

PENINGKATAN KERAGAMAN GENETIK MAWAR MINI MELALUI KULTUR *IN-VITRO* DAN IRADIASI SINAR GAMMA

[Increase of Genetic Variation of Mini Rose (*Rosa hybrida* L.)
Through *In-Vitro* Culture and Gamma-Ray Irradiation]

Wahyu Handayati¹, Darliah², I Mariska² dan R Purnamaningsih²
¹Balithi, Segunung ²Balitbio, Bogor

ABSTRACT

Mini rose (*Rosa hybrida* L.) is one of the favorite ornamental plants. To get a new appearance of this mini rose, two experiments were conducted at Cipanas and Bogor, from April 1999 to March 2000. In the first experiment, the treatment was the dosage of gamma ray irradiation, i.e. 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 and 12 krad. In the second experiment, the treatment was the concentration of callus induced medium i.e. 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (0.5 and 1 mg/l) + chinetine (1, 3 and 5 mg/l). Randomized Block Design was used with 5 replications. Mini rose Romantica Meilandina (pink color) and Prince Meilandina (dark red color) was used as a source of plant material. The results showed that the irradiation dosage from 1 until 3 krad gave the best appearance compared with the other treatments. Considering the observance to plantlet in the same dosage, the color of the flower was changed from the natural color to white and red color. The combination of 0,5 mg/12,4- dichlorophenoxyacetic acid + 3 mg/1 chinetine was the best medium to the callus growth.

Kata kunci/ key words: Mawar mini/ mini rose, sinar gamma/gamma-ray, iradiasi/irradiation, keragaman genetik/ genetic variation, kultur *in-vitro* *in-vitro* culture.

PENDAHULUAN

Mawar (*Rosa hybrida* L.) yang banyak ditanam di Indonesia merupakan hasil introduksi dan sampai saat ini bibit mawar kultivar baru masih didatangkan dari luar negeri. Kultivar tersebut dilindungi oleh "Breeder's Right", sehingga bila ingin menyebarluaskan atau memperbanyak harus membayar royalti. Pembentukan kultivar baru melalui persilangan memerlukan persiapan seperti suhu yang konstan pada siang dan malam hari yaitu 18 °C dan kelembaban udara sekitar 70%. Untuk saat ini, kondisi tersebut sulit dicapai karena memerlukan kondisi rumah kaca yang betul-betul terkontrol. Salah satu teknologi alternatif untuk mendapatkan genotipa-genotipa baru yaitu melalui kultur *in-vitro*.

Keragaman genetik melalui kultur *in-vitro* dapat dilakukan antara lain melalui keragaman somaklonal, dan telah banyak diterapkan pada berbagai tanaman bias. Dengan keragaman somaklonal dapat diperoleh keuntungan antara lain sifat baru yang ditimbulkan tidak ditemukan pada "gene pool" yang ada, disamping itu perubahan yang diperoleh dapat memperbaiki penampilan.

Keragaman genetik melalui variasi somaklonal dapat dicapai pada fase yang tak berdiferensiasi yang relatif panjang (Evans dan Sharp, 1986). Pada tanaman krisan diperoleh keragaman yang tinggi bila kultur yang digunakan berasal dari kalus. Keragaman pada kultur *in-vitro* dapat ditingkatkan dengan pemberian mutagen baik secara fisik antara lain iradiasi sinar gamma maupun kimiawi yaitu ethyl methane sulphonate (EMS), diethyl methane sulphonate (DEMS). Radiasi dapat mengakibatkan terjadinya perubahan dalam komposisi basa dan menginduksi perubahan struktur dan jumlah kromosom. Menurut Gimelli *et al.* (1993), kombinasi kultur *in-vitro* dengan pemberian mutagen (baik fisik maupun kimia) merupakan metoda yang menjanjikan pada program perbaikan tanaman.

Keragaman somaklonal melalui kultur *in-vitro* dapat dipengaruhi antara lain zat pengatur tumbuh terutama yang sintetis. Diantara zat pengatur tumbuh tersebut, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) banyak dilaporkan dapat menyebabkan terjadinya perubahan sifat genetik. Induksi kalus

pada berbagai spesies umumnya digunakan auksin, 2,4-D yang dikombinasikan dengan jenis sitokinin yaitu benzyl adenin (BA) atau kinetin. Keragaman tanaman dari kultur kalus yang menggunakan 2,4-D karena terganggunya replikasi dioxiribonucleid acid (DNA) dan mitosis (Bayli, 1980).

Berbagai hasil penelitian dengan menggunakan metoda somaklonal telah dilakukan pada *Petunia* sp (Pahan, 1987), gerbera (Prasetyorini, 1991), krisan (Broertjes, 1966) dan berbagai tanaman bias lainnya. Larkin (1987) mendapatkan keragaman sebesar 43 % pada tanaman *Begonia lisinalis* yang dicirikan pada keragaman wama, ukuran, bentuk dan bunga. Walter dan Sauer dalam Ibrahim *et al.* (1998) melaporkan bahwa kultur *in-vitro* pada beberapa tanaman bias yang diberi perlakuan iradiasi telah menghasilkan bunga yang mengalami mutasi baik dari warna, ukuran dan jumlah petal. Selanjutnya Ibrahim *et al.*, (1998) telah melakukan aplikasi iradiasi pada tanaman mawar secara *in-vitro* dengan dosis 25, 50 dan 100 Gy. Hasilnya menunjukkan bahwa terjadi perbedaan yang nyata terhadap pembentukan mata tunas dibandingkan dengan kontrol. Dengan demikian metoda keragaman somaklonal pada kultur *in-vitro* mempunyai potensi dan prospek yang baik untuk mendapatkan genotipa baru dengan sifat yang menarik.

Dari penelitian diharapkan bahwa kombinasi dengan iradiasi sinar gamma dengan kultur *in-vitro* dapat merubah sifat genetik tanaman mawar mini yang diekspresikan pada perubahan warna bunga. Kombinasi kinetin dengan auksin 2,4-D pada konsentrasi tertentu dapat meningkatkan laju pertumbuhan kalus dengan warna kalus yang hijau.

Penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan keragaman genetik pada tanaman mawar mini dengan perubahan warna dan kelopak bunga yang tetap dipertahankan sampai generasi ketiga.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Inlithi Cipanas dan Balitbio Bogor dari April 1999 sampai Maret 2000. Mawar mini yang digunakan untuk penelitian ini adalah varietas Romantica Meilandina ("pink"Vmerah muda) dan Prince Meilandina ("dark red"Vmerah tua). Radiasi dilakukan terhadap biakan yang berupa tunas *in-vitro* dan kalus. Untuk produksi kalus digunakan eksplan dari biakan *in-vitro*. Untuk mendapatkan biakan *in-vitro* yang jumlahnya memadai maka eksplan batang dengan nodus tunggal (ukuran 1 - 1,5 cm) ditanam pada media Murashige and Skoog (MS) + BA (0,5 mg/l) dan diberi senyawa lain (organik atau anorganik) untuk mengurangi masalah penguningan yang cepat yang umumnya dijumpai pada tanaman tahunan berkayu. Untuk lebih memacu pertumbuhan biakan maka tunas yang telah tumbuh disubkultur berulang. Percobaan terdiri dari dua tahap yang berurutan yaitu:

Tahap 1: Kalus diinduksi dari nodus tunggal mawar *in-vitro* dengan perlakuan: MS + 2,4-D (0,5; 1 mg/l) kombinasi dengan Kinetin (1, 3, 5 mg/l). Kalus yang terbentuk kemudian disubkultur kembali pada formulasi media yang terbaik pada percobaan sebelumnya. Setelah diperoleh kalus yang embrionik kemudian diberi perlakuan iradiasi.

Tahap 2: Mata tunas terminal atau lateral yang berasal dari biakan *in-vitro* yang telah mengalami subkultur berulang (lebih dari 3 kali) diiradiasi dengan sinar gamma 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 dan 12 krad. Rancangan yang digunakan adalah Rancangan acak lengkap dengan 5 ulangan.

Variabel yang diamati adalah jumlah tunas dan daun, penampakan visual eksplan, diameter kalus, warna bunga, warna bunga, jumlah kelopak dan peningkatan keragaman genetik khususnya dilihat dari jumlah kelopak bunga.

Untuk mengetahui peningkatan keragaman tersebut dihitung dengan rumus:

$$\frac{\text{jumlah kelopak setelah radiasi} - \text{jumlah kelopak tidak iradiasi}}{\text{jumlah kelopak tidak iradiasi}} \times 100 \%$$

HASIL

Dari hasil pengamatan terhadap pertumbuhan eksplan mawar mini varietas *Romantica Meilandina* dan *Prince Meilandina* yang telah diiradiasi dengan sinar gamma 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, dan 12 krad menunjukkan adanya perbedaan yang nyata dibanding kontrol (Tabel 1).

Pada Tabel 1 terlihat bahwa pertumbuhan eksplan umumnya menjadi lebih lambat karena pengaruh iradiasi sinar gamma pada kedua varietas yang digunakan. Semakin tinggi dosis iradiasi maka pertumbuhan eksplan cenderung makin terhambat. Untuk varietas *Romantica* jumlah tunas paling banyak yaitu 6,6 berasal dari kultur yang tidak diiradiasi (kontrol). Jumlah tunas antara dosis iradiasi 1 dan 2 krad tidak berbeda nyata satu sama lain. Pembentukan tunas semakin menurun dengan meningkatnya dosis iradiasi dari 3 krad sampai dengan 12 krad. Hal yang sama dengan varietas *Prince* pada kontrol jumlah tunasnya 4,4 tidak berbeda nyata dengan dosis iradiasi 1 krad.

Untuk parameter lainnya yaitu jumlah daun mempunyai pola yang sama dengan jumlah tunas. Daun paling banyak terbentuk dari biakan yang tidak diiradiasi dan jumlahnya menurun mulai dari dosis iradiasi 4 krad. Berbeda dengan *Romantica*, pada *Prince* dosis iradiasi 1, 2 dan 3 krad jumlah daunnya meningkat.

Dari pengamatan visual yang dilakukan, terlihat adanya kemampuan eksplan untuk berbunga saat masih dalam botol (Tabel 2). Kemampuan berbunga paling banyak yaitu 62,2 % berasal dari eksplan yang tidak diiradiasi (kontrol). Keadaan ini dapat terjadi karena sel-sel bakal bunga yang terdapat pada daerah meristem tidak terganggu oleh adanya iradiasi. Pada kedua varietas, semakin tinggi

dosis iradiasi maka semakin menurun kemampuan biakan untuk berbunga dalam botol (Tabel 2).

Untuk *Romantica* dosis 12 krad, biakan tidak mampu berbunga sedangkan untuk *Prince* mulai dosis 10 krad biakannya sudah tidak dapat berbunga. Kemampuan berbunga selain karena adanya pengaruh iradiasi dapat pula dipengaruhi oleh formulasi media yang digunakan. Untuk kontrol pada varietas *Romantica* persentase berbunga mencapai 62,2 %, sedangkan varietas *Prince* hanya 46,7 %. Kondisi ini menunjukkan pula adanya pengaruh dari sifat genotipa. Warna bunga yang ditimbulkan dari eksplan *Romantica Meilandina* yang diiradiasi 1 sampai 10 krad dari warna pink berubah menjadi warna putih. Untuk eksplan *Prince Meilandina* yang diiradiasi 1 sampai 8 krad dari merah tua berubah menjadi merah agak muda.

Disamping perubahan warna terjadi pula perbedaan pada jumlah kelopak. Berbeda dengan organ vegetatif yaitu jumlah tunas dan jumlah daun (Tabel 1). Pada varietas *Romantica* untuk organ generatif adanya iradiasi dapat meningkatkan pembentukan jumlah kelopak bunga. Jumlah kelopak bunga paling sedikit yaitu 12 berasal dari biakan kontrol, sedangkan pada biakan yang diiradiasi 3 serta 1 dan 2 krad meningkat lebih banyak.

Bahkan pada 8 dan 10 krad jumlah kelopaknya 14 helai, sedikit lebih banyak dari pada kontrol. Untuk *Prince* peningkatan jumlah kelopak karena iradiasi tidak sebanyak seperti pada *Romantica*. Dosis 4, 6 dan 8 krad jumlah kelopaknya paling sedikit yaitu 8 sedangkan pada kontrol sebanyak 10. Jumlah kelopak meningkat menjadi 14 dan 12 berasal dari dosis iradiasi 1, 2 dan 3 krad. Hal tersebut lebih jelas terlihat dalam peningkatan keragaman jumlah kelopak bunga dibanding dengan kontrol (Tabel 2). Pada varietas *Romantica Meilandina* peningkatan keragaman tersebut mencapai 116 % pada dosis 1 dan 2 krad, sedangkan pada *Prince Meilandina* mencapai 40 % pada dosis 1 krad.

Perubahan wama tetap terjadi walaupun tunas disubkultur pada media baru (Gambar 1). Walaupun demikian perubahan warna dan jumlah kelopak bunga karena iradiasi pada kultur *in-vitro* yang terekspresi mulai dari eksplan dalam botol perlu diuji lebih lanjut sampai tanaman berbunga di rumah kaca. Keadaan tersebut untuk mengetahui kestabilan perubahan sifat genotipe yang ditimbulkan karena keragaman somaklonal dan mutagen fisik.

Keragaman genetik yang ditimbulkan (perubahan warna dan kelopak bunga) tetap

dipertahankan setelah biakan diperbanyak secara vegetatif berulang kali. Kondisi tersebut menunjukkan bahwa perubahan sifat genetik diwariskan pada turunannya (sampai dengan generasi ketiga).

Untuk meningkatkan keragaman genetik telah pula dilakukan melalui kalus. Hasil penelitian pada Tabel 3 menunjukkan adanya perbedaan pertumbuhan kalus karena perlakuan formulasi media. Kalus paling cepat pertumbuhannya pada media MS + kinetin 3 mg/l + 2,4-D 0,5 mg/l dan paling lambat pada media MS + kinetin 5 mg/l + 2,4-D 1,0 mg/l.

Tabel 1. Pengaruh iradiasi terhadap jumlah tunas dan jumlah daun mawar mini (*Rosa hybrida L.*), umur 4 bulan.

Perlakuan (Dosis iradiasi)	Jumlah tunas		Jumlah daun	
	Roman tica	Prince	Romantica	Prince
a. Kontrol	6,6 a	4,4 be	23,8 a	16,4 cde
b. 1 krad	4,6 b	3,6 cd	19,0 abc	21,4 abc
c. 2 krad	4,4 b	3,4 de	15,8 cde	19,6 bed
d. 3 krad	2,6 ef	2,0 fe	12,6 def	17,6 bed
e. 4 krad	2,0 fg	3,0 fg	9,6 fg	13,0 ef
f. 6 krad	1,0 g	1,4 g	6,4 g	8,4 fg
g. 8 krad	2,0 fg	1,2 g	5,2 g	8,6 fg
h. 10 krad	1,8 fg	1,4 g	6,2 g	5,8 g
i. 12 krad	2,0 fg	1,2 g	8,2 g	5,4 g

Keterangan: angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata (95%) menurut uji Duncan



Gambar 1. Keragaman yang ditimbulkan pada warna dan petal bunga mawar mini varietas Prince Meilandina dan Romantica Meilandina (bawah) dibandingkan dengan tanaman induk (atas).

Tabel 2. Keragaman yang ditimbulkan karena iradiasi pada kultur *in-vitro* 2 varietas mawar mini pada generasi ketiga

Dosis iradiasi (krad)	Keragaman bunga							
	Romantica Meilandina				Prince Meilandina			
	eb (%)	warna	jk	pkkb (%)	eb (%)	warna	jk	pkkb (%)
0	62,2	pink	12	-	46,7	merah tua	10	0
1	44,4	putih	26	116,6	33,3	merah agak muda	14	40
2	31,1	putih	26	116,6	22,2	merah agak muda	12	20
3	26,7	putih	24	100,0	15,5	merah agak muda	12	20
4	17,8	putih	20	66,6	8,9	merah agak muda	8	0
6	11,1	putih	20	66,6	8,9	merah agak muda	8	0
8	6,7	putih	14	16,7	2,2	merah agak muda	8	0
10	4,4	putih	14	16,7	0	-	-	-
12	0	-	-	-	0	-	-	-

Keterangan : eb = persentase eksplan berbunga
 jk = jumlah kelopak
 pkkb = peningkatan keragaman kelopak bunga

Tabel 3. Pengaruh kombinasi media induksi kalus terhadap diameter kalus

Perlakuan zat pengatur tumbuh	Diameter kalus (cm)	Warna kalus
ki 1 + 2,4-D 0,5	0,52 cd	hijau kekuningan
ki 1 + 2,4-D 1,0	1,00 b	hijau kekuningan
ki 3 + 2,4-D 0,5	1,46 a	hijau
ki 3 + 2,4-D 1,0	0,32 d	hijau kekuningan
ki 5 + 2,4-D 0,5	0,38 cd	hijau kekuningan
ki 5 + 2,4-D 1,0	0,62 c	hijau kekuningan

Keterangan : angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata (99%) menurut uji Duncan; ki = kinetin ;
 2,4 -D = 2,4-dichlorophenoxyacetic acid

PEMBAHASAN

Peningkatan dosis iradiasi cenderung menghambat pertumbuhan dari eksplan. Kondisi ini dimungkinkan karena adanya penurunan kemampuan sekumpulan sel pada daerah meristem yang dapat menyebabkan meningkatnya aktifitas sekumpulan sel lainnya (Ichikawa dan Ikosima, 1967). Terganggunya pertumbuhan biakan karena adanya kerusakan selular pada meristem yang menghasilkan organ tanaman. Kerusakan tersebut antara lain dapat menyebabkan menurunnya kandungan indole acetic acid (IAA) karena penghambatan enzim indolacetaldehyde dehidrogenase yang sangat radio sensitif (Moore, 1979).

Sampai dengan dosis iradiasi 3 krad secara visual penampilan biakan tetap tegar dan hijau. Untuk dosis iradiasi 4 krad ke atas menunjukkan adanya tunas dan daun dengan gejala kekuningan terutama pada dosis yang paling tinggi (12 krad).

Keadaan tersebut sesuai dengan pendapat Sigurbjornsson (1977) bahwa iradiasi dapat menyebabkan pembelahan sel menjadi terhambat yang selanjutnya dapat menghambat pembentukan organ. Pada umumnya jaringan tanaman sebagian besar mengandung air, sehingga apabila diiradiasi maka paling banyak terkena iradiasi adalah air yang kemudian terurai menjadi H_2O^+ dan e^- . Pada reaksi selanjutnya akan membentuk radikal bebas yang kemudian bergabung menghasilkan racun peroksida. Apabila peroksida maupun radikal-radikal bebas bereaksi dengan molekul lain akan membentuk suatu senyawa yang akan mempengaruhi sistem biologi tanaman. Kematian sel tanaman akibat iradiasi bisa secara langsung yaitu kerusakan DNA, ataupun tak langsung yaitu adanya pengaruh toksik dari radikal bebas ion H_2O_2 dan OH^- yang dihasilkan dari radiolisis air (Nikam dan Hilmy, 1987). Kematian sel-sel tanaman tersebut kemungkinan juga

berpengaruh terhadap adanya perubahan warna pada daun. Hal itu sesuai dengan pendapat Herawati dan Setiamihardja (2000) bahwa perlakuan iradiasi dapat menyebabkan perubahan warna pada tanaman baik pada daun maupun batang.

Dosis iradiasi yang tinggi menyebabkan kerusakan pada organ tanaman terutama pada daerah mata tunas terminal dan lateral yang menunjukkan warna kehitaman. Apabila gejala tersebut timbul pada organ yang aktif melakukan proses mitosis maka kultur sulit untuk melakukan proses pemulihan diri terutama bila daun dan tunasnya menguning. Selanjutnya Ibrahim *et al.* (1998) juga melaporkan hasil yang sama bahwa makin tinggi dosis iradiasi yang digunakan pada eksplan mawar potong maka persentase kematiannya makin tinggi. Sedangkan menurut Herawati dan Setiamihardja (2000) rentang dosis iradiasi pada tanaman berkayu khususnya tanaman mawar adalah 2 sampai 10 krad.

Terjadinya perubahan pada jumlah kelopak dan warna bunga akibat radiasi menurut Broertjes dan van Harten (1978) karena mutasi dapat terjadi pada sel-sel somatik dan dapat terekspresi bila terjadi pada inisial sel apikal dan akan membentuk suatu sektor yang stabil. Selain itu ekspresi mutasi ditentukan juga oleh posisi keluarnya bakal bunga, sehingga perubahan akan terlihat pada bakal bunga yang terbentuk dari jaringan termutasi (Hartman dan Kester, 1983). Selanjutnya Ismachin (1988) menyatakan bahwa perubahan warna bunga dapat bersifat khimera atau perubahan seluruhnya. Perlakuan iradiasi banyak dilaporkan dapat menyebabkan perubahan warna bunga antara lain pada tanaman *Dianthus* (Buiatti *et al.*, 1985) dan *Petunia* (Pahan, 1987).

Selanjutnya hasil pengamatan pada kombinasi perlakuan untuk meningkatkan keragaman genetik melalui kalus sejalan dengan penelitian Darliah *et al.* (1998) dan Hameed *et al.* (1993). Peningkatan konsentrasi zat pengatur tumbuh baik kinetin maupun 2,4-D tidak mempercepat laju pertumbuhan kalus bahkan menghambat proses

dediferensiasi. Untuk kegiatan selanjutnya, kalus yang terbentuk dari setiap formulasi media akan disubkultur pada media baru untuk diregenerasi membentuk tunas adventif. Apabila sistem regenerasi telah dikuasai maka penelitian akan dilanjutkan dengan mengiradiasi pada kalus yang bersifat embrionik.

KESIMPULAN

Dari uraian di atas dapat disimpulkan :

1. Semakin meningkat dosis iradiasi maka semakin terhambat pertumbuhan eksplan.

Dosis iradiasi sampai dengan 3 krad biakan masih menunjukkan penampilan yang tegar dengan tunas dan daun yang hijau.

Radiasi dapat menimbulkan keragaman genetik yang terekspresi pada warna dan jumlah kelopak bunga dari biakan *in-vitro*. Keragaman pada warna bunga yang ditimbulkan yaitu pada Prince dari merah tua menjadi merah muda dan pada Romantica dari pink menjadi putih.

Perubahan warna bunga tersebut tetap dipertahankan setelah dilakukan sub kultur berulang sampai generasi vegetatif ketiga.

2. Laju pertumbuhan kalus paling cepat berasal dari media MS yang diberi kinetin 3 mg/l + 2,4-D 0.5 mg/l. Sistem regenerasi kalus akan dilakukan setelah diperoleh kalus yang bersifat embriogenik

DAFTAR PUSTAKA

- Bayli IS 1980.** Chromosomal Variation in Plant Tissue Culture. *International Review of Cytology (Supplement)* **11** A, 113-114.
- Broertjes C. 1966.** Mutation Breeding of *Chrysanthemum*. *Euphytica* **15**, 156-162.
- Buiatti DF, Gimelli F, Ventura R and Berjoni. 1985.** Interclonal Variability by *In-Vivo* and *In-Vitro* Propagation in Vegetatively Propagated Plant. The Carnation. Dalam: Somaclonal Variation and Crop Improvement. Proceeding of A Seminar in the CEC Program Cordination of Research and Plant Protein Improvement. JS Semal (Ed.). Martinus Nijhoff. Dordrecht. Him. 251-256.

- Darliah, Syafni, Handayati W dan Purnamaningsih R. 1998.** Regenerasi Jaringan Sebagai Studi Awal untuk Perbaikan Tanaman Melati. *Risalah Seminar Nasional Tanaman Hias. Monograf.* Balithi. Jakarta. Him. 62-68.
- Evans, DA and Sharp WH. 1983.** Single Gen Mutation in Tomato Plants Regeneration from Tissue Culture. *Science* **221**,949-951.
- Gaul, H. 1977.** Mutagen Effect in the First Generation after Seed Treatment. Plant Injury And Lethality. *Manual of Mutation Breeding. Technical Report Series No. 119*, IAEA, Vienna. Him. 15-20.
- Gimelli F, Ventura R, Breno C and Parodi A. 1993.** Variability Induced by *In-Vitro* Culture and X-Rays and Comparison with Sexual Reproduction in a Vegetatively Propagated Plant the *marguerite* (*Argyranthemum frutescens* L.) Schultz-Bip. Dalam: *Creating Genetic Variation in Ornamentals.* T. Schiva and A. Mercuri (Eds.)- *Proceeding of the XIth symposium of the European Association for Research Plant Breeding.* Instituto Sperimentale per la Floricoltura, Sanremo, Italy. Him. 105-116.
- Hameed, Zaheer S, Khan and Akram. 1993.** Callus Cultures of *Rosa hybrida* Cultivars. *Pakistan Journal of Botany* **25** (2), 193—198.
- Hartmann HT and Kester DE. 1983.** *Plant Propagation. Principles and Practices.* Prentice Hall. Englewood Cliffs, New Jersey.
- Herawati T dan Setiamihardja R. 2000.** *Pemuliaan Tanaman Lanjutan. Diktat.* Fakultas Pertanian Universitas Padjadjaran. Bandung.
- Ibrahim R, Mondelaers W and Pierre CD. 1998.** Effect of X-Irradiation on Adventitious Bud Regeneration from *In-Vitro* Leaf Explants of *Rosa hybrida*. *Plant Cell, Tissue and Culture* **54**, 37 - 44.
- Ichikawa S and Ikushimo Y. 1967.** A Development Study of Diploid Oats by Means of Radiation Induced Somatic Mutation. *Radiation of Botanical* **7**, 205-215.
- Imachin M. 1988.** *Pemuliaan Tanaman dengan Mutasi Buatan.* Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi, Badan Tenaga Atom Nasional. Jakarta.
- Larkin P.J. 1987.** Somaclonal Variation: History, Method and Meaning. *Iowa State Journal of Research* **61** (4), 393 - 434.
- Nikham dan Hilmy N. 1987.** Efek Kombinasi Iradiasi dan Panas pada Bakteri *Escherichia coli* dan *Sarcina lutea* dalam Kondisi Kering. *Batan* **20** (2), 30-38.
- Pahan, 1987.** Pengaruh Radiasi Sinar Gamma pada Pucuk *In-Vitro* terhadap Keragaman Genetik Petunia (*Petunia hybrid* Vilm.). *Karya Ilmiah.* Jurusan Budidaya Pertanian-Fakultas Pertanian. IPB, Bogor.
- Pasetyorini. 1991.** Pengaruh Radiasi Sinar Gamma dan Jenis Eksplan terhadap Keragaman Somaklonal Pada Tanaman Gerbera. *Thesis.* Fakultas Pasca Sarjana. IPB, Bogor.
- Sigurbjornson B. 1977.** Introduction: Mutation in Plant Breeding Programmes. *Manual on Mutation Breeding. Technical Report Series No. 119.* IAEA, Vienna. Him. 1-7.