

## Pengaruh Ficoll dan Pra-perlakuan Stres terhadap Embriogenesis Somatik pada Kultur Antera *Swainsona formosa*

ZULKARNAIN

Fakultas Pertanian, Universitas Jambi, Kampus Pinang Masak, Mendalo, Jambi 36361

Phone/fax: +62 741 582781, Email: doktor\_zulkarnain@unja.ac.id

One of the impediments to the commercialisation of Sturt's desert pea (*Swainsona formosa*) as a cut flower is the release of large amounts of pollen grains during anther dehiscence. These pollen grains may stain the petals and so reduce the quality of the flowers. In addition, self-pollination can occur during transportation causing flowers to degenerate quickly. This project was undertaken with the objective to investigate strategies to overcome such problems through an *in vitro* approach by anther culture. The objective of the project was to induce the regeneration of pollenless haploid plants. Of the variables tested, pre-treating the anthers with mannitol starvation at 4°C followed by introduction to a double-phase medium supplemented with Ficoll-400™ were found to enhance callus proliferation. Embryogenic callus was produced and embryogenesis was detected but these embryos did not originate from microspores. Instead, the embryos grew from sporophytic tissue of the anther wall. The embryos failed to develop further when subcultured to root and shoot induction medium due to a high frequency of hyperhydration. Morphogenesis was detected but shoots and roots developed poorly.

### PENDAHULUAN

*Swainsona formosa* (G. Don) J. Thompson (famili Fabaceae), adalah salah satu tanaman hias asli Australia yang sangat indah yang juga merupakan emblem bagi negara bagian South Australia (Kirby 1996a). Bunganya yang menyerupai bendera dan berukuran besar dengan warna merah menyala (putih hingga ungu tua pada populasi liar) menjadikan tanaman ini sebagai salah satu tanaman hias bunga yang sangat menarik (Taji 1997).

Nilai ekonomis *S. formosa* terletak pada potensi pemanfaatannya sebagai tanaman gantung, bunga pot ataupun sebagai bunga potong (Williams & Taji 1991; Kirby 1996a; 1996b). Tanaman ini tidak hanya diminati oleh pasar bunga potong di dalam negeri tetapi juga diekspor ke luar negeri, antara lain ke Jepang (Barth & Bennel 1989). Komersialisasi *S. formosa* sebagai bunga potong dihadapkan pada kendala tingginya produksi serbuk sari di dalam bunga dan lunaknya mahkota yang menyebabkan bunga mudah sekali mengalami kerusakan (Barth 1990). Mutu bunga dapat berkurang karena bercak-bercak yang disebabkan oleh serbuk sari yang dikeluarkan oleh antera selama dalam proses pengangkutan. Selanjutnya Kirby (1996b) menyatakan bahwa selama pengangkutan penyerbukan sendiri dan pembuahan pada bunga *S. formosa* dapat terjadi sehingga bunga akan mengalami degenerasi dengan cepat.

Meskipun androgenesis pada sejumlah spesies, seperti gandum (Trottier *et al.* 1993) dan barley (Trottier *et al.* 1993; Cistué *et al.* 1998) berhasil diinduksi pada media cair, media padat juga telah terbukti berhasil meregenerasikan tanaman dari mikrospora pada kultur antera padi (Bishnoi *et al.* 2000). Pilihan atas jenis media kultur bukanlah satu-satunya faktor yang mempengaruhi keberhasilan androgenesis. Pra-perlakuan antera dengan suhu rendah pada 4°C telah diketahui berpengaruh baik pada anggur (Bensaad & Hennerty 1996), rye (Immonen & Anttila 1999) dan triticale (Immonen & Robinson 2000). Pra-perlakuan antera dengan medium starvasi manitol juga terbukti efektif untuk menginduksi androgenesis pada gandum (Indrianto *et al.* 1999). Pra-

perlakuan ini sangat penting untuk menghambat perkembangan gametofitik dan memicu embriogenesis di dalam mikrospora yang kompeten (Touraev *et al.* 1997).

Cara lain untuk memperbaiki regenerasi tanaman dari mikrospora adalah menggunakan kultur cair yang dilengkapi dengan suatu senyawa pengapung, Ficoll-400™ (atau Ficoll), guna menghindarkan tenggelamnya antera atau kalus (Trottier *et al.* 1993). Kondisi anaerobik pada media cair diyakini dapat menyebabkan berkurangnya regenerasi tanaman karena antera atau kalus berkembang di bawah permukaan medium. Dari beberapa penelitian terhadap spesies yang berbeda diperoleh hasil yang tidak konsisten. Pada gandum, Zhou *et al.* (1992) menemukan bahwa Ficoll nyata mengurangi produksi kalus tetapi meningkatkan persentase kalus yang merenerasikan tanaman serta rasio tanaman hijau:albino. Immonen & Robinson (2000) melaporkan bahwa Ficoll meningkatkan induksi embriogenesis pada triticale kultivar Bor 96151 sebesar 3 hingga 4 kali lipat, tetapi pada kultivar Modul dan Wintri induksi embriogenesis tetap sama atau bahkan berkurang. Secara umum, Ficoll dan pra-perlakuan antera dengan suhu rendah dapat memperbaiki produksi tanaman hijau pada triticale (Immonen & Robinson 2000).

Tujuan dari penelitian adalah untuk mengetahui pengaruh pra-perlakuan stres berupa starvasi manitol dan starvasi air pada suhu 4°C selama 8 hari dalam keadaan gelap total dan pengaruh konsentrasi Ficoll terhadap induksi embriogenesis pada kultur antera *S. formosa*.

### BAHAN DAN METODE

**Bahan tanaman.** Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari benih yang diperoleh dari South Australia dan diperbanyak serta dipelihara secara rutin di rumah kaca. *Voucher specimen* NE 79130 disimpan di NCW Beadle Herbarium, University of New England.

**Induksi kalus.** Untuk induksi kalus, bahan tanam-an yang digunakan adalah antera yang mengandung mikrospora pada tahap perkembangan uninukleat, yang

diperoleh dari tunas bunga berukuran 15,0 – 15,5 mm (Zulkarnain *et al.* 2002). Tangkai bunga sepanjang kira-kira 5,0 cm diikutsertakan di dalam isolasi tunas bunga dari tanaman donor. Tunas-tunas ini ditempatkan di dalam botol vial berisi air suling steril atau medium starvasi steril dengan bagian tangkai bunga yang dipotong berada di dalam larutan. Botol-botol vial selanjutnya disimpan pada suhu 4°C dalam keadaan gelap total selama 8 hari. Medium starvasi disiapkan menurut Kyo and Harada (1986) yang mengandung KCl 1,49 g L<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub> 0,12 g L<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub> 0,11 g L<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,14 g L<sup>-1</sup> dan manitol 54,7 g L<sup>-1</sup> pada pH 7,0. Sedangkan medium starvasi air terdiri atas air suling steril tanpa tambahan senyawa kimia.

Setelah diberikan pra-perlakuan, tunas-tunas bunga direndam di dalam alkohol 70% selama lebih-kurang 10 detik untuk sterilisasi permukaan, lalu dibilas dengan air suling steril dan dikeringkan pada sehelai kertas saring (Whatman No. 1) steril. Sepal dan petal dibuang dengan hati-hati menggunakan pinset dan skalpel steril, sehingga bagian dalam tunas bunga terlihat dengan jelas. Antera selanjutnya dipotong dari filamen dan 10 antera yang terdapat di dalam satu tunas bunga ditanamkan di dalam satu cawan Petri. Medium kultur yang digunakan adalah medium dengan komposisi B5 (Gamborg *et al.* 1968) padat yang dilengkapi dengan vitamin, sukrosa 2% dan IBA 49.3 µM + zeatin 4.61 µM. Ficoll dengan konsentrasi 0, 5, 10, 15 dan 20% (w/v) diberikan dalam bentuk terlarut di dalam medium B5 cair dan ditetaskan pada antera yang telah terlebih dahulu diinkubasikan pada medium padat di dalam cawan Petri, sehingga terbentuk medium fase ganda (*double phase medium*). Selanjutnya kultur diinkubasikan pada suhu 25 ± 1°C dalam keadaan gelap total selama 4 minggu dan diikuti oleh subkultur ke medium segar dan ditempatkan di bawah cahaya putih dengan intensitas 50 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> dan fotoperiodisitas 16 jam per hari untuk induksi kalus.

**Induksi embriogenesis.** Kalus yang terbentuk disubkulturkan pada medium B5 padat yang dilengkapi dengan sukrosa 1% dan kinetin 4.63 µM untuk induksi embriogenesis. Selanjutnya kultur ditempatkan di bawah cahaya dengan intensitas 50 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> dan fotoperiodisitas 16 jam. Pengamatan terhadap embriogenesis somatik dilakukan selama 4 minggu. Embriogenesis somatik dievaluasi dengan menghitung pembentukan kalus yang embriogenik dan efisiensi embriogenik (jumlah embrio per eksplan) selanjutnya dapat dihitung.

Empat minggu kemudian embrio somatik dipindahkan ke medium tanpa zat pengatur tumbuh guna pendewasaan dan perkecambahan. Intensitas cahaya dan fotoperiodisitas yang diberikan sama dengan kondisi untuk induksi embriogenesis.

## HASIL

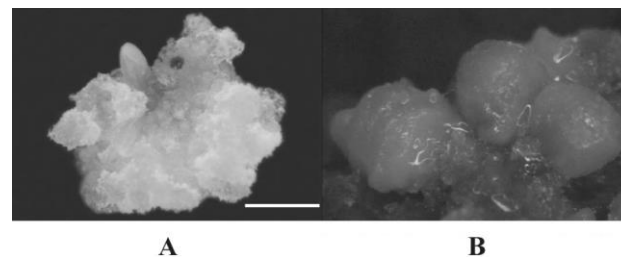
**Induksi kalus.** Pada Tabel 1 disajikan nilai rata-rata persentase antera yang membentuk kalus sebagai akibat pengaruh pra-perlakuan stress dan setelah dikulturkan pada medium fase ganda yang dilengkapi dengan Ficoll pada berbagai tingkat konsentrasi. Pro-liferasi kalus mulai terlihat dalam waktu dua minggu setelah inisiasi kultur. Setelah empat minggu masa kultur di dalam

kondisi gelap total, pra-perlakuan stress berupa starvasi manitol menghasilkan persentase antera membentuk kalus yang lebih tinggi daripada starvasi air, demikian juga perlakuan Ficoll 10% (w/v) yang menghasilkan persentase antera membentuk kalus lebih tinggi daripada konsentrasi lainnya. Pada tahap ini kalus yang terbentuk pada semua perlakuan memiliki karakteristik yang sama yaitu berwarna putih dengan tekstur yang kompak (Gambar 1A).

Tabel 1. Rata-rata persentase jumlah antera *S. formosa* yang membentuk kalus sebagai akibat pra-perlakuan stress dan pengaruh berbagai konsentrasi Ficoll.

Variabel yang diuji	Jumlah antera membentuk kalus (%)
Pra-perlakuan stress:	
starvasi manitol	53,5 ± 15,99
starvasi air	38,0 ± 18,81
Konsentrasi Ficoll (% w/v):	
0	45,0 ± 18,52
5	51,3 ± 25,32
10	56,3 ± 18,47
15	45,0 ± 11,95
20	31,3 ± 11,26

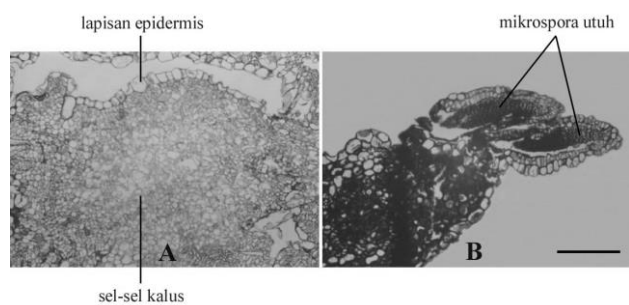
± simpangan baku



Gambar 1. A, kalus berwarna putih yang berproliferasi dari antera yang diberi pra-perlakuan starvasi manitol dan dikulturkan pada medium dengan Ficoll 10% (w/v) dalam keadaan gelap total; B, struktur globular yang tumbuh dari kalus A dan dikulturkan di bawah kondisi cahaya. Bar: A = 2,0 mm; B = 0,1 mm.

Setelah dikulturkan pada medium segar dengan komposisi yang sama seperti medium inisiasi dan ditempatkan di bawah kondisi cahaya dengan intensitas 50 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> dan fotoperiodisitas 16 jam per hari, kalus yang berasal dari antera yang diberi pra-perlakuan starvasi manitol dan dikulturkan pada medium fase ganda dengan Ficoll berangsur-angsur berubah menjadi putih kehijauan dengan tekstur yang remah. Setelah empat minggu subkultur, kalus tersebut memperlihatkan karakteristik embriogenik yang dicirikan oleh munculnya struktur berbentuk globular pada permukaan kalus (Gambar 1B), terutama pada kalus yang dikulturkan pada medium fase ganda dengan Ficoll 10% (w/v). Sementara itu kalus yang berasal dari antera yang diberi pra-perlakuan starvasi air juga berubah menjadi putih kehijauan, namun memiliki tekstur yang lebih kompak dan tidak memperlihatkan adanya sifat-sifat embriogenik.

Pengamatan histologi menunjukkan bahwa kalus berproliferasi dari jaringan sporofitik dinding antera sebelah dalam, yakni dari sel-sel endotesium, lapisan tengah dan tapetum (Gambar 2A), bukan dari mikro-spora (Gambar 2B). Hal ini memberikan petunjuk bahwa embrio yang terbentuk adalah embrio somatik.



Gambar 2. Pengamatan histologi terhadap proliferasi kalus dari kultur antera *S. formosa* setelah 4 minggu inisiasi kultur. A, proliferasi kalus dari jaringan dinding antera sebelah dalam; B, mikrospora yang tetap utuh. Bar: A = 100  $\mu$ m, B = 10  $\mu$ m.

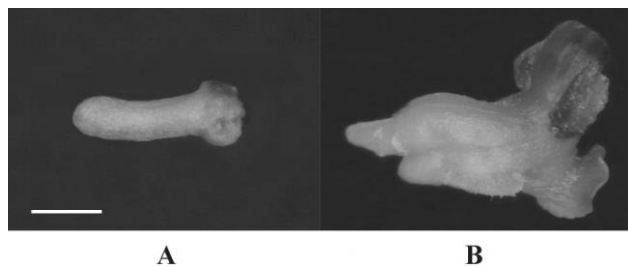
**Embriogenesis somatik.** Kalus embriogenik disubkulturkan pada medium yang dilengkapi dengan sukrosa 1% dan kinetin 4,63  $\mu$ M untuk induksi embriogenesis. Embrio terbentuk dalam waktu tiga minggu setelah subkultur. Pra-perlakuan starvasi manitol memberikan nilai rata-rata efisiensi embriogenik (jumlah embrio per eksplan) lebih tinggi dibandingkan dengan starvasi air. Sementara itu perlakuan Ficoll 10% (w/v) menghasilkan nilai rata-rata efisiensi embriogenik yang lebih tinggi dari pada kontrol, namun pada konsentrasi Ficoll di atas 10% (w/v) efisiensi embriogenik cenderung menurun, bahkan lebih rendah dari pada kontrol (Tabel 2).

Embrio somatik dengan tahap perkembangan torpedo (Gambar 3A) berkecambah ketika disubkulturkan pada medium yang dilengkapi dengan 1% sukrosa tanpa zat pengatur tumbuh. Namun demikian, kotiledonnya memperlihatkan gejala hiperhidrasi dan tidak berkembang normal. Sebagian embrio juga memperlihatkan gejala fasiasi (Gambar 3B).

Tabel 2. Rata-rata efisiensi embriogenik dari kalus yang berasal dari antera *S. formosa* sebagai akibat pra-perlakuan stres dan pengaruh berbagai konsentrasi Ficoll.

Variabel yang diuji	efisiensi embriogenik
Pra-perlakuan stress:	
starvasi manitol	1,22 $\pm$ 0,51
starvasi air	0,81 $\pm$ 0,58
Konsentrasi Ficoll (% w/v)	
0	0,83 $\pm$ 0,20
5	1,01 $\pm$ 0,53
10	1,62 $\pm$ 0,60
15	0,80 $\pm$ 0,56
20	0,66 $\pm$ 0,23

$\pm$  simpangan baku



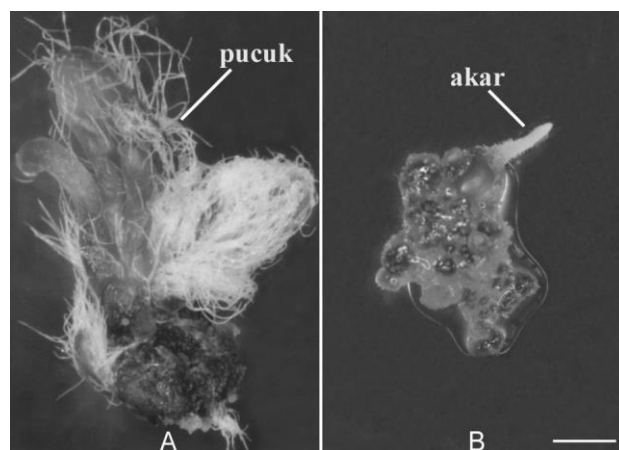
Gambar 3. Embriogenesis somatik pada kalus yang berasal dari antera yang diberi pra-perlakuan starvasi manitol dan dikulturkan pada medium fase ganda dengan Ficoll 10% (w/v). A, embrio pada tahap perkembangan torpedo; B, embrio dewasa dengan kotiledon yang mengalami hiperhidrasi dan fasiasi. Bar = 1 mm.

**Organogenesis.** Di samping embriogenesis somatik, pembentukan pucuk dan akar dari dalam massa kalus juga terjadi, terutama pada kultur yang diberi pra-perlakuan starvasi air dan pada perlakuan Ficoll 5% (w/v) (Tabel 3). Sepertihalnya embrio, pucuk-pucuk yang terbentuk juga mengalami hiperhidrasi (Gambar 4A). Sementara itu pembentukan akar dalam jumlah terbatas (rata-rata 1,5 per eksplan) hanya terjadi pada kalus yang berasal dari antera yang diberi pra-perlakuan starvasi air dan dikulturkan pada medium dengan Ficoll 15% (w/v) (Gambar 4B).

Tabel 3. Rata-rata jumlah pucuk yang terbentuk dari dalam massa kalus yang berasal dari antera *S. formosa* sebagai akibat pra-perlakuan stres dan pengaruh berbagai konsentrasi Ficoll.

Variabel yang diuji	Jumlah pucuk per kalus
Pra-perlakuan stress:	
starvasi manitol	2,00 $\pm$ 1,21
starvasi air	3,08 $\pm$ 1,62
Konsentrasi Ficoll (% w/v)	
0	2,25 $\pm$ 0,96
5	4,25 $\pm$ 1,71
10	3,40 $\pm$ 1,67
15	1,83 $\pm$ 0,75
20	1,40 $\pm$ 0,55

$\pm$  simpangan baku



Gambar 4. Organogenesis dari dalam massa kalus yang berasal dari antera yang diberi pra-perlakuan starvasi air dan dikulturkan pada medium fase ganda. A, dengan Ficoll 5% (w/v); B, dengan Ficoll 15% (w/v). Bar = 2 mm.

## PEMBAHASAN

Salah satu upaya untuk memperbaiki proliferasi kalus adalah dengan memanfaatkan teknik medium fase ganda yang dilengkapi dengan suatu senyawa pengapung, Ficoll. Dari hasil penelitian ini terungkap bahwa penggunaan Ficoll 10% (w/v) bersamaan dengan pra-perlakuan starvasi manitol dapat meningkatkan respon antera yang berupa pembentukan kalus. Penambahan Ficoll ke dalam medium kultur dapat memperbaiki berat jenis, visko-sitas dan osmolalitas medium (Zhou *et al.* 1992). Selain itu, pra-perlakuan antera berupa stres dengan starvasi manitol dapat menghentikan metabolisme normal dan jaringan tanaman akan memasuki lintasan metabolisme baru ketika dikulturkan dalam kondisi *in vitro* (Immonen & Anttila 1999). Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa perbaikan sifat-sifat medium yang dibarengi dengan pra-perlakuan starvasi manitol dapat meningkatkan proliferasi kalus pada kultur antera *S. formosa*.

Kecenderungan menunjukkan bahwa pada kedua perlakuan starvasi, embriogenesis maksimum diperoleh pada pra-perlakuan starvasi manitol dan perlakuan Ficoll 10% (w/v). Pemberian Ficoll pada medium bersamaan dengan starvasi manitol merupakan cara yang efektif untuk memperbaiki regenerasi tanaman pada kultur antera triticales ( $\times$  *Triticosecale*) (Immonen & Robinson 2000).

Hasil pada penelitian ini menunjukkan bahwa pra-perlakuan starvasi manitol dan penggunaan Ficoll di dalam medium penting untuk menginduksi embriogenesis somatik dari kalus yang berasal dari jaringan sporofitik antera *S. formosa*. Namun perlakuan ini tampaknya belum cukup untuk menginduksi respon androgenik dari mikrospora yang berada di dalam antera. Sama halnya dengan hasil penelitian Sudharsan & AboEl-Nil (2002), embriogenesis somatik pada *S. formosa* dihadapkan pada permasalahan hiperhidrasi dan pertumbuhan embrio yang terbatas. Oleh karenanya perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai faktor-faktor yang mempengaruhi perkembangan embrio guna mendapatkan tanaman lengkap yang normal.

Immonen dan Antilla (1999) menyatakan bahwa di bawah kondisi stres metabolisme normal pada tanaman terhenti, dan setelah periode waktu tertentu, jaringan yang tengah beristirahat mulai lagi melangsungkan metabolismenya dengan lintasan yang baru apabila dihadapkan pada kondisi lingkungan yang induktif. Namun demikian, respon ini tampaknya tergantung pada spesies tanaman. Pada kultur antera tembakau (Kyo & Harada 1986) dan gandum (Touraev *et al.* 1996), pra-perlakuan stres terbukti penting dalam memblokir perkembangan gametofitik dan memicu embriogenesis mikrospora. Akan tetapi pada spesies yang rekalsitran, pra-perlakuan stres saja tampaknya belum memadai untuk menginduksi embriogenesis mikrospora (Immonen & Robinson 2000). Menurut Van Doorne *et al.* (1995), sifat rekalsitran pada jaringan tanaman legum (*S. formosa* termasuk di dalamnya) telah mengakibatkan sulitnya meregenerasikan tanaman di bawah kondisi *in vitro*.

Dari penelitian ini diketahui bahwa baik pra-perlakuan stres maupun perlakuan Ficoll yang diuji belum mampu menginduksi androgenesis dari mikrospora yang terdapat di dalam anter. Hal ini kemungkinan sebagai akibat sifat jaringan *S. formosa* yang rekalsitran. Namun demikian, dari percobaan ini terungkap bahwa pra-perlakuan starvasi manitol dan penggunaan Ficoll dengan konsentrasi 10% (w/v) di dalam medium fase ganda dapat memacu proliferasi kalus yang embriogenik sehingga meningkatkan efisiensi embriogenik.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Proyek DUE-II Universitas Jambi yang telah memberikan bantuan dana pendidikan program PhD di University of New England, Australia, sehingga penelitian ini dapat berjalan. Kepada Prof. Acram Taji dan A/Prof. Nalamilli Prakash juga diucapkan terima kasih atas bimbingan yang diberikan selama penulis mengikuti pendidikan tersebut.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Barth, G.** 1990. Cut flower potential of Sturt's Desert Pea. *Aust. Hortic.* **88**: 48-53.
- Barth, G. E. & M. Bennel.** 1989. Market Development of Sturt's Desert Pea (*Clianthus formosus*) for The Cut Flower Market in Japan. South Australia Department of Agriculture, Adelaide.
- Bensaad, Z. M. & M. J. Hennerty.** 1996. Effects of cold pretreatment, carbohydrate source and gelling agents on somatic embryogenesis from anthers of *Vitis vinifera* L. cvs. "Regina" and "Reichensteiner", pp. 504-509. International Symposium on Plant Production in Closed Ecosystems: Automation, Culture, and Environment, Narita, Japan.
- Bishnoi, U., R. K. Jain, J. S. Rohilla, V. K. Chowdhury, K. R. Gupta & J. B. Chowdhury.** 2000. Anther culture of recalcitrant *indica* x Basmati rice hybrids. *Euphytica* **114**: 93-101.
- Cistué, L., A. Ramos & A. M. Castillo.** 1998. Influence of anther pretreatment and culture medium composition on the production of barley doubled haploids from model and low responding cultivars. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* **55**: 159-166.
- Gamborg, O. L., R. A. Millers & K. Ojima.** 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* **50**: 151-158.
- Immonen, S. & H. Anttila.** 1999. Cold pretreatment to enhance green plant regeneration from rye anther culture. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* **57**: 121-127.
- Immonen, S. & J. Robinson.** 2000. Stress treatment and Ficoll for improving green plant regeneration in triticales anther culture. *Plant Sci.* **150**: 77-84.
- Indrianto, A., E. Haberle-Bors & A. Touraev.** 1999. Assesment of various stresses and carbohydrates for their effect on the induction of embryogenesis in isolated wheat microspores. *Plant Sci.* **143**: 71-79.
- Kirby, G. C.** 1996a. Sturt's desert pea as cut flower crop, pp. 204-209. 4<sup>th</sup> National Workshop for Australian Flower, Perth, Australia.
- Kirby, G. C.** 1996b. Sturt's desert pea for pot plant and hanging baskets, pp. 44-48. 4<sup>th</sup> National Workshop for Australian Flower, Perth, Australia.
- Kyo, M. & H. Harada.** 1986. Control of the developmental pathway of tobacco pollen *in vitro*. *Planta* **168**: 427-432.
- Sudharsan, C. & M. AboEl-Nil.** 2002. Somatic embryogenesis on Sturt's desert pea (*Swainsona formosa*). *Sci. Corr.* **83**: 1074-1076.
- Taji, A.** 1997. On the way to commercialisation of Sturt's Desert Pea. University of New England, Armidale.
- Touraev, A., A. Indrianto, I. Wratschko & O. Vicente.** 1996. Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperature. *Sex. Plant Rep.* **9**: 209-215.
- Touraev, A., O. Vicente & E. Heberle-Bors.** 1997. Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Trends Plant Sci.* **2**: 285-323.
- Trottier, M.-C., J. Collin & A. Comeau.** 1993. Comparison of media for their aptitude in wheat anther culture. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* **35**: 59-67.
- Van Doorne, L. E., L. E. Marahal & R. C. Kirkwood.** 1995. Somatic embryogenesis in pea (*Pisum sativum* L.): effect of explant, genotype and culture condition. *Ann. Appl. Biol.* **126**: 169-174.
- Williams, R. R. & A. Taji.** 1991. Sturt's Desert Pea in review. *Aust. Hortic.* **89**: 85-88.
- Zhou, H., S. T. Ball & C. F. Konzak.** 1992. Functional properties of Ficoll and their influence on anther culture responses of wheat. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* **30**: 77-83.
- Zulkarnain, A. Taji & N. Prakash.** 2002. Determining microspore developmental stage as the first step in Sturt's desert pea anther culture, pp. 261-264. Plant Breeding for the 11<sup>th</sup> Millennium, Perth, Western Australia.