

INDUKSI TANAMAN HAPLOID *Dianthus* sp. MELALUI PSEUDOFERTILISASI MENGUNAKAN POLEN YANG DIIRADIASI DENGAN SINAR GAMMA

Induction of Haploid *Dianthus* sp. Trough Pseudofertilization with Gamma Ray Irradiated Pollen

Kartikaningrum, S¹., A. Purwito², G. A. Wattimena², B. Marwoto¹ dan D. Sukma²

¹Balai Penelitian Tanaman Hias, Segunung, Jl. Raya Pacet, Ciherang, Cianjur 43253,
Telp. /Fax. (+62263514138, Email : suskandari@yahoo.com

²Institut Pertanian Bogor, Jl. Raya Dermaga, Bogor

ABSTRACT

Haploid plants of *Dianthus* sp. were obtained by pseudofertilization using irradiated pollen. Gamma ray of 100 gray were used for inactivating pollen. Crossing were made using 131 female as pod parents. After pollination 59% fruits were harvested, 41% were dropped and only 51 ovaries were cultured on the medium. Ovaries were explanted 1 – 2 weeks after pollination and cultured on solid MS medium containing 400 mg L⁻¹ glutamine + 103,77 mg L⁻¹ prolin and growth regulator including 1-Naphthaleneacetic acid (NAA) and 6-Benzylaminopurine (BAP). The first ploidy seedling observation was made by number of chloroplast in each side of guard cells of stomata leaves. Four haploid plants were obtained from this screening, but based on chromosome counting only three haploid plants revealed.

Key words: *Dianthus* sp., pseudofertilization, gamma ray, haploid plants

PENDAHULUAN

Sejak A. D. Bergener menemukan tanaman haploid pada *Datura starmonium* pada tahun 1921, pemulia tanaman mulai bekerja ekstensif untuk mendapatkan tanaman haploid baik secara *in vivo* maupun *in vitro*. Penemuan embrio dan tanaman haploid yang dihasilkan melalui kultur antera *Datura* oleh Guha dan Maheswari pada tahun 1966 membawa ke kemajuan perkembangan teknologi haploid. Teknologi ini kemudian diterapkan pada beberapa spesies tanaman lain, namun frekuensi keberhasilannya masih rendah. Secara alami haploid muncul sebagai hasil dari partenogenesis. Teknik *in vivo* untuk menginduksi haploid diantaranya adalah: androgenesis, gynogenesis, eliminasi kromosom melalui persilangan kerabat jauh, semigami, perlakuan kimia, *temperature shock*, dan efek iradiasi.

Pada tanaman anyelir penelitian androgenesis dengan menggunakan antera pernah dilakukan oleh Fu *et al.* (2008), namun hasilnya tidak memuaskan. Metode tersebut dikembangkan oleh Kartikaningrum *et al.* (2011) dengan metode kultur antera sebar (*shed microspore*), juga tidak menunjukkan respon yang baik. Pendekatan metode lain untuk mendapatkan tanaman haploid perlu dicoba. Salah satu metode yang dilakukan adalah pseudofertilisasi.

Pseudofertilisasi dengan memanfaatkan serbuk sari yang diradiasi diikuti dengan penyelamatan embrio telah banyak diterapkan pada beberapa tanaman buah-

buahan yaitu plum (Peixe *et al.* 2000), kiwi (Chalak and Legave, 1997, Musian *et al.* 1998), melon (Kato *et al.* 1993), jeruk (Bermejo *et al.* 2011). Pada tanaman hias telah dilakukan pada *Primula* (Carraro *et al.* 1990), bunga matahari (Todorova *et al.* 2004), mawar (Meynet *et al.* 1994), anyelir (*Dianthus caryophyllus*) (Sato *et al.* 2000) dan tanaman lain pada kapas (Aslam, 2000; Savaskan, 2002). Pada tanaman buah-buahan banyak menghasilkan buah tanpa biji yang disebabkan oleh embrio yang mengalami degenerasi (Sugiyama *et al.* 2002). Pada tanaman apel tanaman haploid berhasil diregenerasi setelah di silang dengan polen yang diiradiasi sinar gamma pada level dosis 200 – 500 Gy diikuti dengan penyelamatan embrio pada umur 2-3 bulan setelah polinasi dengan media MS (Zhang *et al.* 1991). Sementara pada tanaman mawar dosis 500 Gy merupakan dosis yang minimum untuk menginduksi parthenogenesis (Meynet *et al.* 1994). Pada tanaman melon dosis yang diperlukan adalah 300 Gy sinar Gamma. Produksi tanaman haploid pada anyelir (*Dianthus caryophyllus*) melalui pseudofertilisasi pernah dilakukan oleh Sato *et al.* (2000) menggunakan sinar X dengan dosis 100 dan 200 kRad, namun frekuensi kejadiannya masih sangat kecil. Tujuan penelitian adalah untuk mendapatkan tanaman haploid melalui pseudofertilisasi dengan serbuk sari yang diiradiasi dengan sinar gamma diikuti dengan penyelamatan embrio muda secara *in vitro*.

BAHAN DAN METODE

Bahan Tanaman

Bahan tanaman menggunakan spesies *Dianthus caryophyllus* (cv “Laura”, cv “Pradoravit”, cv “Rondesvous” dan cv “Alifia”) dan *Dianthus chinensis* (pink/V11, ungu/V13, telstar/V15) koleksi Balai Penelitian Tanaman Hias. *Dianthus caryophyllus* ditanam di bawah rumah plastik, sedang *Dianthus chinensis* ditanam di pot ukuran 17 cm di Kebun Percobaan tanaman hias Cipanas, pada ketinggian tempat 1100 m dpl. Serbuk sari diambil dari tanaman *Dianthus chinensis* warna ungu (V13) dan kombinasi merah ungu (V14) yang telah berumur 4 bulan dari bahan stek pucuk.

Koleksi Serbuk Sari, Iradiasi Dan Penyerbukan

Serbuk sari diambil dari tanaman pada fase T8 (11 hari setelah inisiasi bunga) (Kartikaningrum, 2011. *Unpublish*), dikumpulkan dalam *Petridish* dan diiradiasi menggunakan sinar gamma pada alat *Gamma chamber 4000 A* (CAIRT-BATAN, Indonesia) dengan laju dosis 1 kRad/48 detik pada tanggal 6 April 2011. Dosis yang digunakan adalah dosis tunggal 100 Gy (LD₁₀₀). Setelah diradiasi serbuk sari diambil sampelnya untuk diperiksa dengan menumbuhkannya pada larutan sukrosa 15% pada suhu inkubasi 25 °C, selama 24 jam. Pemeriksaan lain dengan pewarnaan aceto-orcein, kemudian diperiksa di bawah mikroskop untuk memastikan bahwa serbuk sari tidak aktif.

Satu hari sebelum dilakukan persilangan, bunga betina diemaskulasi kemudian ditutup dengan kertas untuk menghindari penyerbukan dari serbuk sari yang tidak diinginkan. Penyerbukan dilakukan dengan menempelkan serbuk sari yang telah diradiasi pada kepala putik dan ditutup kembali dengan kantong kertas. Sebagai kontrol penyerbukan juga dilakukan dengan serbuk sari tanpa iradiasi.

Penyelamatan Embrio

Buah dipetik pada umur satu sampai dua minggu setelah penyerbukan. Untuk kontrol buah dipanen umur satu dan dua minggu setelah penyerbukan. Buah dibersihkan dengan akuades, kemudian diikuti dengan perendaman pada alkohol 70% selama 1 menit dan dilewatkan di atas api sekilas. Buah yang telah steril dibelah dan embrio muda ditanam pada media. Dua media tumbuh dengan media dasar MS dan penambahan 400 mg L^{-1} glutamine + $103,77 \text{ mg L}^{-1}$ prolin, serta komposisi sukrosa dan zat pengatur tumbuh yang berbeda-beda adalah M8 = MS + $0,35 \text{ mg L}^{-1}$ NAA + 1 mg L^{-1} BAP + 60 g L^{-1} sukrosa (Sato *et al.* 2000), dan M10 = MS + 1 mg L^{-1} 2.4D + 1 mg L^{-1} BAP + 20 g L^{-1} sukrosa (Mosquera *et al.* 1999). Kultur embrio muda diinkubasi dalam ruang dengan suhu 25°C dengan penyinaran 16 jam tiap hari dengan intensitas cahaya 1000 – 1700 lux. Embrio yang tumbuh menjadi tanaman kemudian disubkultur pada media MS0.

Evaluasi Ploidi

Evaluasi tingkat ploidi awal pada tanaman dilakukan dengan memeriksa jumlah kloroplas dalam sel penjaga stomata pada daun yang telah membuka sempurna. Lapisan daun bagian bawah diambil dan ditempatkan pada gelas preparat, ditambah beberapa tetes aquades, dan ditutup dengan gelas penutup, kemudian diperiksa di bawah mikroskop pada perbesaran 10 x 10 dan 10 x 40.

Selain itu juga dilakukan penghitungan jumlah kromosom di Puslitbang Biologi LIPI dan Balithi menggunakan potongan meristem. Potongan tersebut direndam dalam larutan $0,002 \text{ M}$ 8-Hydroxyquinolin selama 3-5 jam pada suhu 4°C , kemudian dibilas dengan akuades, dan difiksasi dalam 45% asam asetat selama 10 menit. Potongan pucuk (meristem) dimasukkan pada campuran larutan 1 N HCl dan 45% asam asetat dengan perbandingan 1:3 pada air dengan suhu 60°C selama 1-5 menit, dan diwarnai dengan aceto-orcein 2%, dilakukan *squashing* kemudian dihitung jumlah kromosomnya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Iradiasi Sinar Gamma

Efek iradiasi pada perkecambahan serbuk sari terlihat bahwa pada dosis iradiasi 100 Gy perkecambahan polen setelah 24 jam ditumbuhkan pada larutan sukrosa 15% terhambat (Gambar 1C) dibandingkan dengan serbuk sari yang tidak di iradiasi yang mampu berkecambah sempurna (Gambar 1A). Selain itu pada dosis 100 Gy kemampuan menyerap pewarna aceto-orcein berkurang (Gambar 1D) dibandingkan dengan kontrol yang mampu menyerap pewarna aceto-orcein secara intensif (Gambar 1B). Hasil ini menunjukkan bahwa serbuk sari non aktif.

Penyelamatan Embrio

Buah hasil penyerbukan yang dapat dipanen adalah buah dengan umur 10, 13 dan 14 hari setelah penyerbukan, sedang pada tanaman kontrol dipanen pada umur 7 dan 14 hari. Dari sebanyak 131 persilangan yang telah dilakukan 77 ovarium (59%) dapat dipanen, 54 ovarium (41%) buah gugur. Dari 77 ovarium yang dipanen hanya 51 ovarium dan 2

ovari kontrol diteruskan untuk di kultur. Hasil penyelamatan embrio ini 7 kultur berhasil tumbuh, sementara dua persilangan kontrol tumbuh semua (Tabel 1).

Tabel 1. Pengaruh iradiasi sinar gamma 100 Gy pada serbuk sari terhadap keberhasilan pertumbuhan embrio

Umur buah (HSP)	Jumlah ovary yang ditanam	Jumlah eksplan berhasil tumbuh				Jumlah total
		V11 x V14	V15 x V14	<i>D. caryophyllus</i> x V14	Kontrol	
7	1	0	0	-	1	1
10	8	1	0	-	-	1
13	19	2	1*	-	-	3
14	25	3	0	0	3	6

Keterangan: *) kontaminasi, HSP: hari setelah penyerbukan

Hasil penelitian Sato *et al.* (2000), perlakuan iradiasi sinar X 100 kRad pada serbuk sari sebagai donor polen menghasilkan 300 ovary yang berhasil ditanam, tetapi hanya 55 ovary yang berhasil tumbuh dan beregenerasi. Sementara dosis iradiasi sinar X 200 kRad diperoleh 100 ovary, namun hanya 1 ovary saja yang tumbuh. Tanaman yang dihasilkan dari biji hasil penyerbukan dengan serbuk sari yang diiradiasi merupakan hasil dari tidak lengkapnya transmisi genom jantan (Peixe *et al.* 2000). Menurut Sestili dan Ficcadenti (1996), iradiasi pada tingkat yang rendah (sub lethal) hanya merusak sebagian inti generatif saja, sehingga masih mampu menyerbuki sel telur.

Menurut Pandey (1986) setelah aplikasi radiasi pada polen pada dosis yang tinggi (lethal dosis), tidak terjadi fertilisasi normal dan genom paternal akan tereliminasi, tetapi inti sel telur yang berada pada fase G1 kemungkinan distimulasi untuk melanjutkan siklus sel. Embrio partenogenetik yang dihasilkan pada dasarnya bersifat maternal. Jika donor serbuk sari bersifat sub lethal, inti dari serbuk sari rusak, tetapi tidak dalam kapasitasnya secara fungsional dan fisik, sehingga fertilisasi normal dapat terjadi. Generasi M1 (hasil persilangan dengan serbuk sari yang diiradiasi) ini menunjukkan variasi derajat kemiripan pada kedua tetua. Namun generasi M1 ini lebih bersifat maternal dibandingkan dengan persilangannya yang murni, dan maternalisasi meningkat sesuai dengan dosis yang semakin meningkat.

Dari hasil penelitian ini, embrio mulai tumbuh menjadi tunas pada minggu ke 4 setelah kultur. Makin lama umur buah dipanen, makin banyak jumlah ovary yang ditanam (Tabel 1). Enam embrio langsung tumbuh menjadi tunas, sedang eksplan hasil persilangan V11 x V14 (PF89) yang dipanen umur 10 hari terinduksi menjadi kalus. Munculnya kalus ini kemungkinan disebabkan biji yang hanya mempunyai endosperm saja, karena bersentuhan dengan media sehingga terinduksi menjadi kalus. Pada tanaman apel setelah penyerbukan dengan serbuk sari yang diiradiasi menghasilkan biji atau endosperm saja atau embrio dan endosperminya. Hal ini terjadi karena hanya inti sperma tunggal saja yang ada dalam tabung sari yang mampu membuahi sel telur atau berfusi dengan inti polar (Nicoll *et al.* 1987). Tetapi hasil yang pasti harus dilihat tingkat ploidinya, hanya saja sampai saat ini kalus baru mengalami regenerasi (Gambar 1 E-H).

Persentase tertinggi terbentuknya embrio menjadi tanaman adalah pada umur embrio 14 hari HSP (24%). Hasil penelitian Sato *et al.* (2000) umur 3 minggu merupakan umur maksimal ovarium yang dapat dipanen, selebihnya buah akan gugur. Berbeda dengan penelitian ini, pada persilangan normal 3 minggu setelah penyerbukan buah telah masak ditandai dengan berubahnya warna biji dari putih menjadi hitam. Sehingga panen biji dilakukan maksimal umur dua minggu untuk menghindari kehilangan materi. Perbedaan ini disebabkan oleh penggunaan materi induk betina yang digunakan. Pada penelitian Sato *et al.* (2000) menggunakan *Dianthus caryophyllus* sebagai penerima serbuk sari, yang memiliki umur berbunga yang lebih lama. Tanaman kontrol yang dipanen satu minggu setelah penyerbukan hanya satu ovul yang mampu tumbuh. Hasil ini menunjukkan bahwa umur satu minggu buah masih terlalu muda untuk berkembang menjadi tanaman (Gambar 1 I-K). Buah umur satu minggu biji belum masak dan berwarna putih, lambat laun biji berubah menjadi coklat seperti biji masak. Sejalan dengan pendapat Bohanec (2009) dan Musial *et al.* (2005) proses pemasakan kantung embrio berlanjut selama kultur *in vitro*.

Dalam satu ovarium pada umumnya *Dianthus chinensis* memiliki 80-100 ovul. Pada persilangan yang normal biasanya didapatkan biji hanya berkisar antara 10 - 20 saja. Hal ini terjadi karena viabilitas polen *D. chinensis* sangat rendah (40 – 60%) (Kartikaningrum *et al.* 2011). Perlakuan iradiasi pada serbuk sari untuk penyerbukan menyebabkan pertumbuhan embrio menjadi terhambat. Hal ini ditunjukkan dari hasil persilangannya yang hanya tumbuh 5 eksplan dari 30 ovarium yang ditanam di media M8 dan 2 eksplan dari 23 ovarium yang ditanam di media M10 (Tabel 2). Pada kontrol semua eksplan berhasil tumbuh. Hasil ini menunjukkan bahwa kedua media perkecambahan semuanya dapat digunakan. Tetapi M8 memiliki persentase yang lebih tinggi dibanding M10, karena jumlah sukrosanya yang lebih tinggi. Hal yang sama juga terjadi pada mawar (Meynet *et al.* 1994) bahwa embrio dapat berkecambah di semua media uji dan tidak ada pengaruh penggunaan hormon yang berbeda-beda. Hasil penelitian Katoh *et al.* 1993 penggunaan media E20A, MS dan N6 pada hasil penyelamatan embrio melon juga tidak berbeda nyata.

Tabel 2. Pengaruh media terhadap jumlah ovarium yang menghasilkan planlet

Media	jumlah ovarium yang ditanam	V11xV14	V15xV14	V15xV13	V14xV13	D. <i>caryophyllus</i> x V14	Kontrol (V11xV14)
M8	30	16 (4)*	1 (1)*	1	3	8	1(1)*
M10	23	17 (2)*	3	0	0	0	3(3)*

Keterangan : *) angka di dalam kurung adalah embrio yang berhasil tumbuh

M8 = MS + 0,35 mg L⁻¹ NAA + 1 mg L⁻¹ BAP + 60 g L⁻¹ sukrosa (Sato *et al.* 2000), M10 = MS + 1 mg L⁻¹ 2.4D + 1 mg L⁻¹ BAP + 20 g L⁻¹ sukrosa (Mosquera *et al.* 1999).

Dari semua eksplan yang berhasil tumbuh pada media M8 dan M10 pada umumnya hanya menghasilkan 1 – 2 biji yang mampu tumbuh dan sebagian besar berasal dari persilangan V11 dengan V14 (Tabel 3).

Tabel 3. Jumlah embrio yang tumbuh setiap ovarium

Kode genotipe	Betina	Donor polen	Media	Jumlah embrio tumbuh
PF003	V11	V14	M8	1 ⁺
PF035	V11	V14	M8	2
PF042	V11	V14	M8	1
PF069	V11	V14	M8	2
PF074	V15	V14	M8	1*
PF079	V11	V14	M10	1
PF089	V11	V14	M10	1

Keterangan: *) terkontaminasi +) planlet mati

Evaluasi Tingkat Ploidi

Dianthus chinensis diploid mempunyai jumlah kromosom 30, dan haploidnya adalah 15. Salah satu pendekatan awal untuk melihat tingkat ploidi tanaman adalah dengan melihat jumlah kandungan kloroplas dalam sel penjaga stomata yang dapat diamati pada daun hasil kultur *in vitro*. Yuan *et al.* (1980) menemukan bahwa terdapat korelasi antara tingkat ploidi kromosom dan jumlah kloroplas dalam sel penjaga stomata pada beberapa tanaman. Ditemukan pula bahwa jumlah kloroplas bervariasi secara signifikan diantara ploidi stomata yang berbeda dalam varietas yang sama. Akurasi penghitungan kloroplas untuk identifikasi ploidi tanaman yang berbeda lebih dari 90% (Zhang 2005, Winarto *et al* 2010).

Hasil analisis jumlah kandungan kloroplas pada sel penjaga stomata diperoleh 4 genotipe yang diduga haploid (Tabel 4 dan Gambar 1 L-P). Hasil penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian Yuan *et al.* (1980) bahwa jumlah kloroplas bervariasi pada genotipe yang sama dengan kisaran jumlah kloroplas antara 9-24 pada genotipe haploid dan 19-36 pada genotipe diploid (kontrol).

Tabel 4. Rerata dan kisaran jumlah kloroplas pada sel penjaga stomata enam genotipe *Dianthus chinensis*

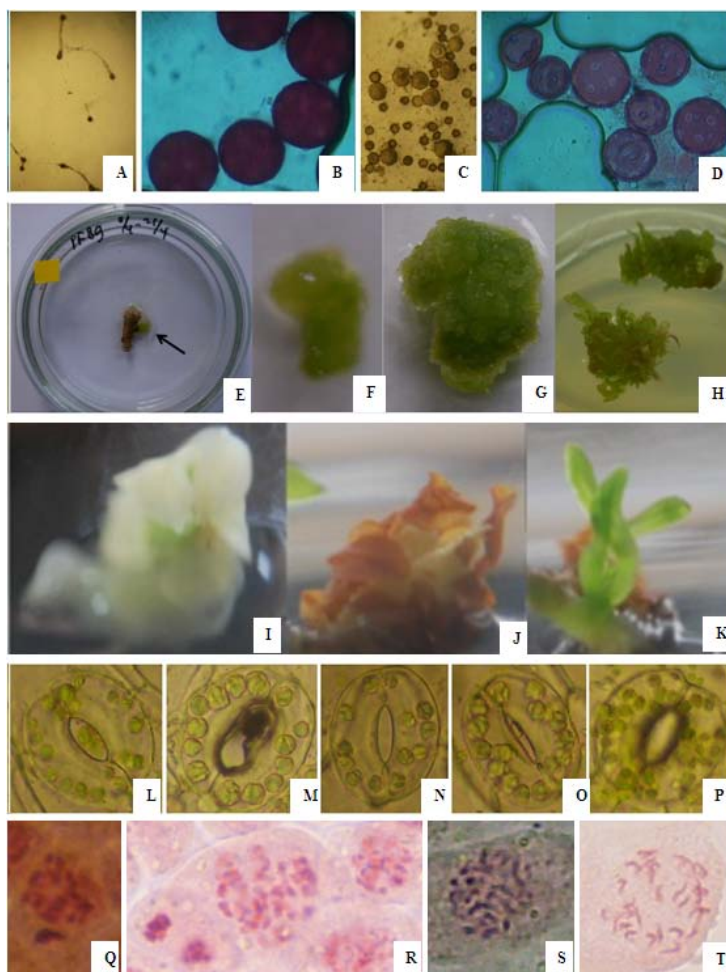
Genotipe	Jumlah stomata yang diamati	Rata-rata jumlah kloroplas	Kisaran
PF035-1	77	15,88 ± 2,47	12 - 24
PF042	144	14,42 ± 1,79	9 - 18
PF069-1	47	13,51 ± 2,45	9 - 18
PF079	21	15,57 ± 2,18	10 - 18
Kontrol 1	116	26,00 ± 3,08	19 - 36
Kontrol 2	34	25,00 ± 2,19	21 - 31

Hasil analisis jumlah kromosom sejalan dengan analisis jumlah kloroplas pada sel penjaga stomata. Jumlah kromosom diploid adalah 30 sedang haploid adalah 15 (Gambar 1 Q-T). Genotype PF79 dijumpai dua macam jumlah kromosom yaitu 15 dan 30. Hasil ini sama dengan yang diperoleh Fu *et al* (2008), bahwa beberapa *Dianthus chinensis* jaringan vegetatifnya mempunyai 2 macam jumlah kromosom. Hasil

penelitian Fu *et al.* (2008) dan Kartikaningrum *et al.* (2011) diketahui bahwa 2 macam n dan $2n$ ditemukan pada sel mikrospora. Jaringan yang mengandung sel haploid dan diploid pada dasarnya berasal dari sel haploid yang mengalami penggandaan kromosom secara spontan pada sebagian jaringannya. Secara teori sel diploid dalam tanaman haploid berasal dari kesalahan mitosis yang menghasilkan jalur sel dengan laju pertumbuhan yang lebih cepat dibanding sel tetangganya yang haploid dan mendominasi meristem (Winton dan Einspahr 1968).

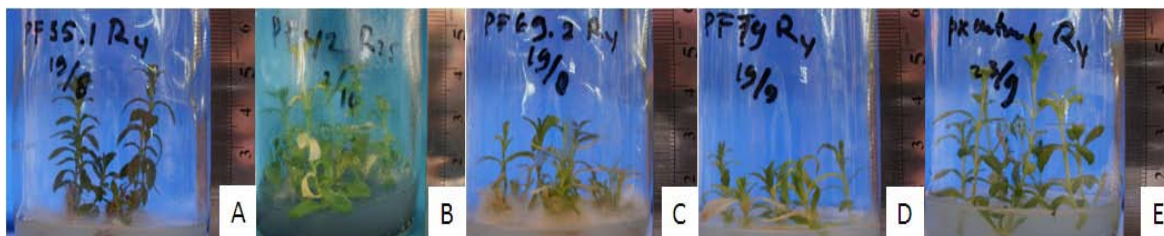
Seperti pada umumnya tanaman haploid, pertumbuhan awal planlet *Dianthus chinensis* haploid hasil pseudofertilisasi ini lebih lambat dibandingkan dengan planlet diploid dan ukuran tanamannyapun lebih kecil pada media MS_0 (Gambar 2).

Menurut Vassileva-Dryanovska (1966) embrio haploid dan endosperm diploid atau haploid setelah polinasi dengan serbuk sari yang di radiasi terjadi melalui dua jalan. Pertama adalah terkait dengan stimulasi inti dari induk betina untuk membelah melalui piknosis kromatin jantan sedang kedua adalah terkait dengan fertilisasi dari sel telur dengan rusaknya sel sperma, kromatin akan tereliminasi dalam sitoplasma. Perlakuan iradiasi pada serbuk sari menyebabkan DNA kromosom rusak, sehingga embrio yang dihasilkan dari serbuk sari yang diradiasi ini hanya mengandung kromosom dari sel telur.



Gambar 1. (A-B) Perkecambahan serbuk sari dan penyerapan pewarna aceto-orcein kontrol pada sukrosa 15%, (C-D) Perkecambahan dan penyerapan warna

aceto-orcein pada sebuk sari yang diradiasi pada dosis 100 Gy. (E-H) Eksplan V11 x V14 (PF89) yang terinduksi menjadi kalus. (I-K) pertumbuhan embrio kontrol: biji umur 1 minggu, 30 hari setelah kultur, 42 hari setelah kultur. (L-P) Kloroplas dalam sel penjaga stomata *Dianthus chinensis* : haploid : (L) PF035-1, (M) PF042, (N) PF069-1, (O) PF079, dan diploid : (P) kontrol. (Q-S) Jumlah kromosom : (Q) PF35.1 ($2n=x=15$), (R) PF79 ($2n=x=15$ dan 30), (S) PF42 ($2n=2x=15$) dan (T) Kontrol ($2n=2x=30$)



Gambar 2. Pertumbuhan planlet (A) PF35.1, (B) PF42, (C) PF69.1, (D) PF79 dan (E) diploid/kontrol

KESIMPULAN

1. Analisis tingkat ploidi awal tanaman dapat dilakukan dengan melihat jumlah kloroplas pada sel penjaga stomata.
2. Jumlah kloroplas pada sel penjaga stomata mendekati jumlah kromosom.
3. Medium dengan kandungan sukrosa yang lebih tinggi jumlah embrio yang tumbuh lebih tinggi
4. Penyerbukan menggunakan serbuk sari yang diradiasi 100 Gy dapat menginduksi ginogenesis *Dianthus sp.* menghasilkan empat tanaman haploid berdasarkan jumlah kloroplas pada sel penjaga stomata, tetapi berdasarkan jumlah kromosom pada sel meristem apikal diperoleh tiga tanaman haploid.

DAFTAR PUSTAKA

- Aslam, M. 2000. Utilization of pollen irradiation technique for the improvement of *G. Hirsutum* L. Pakistan Journal of Biological Science 3 (11): 1814-1816.
- Bermejo, A. J. Pardo and A. Cano. 2011. Influence of gamma irradiation on seedless citrus production: pollen germination and fruit quality. Food and Nutrition Science 2: 169-180.
- Bohanec, B. 2009. Doubled Haploid via Gynogenesis. In A. Touraev *et al.* (Eds). *Advances in Haploid production in Higher Plants*. Springer Science + Business Media B.V. pp 35-46.
- Carraro, L. P. D. Gerola, G. Lombardo and F.M. Gerola. 1990. Pseudo-self-compatibility in ultraviolet irradiated plants of *Primula acaulis* ('pin' morph). Journal of Cell science 95: 659-665.
- Chalak, L. And J. M. Legave. 1997. Effect of pollination by irradiated pollen in Hayward Kiwifruit and spontaneous doubling of induce parthenogenetic trihaploids. Scientia Horticultura 68: 83-97.
- Chat, J. S. Decroocq and R. J. Petit. 2003. A one-step organelle capture: gynogenetic kiwifruit with paternal chloroplas. Proc R. Soc. Lond. B 270:183-789.

- Fisher, M., Ziv, M., and Vainstien, A. 1993. An efficient method for adventitious shoot regeneration from cultured carnation petals. *Scientia Horticulturae*. 53: 231-237.
- Fu, X. P, S.H. Yang and M. Z. Bao. 2008. Factors affecting somatic embryogenesis in anther cultures of Chinese pink (*Dianthus chinensis* L). *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* (2008) 44:194–202.
- Kartikaningrum, S. 2011. Teknologi Haploid anyelir: Studi biologi dan Pendahulunya. Laporan Teknik Khusus. Program Studi Pemuliaan dan Bioreknologi Tanaman. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. 37 hal..
- _____, A. Purwito, G. A. Wattimena, B. Marwoto dan D. Sukma. 2011. Teknologi Haploid Anyelir: Studi tahap perkembangan mikrospora dan seleksi tanaman donor anyelir. *Jurnal Hortikultura*, vol 21 (2): 101-112.
- Katoh, N., M. Hagimori and S. Iwai. 1993. Production of haploid plants of melon by pseudofertilization Ovule Culture. *Plant Tissue Culture Letters* 10 (1): 60-66.
- Leshem, B. 1990. Somaclonal variation in carnation. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 11. Somaclonal Variation in Crop Improvement*. (Ed.) Bajaj, Y.P.S., pp 573-585, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Meynet, J., R. Barrade, A. duclos and R. Siadous. 1994. Dihaploid plants of roses (*Rosa x hybrid*, cv “Sonia) obtained by parthenogenesis induced using irradiated pollen and in vitro culture of immature seeds. *Agronomie* 2: 169-175.
- Mosquera T., L.E. Rodríguez A. Parra, and M. Rodríguez. 1999. In vitro adventive regeneration from Carnation (*Dianthus caryophyllus*) anther. *International Symposium on Cut Flowers in the Tropics. ISHS Acta Horticulturae* 482.
- Musial K. B. Bohanec, M. Jakse and L. Przywara. 2005. The development of onion (*Allium cepa* L.) embryo sac in vitro and gynogenesis induction in relation to flower size. *In vitro Cell Dev Biol-Plant* 41: 446-452.
- Nicoll, M. F., G. P. Chapman, and D. J. James. 1987. Endosperm responses to irradiated pollen in apples. *Theor. Appl. Genet* 74: 508-515
- Pandey, K.K. 1986. Gene transfer through the use of sublethally irradiated pollen: the theory of chromosome repair and possible implication of DNA repair enzymes. *Heredity* 57: 37-46
- Peixe, A. M.D. Campos, C.Cavaleiro, J. Barroso, dan M. S. Pais. (2000). Gamma-irradiated pollen induce the formation of 2n endosperm and abnormal embryo development in European plum (*Prunus demestica* L., cv “Rainha Claudia Verde”). *Scientia Horticultura* 86: 267-278.
- Plasmeijer, J. & C. Yanai. 2006. Cut Flowers and Ornamental Plants report. Market News Service. Report No. M2. 46 p.
- Savaskan, C. 2002. The effect of gamma irradiation on the pollen size of *Gossypium hirsutum* L. *Turk J Bot* 26 : 477-480
- Sestili, S. and N. Ficcadenti. 1996. Irradiated pollen for haploid production. In. Jain, S *et al.* (Eds). *In Vitro Haploid Production in Higher Plants*. Vol. I. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. pp. 263-274
- Sugiyama, K. M. Morishita, dan E.. Nishino. 2002. Seedless watermelon produced via soft X-irradiated pollen. *HortScience* 37:251-419.
- Todorova, M., P. Ivanov, N. Nenova and J. Encheva. 2004. Effect of female genotype on the efficiency of γ -induced parthenogenesis in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Helia* 27 (41): 67-74.

- Vassileva-Dryanovska, O. A. 1966. Development of embryo and endosperm produced after irradiated of pollen in *Tradescantia*. *Hereditas* 55: 129-148
- Winarto, B., N. A. Mattjik, J. A. Teixeira da Silva, A. Purwito and B. Marwoto. 2010. Ploidy screening of anthurium (*Anthurium andreanum* Linden ex andre) regenerants derived from anther culture. *Scientia Horticulturae* 127: 86-90
- Winton, L.L and D. W. Einspahr 1968. The use of treated pollen for aspen haploid production. *For. Sci* 14: 406-407
- Yuan, Su-xia, L. Y. Mei, F. Z. Yuan, Y. L. Mei, Z. Mu, Z. Y. Yong and S. P. Tian. 2009. Study on the relationship between the ploidy level of microspore-derived plants and the number of chloroplast in stomatal guard cells in *Brassica oleracea*. *Agricultural Science in- China* 8 (8): 939-946.
- Zhang J. L. 2005. The relationship between stoma and the ploidy in grape. *Gansu Science and Technology*, 21: 103-104
- Zhang Y. X., and Y. Lespinasse. 1991. Pollination with gamma-irradiated pollen and development of fruits, seeds and parthenogenic plants in apple. *Euphytica* 54: 101-109