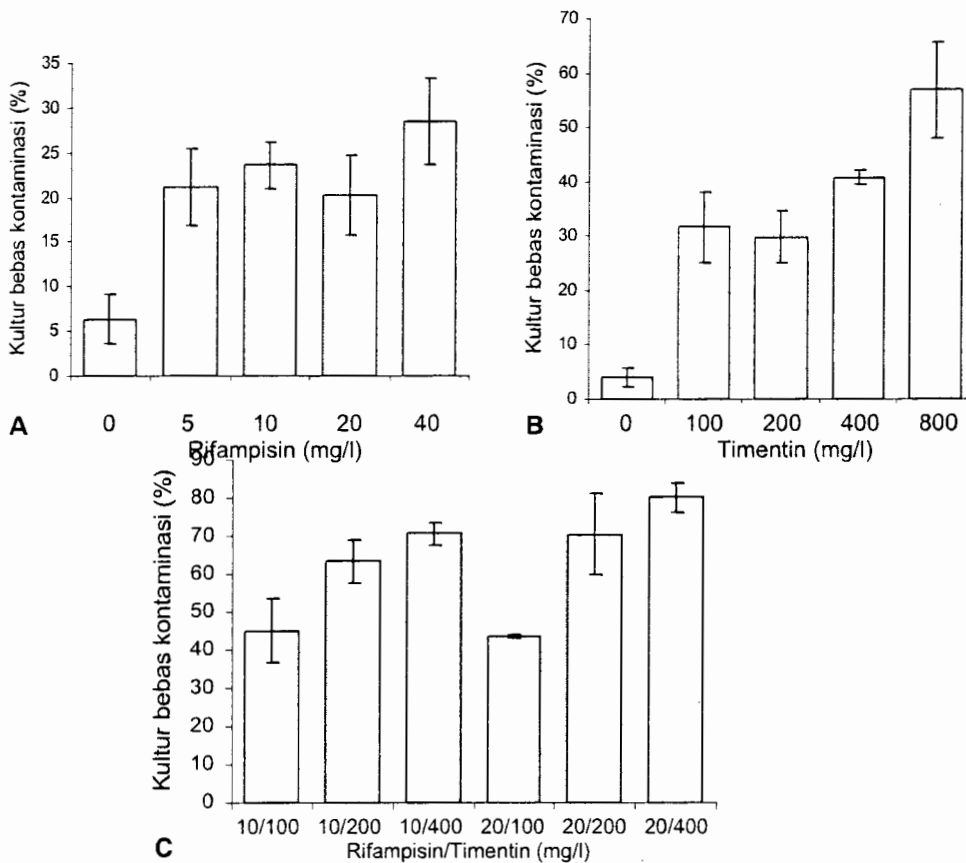
Penambahan antibiotik dalam medium dapat mengatasi kontaminasi

Hasil percobaan menunjukkan bahwa untuk perlakuan antibiotik Rifampisin (Rif) maupun Timentin (Tim) secara tersendiri nyata dapat menekan terjadinya kontaminasi sampai batas tertentu (Gambar 2 A dan B). Tingkat kontaminasi pada kultur tanpa perlakuan antibiotik mencapai lebih dari 90% atau kultur yang bebas kontaminasi hanya kurang dan 10%. Perlakuan Rif 5 mg/l dapat menghasilkan 21% kultur bebas kontaminasi, dan nilainya terus bertambah secara tidak signifikan sampai konsentrasi Rif 40 mg/l. Didasarkan pada pengaruh negatif atau fitotoksis Rif terhadap pembentukan embrio yang

dilaporkan Supena *et al.* (2006b), konsentrasi Rif 10 dan 20 mg/l dipilih untuk dikombinasikan dengan Tim pada percobaan berikutnya. Pengaruh penekanan kontaminasi kultur lebih tinggi lagi pada perlakuan Tim. Perlakuan Tim 100-200 mg/l mampu menekan sekitar 30%, Tim 400 mg/l sekitar 40%, dan Tim 800 mg/l sampai mendekati 60%. Konsentrasi Tim yang dipilih untuk dikombinasikan dengan Rif adalah Tim 200 dan 400 mg/l. Pengaruh positif antibiotik Rif dan Tim terhadap penekanan tingkat kontaminasi ternyata dapat berefek sinergis untuk lebih menekan terjadinya kontaminasi ketika antibiotik Rif dan Tim tersebut dikombinasikan (Gambar 2.C). Hal ini dikarenakan Rif efektif untuk menghambat pertumbuhan

bakteri gram positif (Chanprame *et al.*, 1996), sedangkan Tim efektif untuk menghambat pertumbuhan bakteri gram negatif (Nauerby *et al.*, 1997). Terdapat kecenderungan Rif secara tersendiri menurunkan kemampuan embriogenesis atau bersifat fitotoksik, sedangkan perlakuan Tim secara tersendiri tidak berefek negatif terhadap kemampuan embriogenesis yang berarti tidak bersifat fitotoksik. Hal yang sangat menarik adalah ketika Rif dan Tim yang

dikombinasikan, ternyata selain bersinergis dalam menekan terjadinya kontaminasi pada kultur, juga berefek positif terhadap kemampuan embriogenesis. Hal ini berarti bahwa efek negatif dari Rif terhadap kemampuan embriogenesis dapat dipulihkan dengan adanya Tim. Contoh kultur anthera yang menghasilkan embrio dengan prosedur KSM adalah dari perlakuan kombinasi Rif 10 mg/l dengan Tim 400 mg/l (Gambar 3).

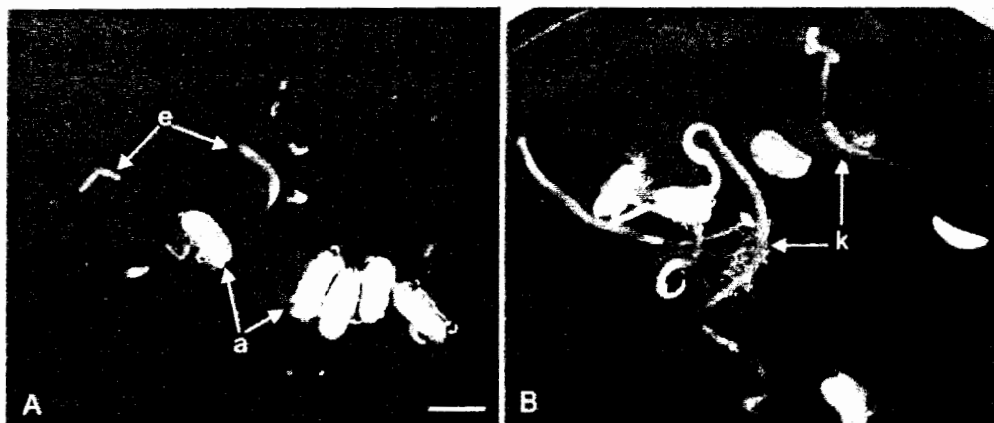


Gambar 2. Pengaruh perlakuan antibiotik Rifampisin (A) dan Timentin (B) secara terpisah, dan kombinasinya (C) terhadap penekanan tingkat kontaminasi kultur pada sistem Kultur Sebar Mikrospora (KSM)

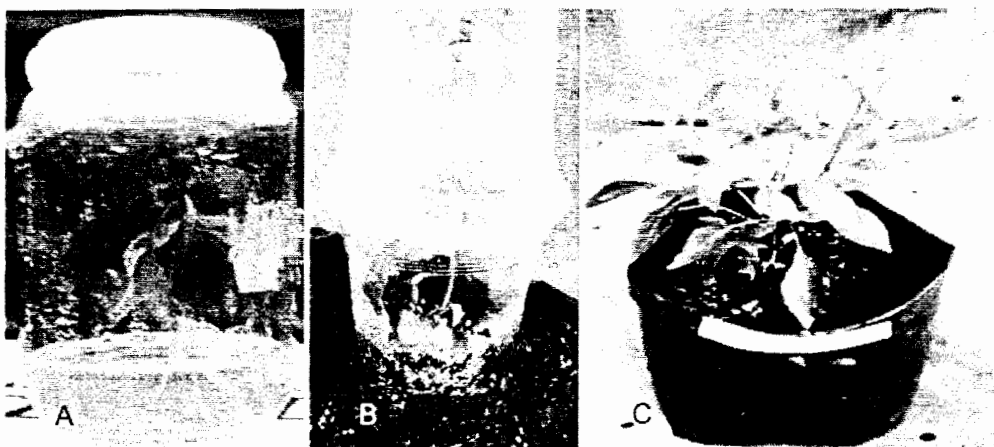
Perkecambah an embrio dan proses aklimatisasi

Embrio lengkap (mempunyai radikula/akar, epikotil dan kotiledon) berhasil dikecambahkan dengan menggunakan metode yang telah dikembangkan Supena *et al* (2006a) dengan sedikit modifikasi, yaitu embrio langsung dikecambahkan pada media-agar 1/2 MS dalam botol kultur (gambar 4A) sehingga tidak diperlukan subkultur pada tahapan media padat ini. Untuk aklimatisasi, penggunaan vermikulit sebagai media sering menimbulkan masalah dan ada

kecenderungan kecambah akan berangsur menuju kematian. Dari beberapa alternatif yang dicobakan, aklimatisasi berhasil dilakukan pada campuran media tanah:kasting:arang sekam (1:1:1) dengan melakukan pengaturan kelembaban menggunakan penutupan yang selanjutnya penutup dibuka secara bertahap (gambar 4B). Tanaman yang sudah berdaun 5-7 daun siap untuk dipindah tanamkan dalam polybag dengan media tanam campuran tanah:kasting:arang sekam (3:1:1) (gambar 4C).



Gambar 3. Embriogenesis mikrospora HG Galaxy dalam prosedur KSM dengan perlakuan kombinasi Rifampisin 10 mg/l dan Timentin 400 mg/l. Umur kultur 5 minggu (A) dan 8 minggu (B). Tanda panah menunjukkan embrio (e), antera (a) dan embrio yang telah berkecambah (k). Garis untuk A dan B = 3 mm.



Gambar 4. Proses pengecambahan dan aklimatisasi embrio dan tanaman hasil kultur antera pada prosedur KSM dari tanaman model HG Galaxy. A. Penge-cambahan embrio lengkap pada media agar, B. Aklimatisasi plantlet/bibit pada gelas plastik dengan penutupnya, C. Tanaman sudah ditanam dalam polybag dan terbuka.

KESIMPULAN DAN PROSPEKTIF

Implementasi prosedur kultur sebar mikrospora antera cabai telah berhasil dilakukan pada kondisi lokal di Bogor. Kriteria kuncup bunga sumber eksplan untuk fase perkembangan mikrospora lebih dari 50% pada fase akhir berinti tunggal adalah ketika petal sama tinggi sampai sedikit lebih dari sepal, dan dicirikan dari munculnya warna ungu pada ujung antera sampai setengah dari panjang antera. Penanganan masalah kontaminasi kultur *in vitro* berhasil dilakukan dengan menambahkan kombinasi antibiotik Rifampisin 10 mg/l dan Timentin 400 g/l dalam medium cair. Pengecambahan dan aklimatisasi

berhasil dilakukan dengan tahapan mengecambahkan embrio lengkap pada media-agar ½ MS dalam botol kultur, aklimatisasi dilakukan pada campuran media tanah:kasting:arang sekam (1:1:1) dengan pengaturan kelembaban. Prosedur yang telah diadaptasi pada kondisi lokal ini akan menjadi dasar untuk memproduksi secara cepat tanaman HG cabai kultivar lokal. Tanaman HG yang dihasilkan selanjutnya akan digunakan untuk persilangan dialel sebagai upaya untuk memperoleh beberapa kandidat varietas hibrida cabai unggul berbasis kultivar lokal.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Program Insentif Riset Terapan Tahun 2007. Kementerian

Negara Riset dan Teknologi yang telah mendanai pelaksanaan penelitian ini. Terima kasih juga

tersebut kepada Lestari Budi Utami dan Hakiim yang terlibat dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Alonso J C, Palloix A, Gebre-Selassie K, Lefebvre V, Moury B & Daubèze AM (1996) A complementary implementation of two genes originating from susceptible *Capsicum annuum* lines confers a new and complete resistance to pepper vein clearing virus. *Phytopathol* 86: 739-743.
- Almeida S, Todd JJ & Widholm JM (1996) Prevention of pink-pigmented methylophilic bacteria (*Methylobacterium mesophilicum*) contamination of plant tissue culture. *Plant Cell Rep* 16:222-225.
- Daubèze AM, Palloix A & Pochard E (1990) Resistance of androgenetic autodiploid lines of pepper to *Phytophthora capsici* and tobacco mosaic virus under high temperature. *Capsicum Nwsi* 8-9:47-48.
- Deptan (Departemen Pertanian) (2007) Sistem Informasi Eksekutif: Subsektor Hortikultura. <http://www.deptan.go.id/infoeksekutif/horti/2007>
- Delgado-Sanjuan R, Claveria E & Huerta A (1997) Androgenesis in *Capsicum annuum* L.-Effects of carbohydrate and carbon dioxide enrichment. *J Amer Soc Hort Sci* 122:468-475.
- Dumas de Vaulx R, Chambonnet D & Pochard E (1981) Culture *in vitro* d'anthères du piment (*Capsicum annuum* L.): amélioration des taux d'obtention de plantes chez différents génotypes par des traitements à +35°C. *Agronomie* 1:859-864.
- Dumas de Vaulx R & Pochard E (1986) Parthénogèse et androgenèse chez le piment. Role actuel dans les programmes de sélection. *Le Sélectionneur Français* 36: 3-16.
- Daubèze AM, Palmer CE & Keller WA (1994) Biotechnological application of haploids, pp. 77-110. In: Shargool PD & Ngo TT (eds), *Biotechnological Applications of Plant Cultures*. CRC, Boca Raton.
- Evans DA & Morrison RA (1974) Chromosome doubling techniques in haploids, pp. 153-190. In: Kasha KJ (ed.), *Haploids in Higher Plants, Advances and Potential*. Proceeding of the First International Symposium, Guelph, Ontario, June 10-14, 1974.
- Kim M, Jang IC, Kim JA, Park EJ, Yoon M & Lee Y (2008) Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Rep* 27:425-34
- Lefebvre V, Daubèze AM, Rouppe van der Voort J, Peleman J, Bardin M & Palloix A (2003) QTLs for resistance to powdery mildew in pepper under natural and artificial infection. *Theor Appl Genet* 107:661-666.
- Morrison RA, Koning RE & Evans DA (1986) Anther culture of an interspecific hybrid of *Capsicum*. *Plant Physiol* 126:1-9.
- Murashige T & Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473-497.
- Nauerby B, Billing K & Wyndale R (1997) Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration compare to carbenicillin and cefotaxime in concentrations suitable for elimination of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Sci* 121:169-177.
- Nitsch JP & Nitsch C (1969) Haploid plants from pollen grains. *Science* 163: 85-85.
- Sibi M, Dumas de Vaulx R & Chambonnet D (1979) Obtention de plantes haploïdes par androgenèse *in vitro* chez le piment (*Capsicum annuum* L.). *Ann Amélior Plantes* 29:583-606.
- Supena EDJ, Suharsono S, Jacobsen E & Custers JBM (2006a) Successful development of shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot peppers (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Rep* 25:1-10.
- Supena EDJ, Muswita W, Suharsono S & Custers JBM (2006b) Evaluation of crucial factors for implementing shed-microspore culture of Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae* 10 : 226-232.