

OPTIMASI INDUKSI EMBRIOGENESIS SOMATIK *Pinus merkusii* Jung & Devr. MELALUI TEKNIK PENDINGINAN EKSPLAN

Adi Rahmat, Hj. Sariwulan Diana, dan Ema Rahmadani
Program Studi Biologi, Jurusan Pendidikan Biologi, FPMIPA, UPI

ABSTRAK

Rendahnya keberhasilan induksi embrio somatik *Pinus merkusii* Jung. & Devr. mendorong dilakukannya penelitian optimasi induksi embriogenesis somatik *Pinus merkusii* Jung. & Devr. melalui teknik pendinginan eksplan. Respon yang muncul dari eksplan yang diberi perlakuan pendinginan pada suhu $2\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ selama 12 jam sebelum penanaman dibandingkan secara kualitatif dengan respon yang muncul dari eksplan tanpa perlakuan pendinginan. Eksplan ditanam pada medium DCR dengan 9 kombinasi ZPT 2,4 -D dan BAP. Konsentrasi 2,4-D yang digunakan yaitu 7 μM , 9 μM , 11 μM dan BAP yaitu 2 μM , 3 μM , 4 μM . Percobaan diulang tiga kali. Respon yang diamati yaitu perkecambahan dan embriogenesis somatik. Pendinginan berpengaruh terhadap perkecambahan. Persentase perkecambahan lebih tinggi pada megagametofit yang sebelumnya mengalami perlakuan pendinginan. Pendinginan tidak dapat meningkatkan induksi embrio somatik *Pinus merkusii* secara kontinu. Besarnya induksi embrio somatik lebih ditentukan oleh karakter eksplan yang digunakan. Dalam penelitian ini embriogenesis somatik muncul dari megagametofit muda yang mengandung embrio zigotik pada fase *proembrio*. Megagametofit tersebut dicirikan dengan warna putih susu yang tidak terlalu pekat dan tidak terlalu bening. Induksi embrio somatik tertinggi didapat dari megagametofit yang diberi perlakuan pendinginan dan ditanam pada medium dengan kombinasi 9 μM 2,4-D dan 3 μM BAP.

Kata kunci: *Embriogenesis somatik, pendinginan, Pinus merkusii, 2,4-D, BAP.*

OPTIMIZATION SOMATIC EMBRYOGENESIS INDUCTION OF *Pinus merkusii* Jung. & Devr. BY EXPLANTS CHILLING TREATMENT

ABSTRACT

The low rate of *Pinus merkusii* Jung. & Devr. somatic embryo induction stimulated the research on optimizing the induction of somatic embryogenesis in Pine through chilling treatment. Responses of chilled explants and non-chilled explants were compared qualitatively. Chilling treatment conducted at $2\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ for 12 hour prior to cultivation on DCR medium containing different concentration of 2,4-D and BAP. The concentration of 2,4-D were 7 μM , 9 μM , 11 μM and BAP were 2 μM , 3 μM , 4 μM . Those were combined to be nine combination of 2,4-D and BAP. Experiments were repeated three times. The observed responses were germination and somatic embryogenesis. Chilling treatment increased germination rate. Chilling treatment did not increase the induction rate of somatic embryogenesis. The succesful of somatic embryo induction seem to be affected by character of the explants. Somatic embryo most extruded from megagametophyte containing zygotic embryo at proembryo stage. The megagametophyte was characterized by milky white colour before cultivation. Highest rate of induction occurred on the medium containing 9 μM of 2,4-D dan 3 μM of BAP.

Key words: *Embryogenesis somatic, chilling, Pinus merkusii, 2,4-D, BAP.*

A. Pendahuluan

Embriogenesis somatik merupakan salah satu teknik *in vitro* yang dapat membantu konservasi tanaman konifer dengan penyediaan bibit dan memperbanyak genotip yang cepat (Percy, *et. al.*, 2000). Australia menggunakan teknik ini untuk memperbanyak *Pinus radiata* (Chandler & Young, 1995). Kanada juga menggunakan embriogenesis somatik sebagai teknik memperbanyak *Picea sp.* (Ishii, 1995). *Pinus merkusii*, sebagai pohon hutan Indonesia yang kebutuhannya tinggi juga akan lebih efektif jika diperbanyak dengan teknik ini. Induksi merupakan tahap paling penting dalam embriogenesis somatik karena merupakan tahap awal yang mendasari tahap-tahap selanjutnya (Newton *et. al.*, 1995).

Faktor-faktor yang mempengaruhi induksi embrio somatik yaitu jenis eksplan, medium, dan kombinasi Zat Pengatur Tumbuh (ZPT). Eksplan yang digunakan untuk inisiasi kalus biasanya *immature* embrio atau embrio yang berada pada fase *proembrio* (Salajova *et. al.*, 1998). Eksplan yang digunakan untuk induksi embrio somatik *Pinus merkusii* yaitu biji yang masih sangat muda (Nurdini, 2005). Biji tersebut terdapat dalam strobilus muda yang berukuran 5-7 cm dengan warna hijau mengkilat (Nurani, 2004). Medium yang paling cocok digunakan untuk induksi embrio somatik pinus adalah medium Douglas Cotyledon Reverse (DCR) (Gupta dan Durzan, 1985 *dalam* Kaul, 1995).

Kombinasi ZPT juga menentukan keberhasilan induksi embrio somatik. Kombinasi auksin dan sitokinin yang banyak digunakan dalam menginduksi embrio somatik masing-masing adalah asam 2,4 Dikloropenoksiasetik (2,4-D) dan Benzil Amino Purin (BAP) (Purnamaningsih, 2002), seperti pada *Pinus nigra* (Salajova *et. al.*, 1995), *Pinus elliottii* (Newton *et. al.*, 1995), *Pinus lambertiana* (Gupta, 1995), *Pinus pinaster* (Bercetche dan Paques, 1995), *Pinus strobus* (Kaul, 1995), dan *Pinus merkusii* (Nurdini, 2005).

Induksi embrio somatik *Pinus merkusii* pada medium DCR dengan kombinasi 2,4-D dan BAP hanya sebesar 3.67 % (Nurdini, 2005). Hasil ini menunjukkan bahwa teknik induksi embrio somatik pada *Pinus merkusii* perlu dioptimalkan sehingga dapat menghasilkan persentase induksi yang lebih tinggi. Salah satu caranya yaitu dengan pendinginan eksplan. Pendinginan dapat menyebabkan terjadinya akumulasi amilum,

sitokinin, gibberellin (Salisbury & Ross, 1985). Distribusi air antar sel menjadi lebih mudah karena adanya peningkatan permeabilitas membran (Devlin & Witham, 1983).

Percobaan pada *Picea glehnii* yang bijinya disimpan pada suhu 4° C selama dua hari sebelum penanaman pada medium yang mengandung NAA menunjukkan hasil embrio somatik dengan angka keberhasilan sebesar 80% (Ishii, 1995). Aplikasi teknik pendinginan pada tanaman konifer *Abies nordmanniana* yang bijinya disimpan pada suhu 2° C selama 12 jam telah memberikan keberhasilan induksi hingga di atas 70% (Rahmat & Zoglauer, 2001; Rahmat, 2002; Zoglauer *et. al.*, 2003). Dalam rangka melanjutkan upaya induksi embrio somatik *Pinus merkusii*, dilakukan penelitian optimasi induksi embriogenesis somatik *Pinus merkusii* pada medium DCR yang mengandung 2,4-D dan BAP dengan teknik pendinginan eskplan.

B. Metode

Penelitian ini dilakukan dengan dua kombinasi perlakuan, yaitu pendinginan eksplan dan kombinasi ZPT. Perlakuan pendinginan dilakukan dengan menyimpan megagametofit pada suhu $2\pm 0.5^{\circ}$ C dan suhu kamar. Kombinasi ZPT adalah kombinasi 2,4-D dengan konsentrasi 7 μ M, 9 μ M, dan 11 μ M dan BAP dengan konsentrasi 2 μ M, 3 μ M, dan 4 μ M. Percobaan diulang tiga kali. Tiap ulangan diwakili oleh satu botol yang masing masing terdiri dari 5 eksplan.

Eksplan megagametofit berasal dari strobilus berukuran 5–7 cm dengan warna hijau mengilat dan kulit biji berwarna coklat muda (Nurani, 2004). Untuk perlakuan pendinginan, megagametofit disimpan dalam lemari es dengan suhu $2\pm 0.5^{\circ}$ C selama minimal 12 jam sebelum ditanam. Untuk kelompok perlakuan tanpa pendinginan, megagametofit yang telah dikeluarkan dari kulit bijinya langsung ditanam pada botol. Setiap botol kultur berisi 5 megagametofit.

Botol kultur yang telah berisi megagametofit disimpan di tempat gelap pada suhu kamar dan diamati setiap tiga hari sekali selama 3 bulan. Tiap respon perkecambahan dan pembentukan embrio somatik didokumentasikan serta dihitung persentasenya dari tiap ulangan, kemudian dihitung rata-rata persentasenya untuk tiga ulangan.. Embrio somatik *Pinus merkusii* yang terinduksi kemudian di subkultur (multiplikasi) pada medium baru

yang sama dengan medium awal (medium induksi) dan diamati perkembangannya hingga 1 bulan kultivasi.

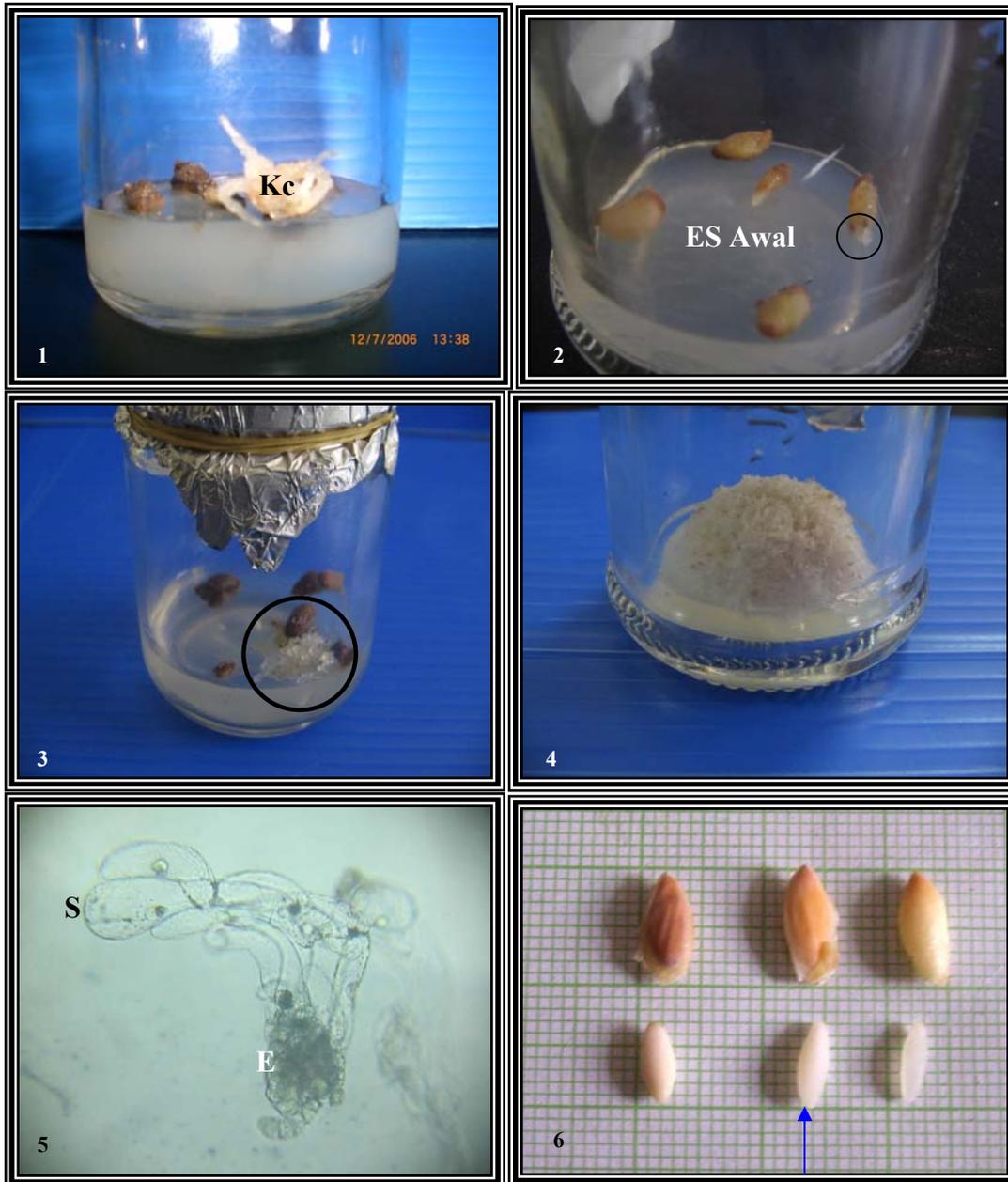
Tabel 1. Berbagai Respon Megagametofit yang Ditanam Pada Medium DCR dengan Kombinasi 2,4-D dan BAP dengan Perlakuan Pendinginan dan Tanpa Pendinginan

ZPT (μM)		Perlakuan ($X \pm \text{SE}$) (%)			
2,4-D	BAP	Tanpa Pendinginan		Dengan Pendinginan 2° C	
		Kecambah	Embrio Somatik	Kecambah	Embrio Somatik
7	2	0	6.67 ± 1.96	0	13.33 ± 2.73
	3	0	6.67 ± 1.96	0	6.67 ± 1.96
	4	0	0	0	6.67 ± 1.96
9	2	0	6.67 ± 1.96	6.67 ± 1.96	0
	3	6.67 ± 1.96	0	0	20 ± 2.58
	4	0	0	6.67 ± 1.96	13.33 ± 1.96
11	2	0	6.67 ± 1.96	0	6.67 ± 1.96
	3	0	6.67 ± 1.96	6.67 ± 1.96	13.33 ± 1.96
	4	0	13.33 ± 1.96	0	13.33 ± 1.96
Rata-rata		0.74 ± 0.21	5.18 ± 1.30	2.22 ± 0.65	10.37 ± 1.90

Pada tabel 1 dapat dilihat bahwa kecambah lebih banyak terbentuk dari megagametofit yang diberi perlakuan pendinginan sebelum penanaman karena perlakuan dingin dibutuhkan untuk aktivasi sintesis giberelin (Salisbury & Ross, 1985; Bidwell, 1979). Efek fisiologis giberelin dalam megagametofit yaitu peranannya dalam mobilisasi amilum yang tersimpan di dalam endosperm (Bidwell, 1979). Respon berupa perkecambahan muncul dari megagametofit yang berwarna putih susu pekat. Respon ini seharusnya tidak muncul jika biji yang digunakan masih berupa biji yang *immature*. Terbentuknya kecambah mungkin disebabkan oleh biji yang sudah memasuki fase *globular* akhir atau *prekotiledon*.

Hasil penelitian ini menunjukkan peningkatan persentase pembentukan embrio somatik dari megagametofit yang diberi perlakuan pendinginan. Peningkatan yang terjadi adalah sekitar 5 %. Perlakuan pendinginan mungkin dapat mempertinggi angka induksi embrio somatik dari biji *immature Pinus merkusii* dengan mengaktifkan sintesis giberelin (Salisbury & Ross, 1985; Bidwell, 1979). Giberelin dapat merangsang pembentukan enzim α -amilase. Amilum dalam megagametofit dihidrolisis dan membentuk *corrosion cavity*, sehingga embrio dapat menembus megagametofit dengan adanya pemanjangan

suspensor (Owens *et. al.*, 1993, dalam Häggman *et. al.*,1999). Hal inilah yang mungkin menyebabkan terjadinya poliembrioni lanjut dari embrio zigotik pinus.



Gambar 1-6. (1). Kecambah *Pinus merkusii* (Kc) ; (2) Awal kemunculan Embrio somatik *Pinus merkusii* (dalam lingkaran) ; (3) Embrio somatik yang berproliferasi (dalam lingkaran) ; (4) Kalus embrio somatik ; (5) Anatomi embrio somatik, Suspensor dengan pemanjangan vakuola (S) dan Massa embrio (E); (6) Warna megagametofit penentu fase embrio zigotik *Pinus merkusii* (tanda panah).

Enzim lain yang berperan dalam toleransi terhadap dingin adalah peroxidase, protease, peptidase, esterase, invertase, dan beberapa dehidrogenase (Devlin & Witham, 1983). Salah satu enzim tersebut diduga dapat menurunkan aktivitas metabolit sekunder dalam eksplan yang dapat menghambat embriogenesis somatik (Rahmat, *personal communication*, 2006).

Adanya sedikit peningkatan persentase embriogenesis somatik pada biji dengan perlakuan menunjukkan bahwa optimasi melalui pendinginan tidak memberikan hasil yang berarti. Hal ini mungkin terjadi karena *Pinus merkusii* hidup di daerah tropis yang memiliki iklim yang sangat berbeda dengan daerah temperata. Berdasarkan hal tersebut, eksplan merupakan hal yang sangat menentukan keberhasilan induksi embrio somatik *Pinus merkusii*. Eksplan yang paling tepat adalah embrio zigotik pada fase *proembrio*. Embrio tersebut terdapat dalam megagametofit yang berwarna putih susu yang tidak terlalu pekat dan tidak terlalu bening (gambar 6), karena pada penelitian ini embriogenesis somatik terjadi pada megagametofit dengan karakteristik tersebut.

Kompetensi juga merupakan salah satu hal yang menentukan keberhasilan induksi embrio somatik. Secara teori, setiap sel kompeten dapat membentuk embrio somatik (Zouglar *et. al.*, 2003). Kompetensi sel dapat menurun karena pengaruh lingkungan, tekanan fisik, dan struktur kimia (Lyndon, 1990). Kompetensi juga menjadi berkurang seiring dengan adanya diferensiasi sel (Rahmat, *personal communication*, 2006). Oleh sebab itu, eksplan yang paling tepat adalah embrio zigotik yang berada pada fase *proembrio*, karena pada saat tersebut, sel-sel embrio belum terdiferensiasi dan belum ditentukan nasib perkembangan selanjutnya.

Embrio somatik yang terbentuk muncul dari ujung mikropilar berupa juluran seperti benang tipis (gambar 2). Juluran seperti benang ini merupakan suspensor yang keluar dari megagametofit (Lelu *et. al.*, 1998). Juluran ini selanjutnya berproliferasi (gambar 3) dan berkembang menjadi kultur embriogenik yang berwarna putih, transparan, *mucilagenous*, dan terdiri dari banyak embrio somatik (gambar 4). Struktur ini disebut sebagai *Embryo Suspensor Masses* (ESM). Sifat *mucilagenous* pada kultur embriogenik disebabkan oleh diferensiasi suspensor yang tinggi. Suspensor dibentuk oleh pemanjangan vakuola dalam sel (Salajova *et. al.*, 1998). Induksi embrio somatik secara *in vitro* pada pinus adalah proses induksi ulang dari proses pembelahan (*cleavage*

poliembrioni) yang terjadi secara *in vivo* (Becwar & Pullman, 1995). Dengan demikian, embriogenesis somatik adalah somatik poliembriogenesis.

Jumlah embrio somatik per gram ESM bervariasi pada tiap genotip dan kondisi kultur, biasanya berjumlah 200-1500 embrio (Becwar *et. al.*, 1987 dalam von Arnold *et. al.*, 1995). Pada penelitian ini tidak dihitung jumlah embrio somatik yang dihasilkan. Jumlah embrio somatik yang berproliferasi ditunjukkan pada tabel 2.

Tabel 2. Proliferasi Embrio Somatik *Pinus merkusii* Terinduksi

ZPT (μM)		Perlakuan ($X \pm \text{SE}$) (%)	
2,4-D	BAP	Tanpa Pendinginan	Dengan Pendinginan 2° C
7	2	100 \pm 1.96	50 \pm 1.96
	3	100 \pm 1.96	100 \pm 1.96
	4	0	0
9	2	100 \pm 1.96	0
	3	0	100 \pm 2.58
	4	0	100 \pm 1.96
11	2	100 \pm 1.96	100 \pm 1.96
	3	100 \pm 1.96	50 \pm 1.96
	4	50 \pm 1.96	50 \pm 1.96

Berdasarkan tabel 2, proliferasi terjadi pada semua klon embrio somatik yang terinduksi. Hal tersebut menunjukkan bahwa perlakuan pendinginan mungkin tidak berpengaruh terhadap proliferasi embrio somatik. Angka pertumbuhan bervariasi pada tiap galur yang digunakan sebagai eksplan (von Arnold *et. al.* dan Klimaszewska, 1995). Tiap megagametofit yang digunakan sebagai eksplan memiliki genotip yang berbeda. Perbedaan genotip inilah yang mungkin menjadi alasan berproliferasi atau tidaknya embrio somatik terinduksi. Kondisi kultur suboptimal mungkin juga merupakan salah satu alasannya. Medium induksi dapat menjadi medium yang cocok untuk proliferasi bagi beberapa genotip, tetapi tidak cocok bagi genotip yang lain.

D. Penutup

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa pendinginan berpengaruh terhadap perkecambahan. Persentase perkecambahan lebih tinggi pada megagametofit yang sebelumnya mengalami perlakuan pendinginan. Pendinginan tidak dapat meningkatkan induksi embriogenesis somatik *Pinus merkusii* secara berkelanjutan.

Besarnya induksi embriogenesis somatik lebih ditentukan oleh karakter eksplan yang digunakan. Dalam penelitian ini, embriogenesis somatik muncul dari megagametofit muda yang mengandung embrio zigotik pada fase *proembrio*. Megagametofit tersebut dicirikan dengan warna putih susu yang tidak terlalu pekat dan tidak terlalu bening. Secara umum, embrio somatik terinduksi dari megagametofit yang ditanam pada medium dengan semua kombinasi ZPT. Namun, induksi embriogenesis somatik tertinggi didapat dari megagametofit yang diberi perlakuan pendinginan dan ditanam pada medium dengan kombinasi 9 μM 2,4-D dan 3 μM BAP.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, disarankan eksplan yang digunakan dipilih berdasarkan warna megagametofitnya, yaitu yang berwarna putih susu yang tidak terlalu pekat dan tidak terlalu bening dimana embrio zigotik yang berada di dalamnya berada pada fase *proembrio*.

E. Daftar Pustaka

- Becwar, M.R. & Pullman E.S. (1995). *Somatic Embryogenesis in Loblolly Pine (Pinus taeda L)*. dalam S. Jain, P.K. Gupta & R. Newton (eds). *Somatic Embryogenesis in Woody Plant Vol.3*. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht Netherlands.
- Bercetche, J. & Paques, M. (1995). *Somatic Embryogenesis in Maritime Pine (Pinus pinaster)*. dalam S. Jain, P.K. Gupta & R. Newton (eds). *Somatic Embryogenesis in Woody Plant vol. 3*. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht Netherlands.
- Bidwell, R. G. S. (1979). *Plant Physiology*. MacMillan Publishing Co., Inc. New York.
- Chandler, S.F. & Young, R. (1995). *Somatic Embryogenesis in SugarPine (Pinus radiata Don)*. dalam S. Jain, P.K. Gupta & R. Newton (eds). *Somatic Embryogenesis in Woody Plant Vol.3*. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht Netherlands.
- Devlin, R. M. & Witham, F. H. (1983). *Plant Physiology Fourth Edition*. PWS Publishers. USA.
- Gupta, P. K. (1995). *Somatic Embryogenesis in Sugar Pine (Pinus lambertiana)*. dalam S. Jain, P.K. Gupta, R. Newton (eds). *Somatic Embryogenesis in Woody Plant Vol.3*. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht Netherlands.
- Hägglman, H., Jokela, A., Krajnakova, J., Kauppi, A., Niemi, K., & Aronen, T., (1999). *Somatic Embryogenesis of Scots Pine: Cold Treatment and Characteristics of Explants Affecting Induction*. Journal of Experimental Botany vol. 50. Zvolen Slovak Republik.

- Ishii, K. (1995). *Somatic Embryogenesis in Picea glehnii and P. jezoensis*. dalam S. Jain, P.K. Gupta & R. Newton (eds). *Somatic Embryogenesis in Woody Plant Vol. 3*. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht Netherlands.
- Kaul, K. (1995). *Somatic Embryogenesis in Eastern White Pine (Pinus strobus L)*. dalam S. Jain, P.K. Gupta & R. Newton (eds). *Somatic Embryogenesis in Woody Plant*. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht Netherlands.
- Klimaszewska, K., (1995). *Somatic Embryogenesis in Picea mariana (Mill)*. dalam S. Jain, P.K. Gupta & R. Newton (eds). *Somatic Embryogenesis in Woody Plan Vol.3*. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht Netherlands.
- Lelu, M. A., Bartien, C., Dugeault, A., Laure, G.M., Marie, & Klimaszewska, K. (1998). *Somatic Embryogenesis and Plantlet Development in Pinus sylverstris and Pinus pinaster with and without Growth Regulators*. Physiologia Plantarum.
- Lyndon, R. F. (1990). *Plant Development: The Cellular Basis*. Unwin Hyman. London.
- Newton, R. J., Marek-Swize, K. A., Magallanes-Cedeno, M. E., Dong, N., Sen, S & Jain, S. M. (1995). *Somatic Embryogenesis in Slash pine (Pinus elliottii)*. dalam Jain S., Gupta P.K. & Newton R.J (eds) *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. 4. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht Netherlands.
- Nurani, R. (2004). *Struktur dan Perkembangan Embrio Pinus merkusii Jung & Devr*. Skripsi Sarjana Biologi UPI. tidak diterbitkan.
- Nurdini, T. L. (2005). *Induksi Embrio Somatik Pinus merkusii Jung & Devr. pada Medium DCR dengan Kombinasi ZPT 2,4-D dan BAP*. Skripsi Sarjana Biologi UPI. Tidak diterbitkan.
- Percy, R. E., Klimaszewska, K. & Cyr, D. R., (2000). *Evaluation of Somatic Embryogenesis for Clonal Propagation of Western White Pine*. NRC Research Press. Canada.
- Purnamaningsih, R. (2002). *Regenerasi Tanaman Melalui Embriogenesis Somatik dan Beberapa Gen yang Mengendalikannya*. Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan Bogor. [Online]. Tersedia: http://www.indobiogen.or.id/terbitan/agrobio/abstrak/agrobio_vol5_no2_2002_Ragapadmi_php. [8 Oktober 2006).
- Rahmat, A. & Zoglauer, K. (2001). *Somatic Embryogenesis and Agrobacterium tumefaciens Mediated Genetic Transformation of Abies nordmanianna*. Proceeding of International Conference on: Wood, Breeding, Biotechnology and Industril Expectations, A joint meeting of EU funded projects related to genetics of wood properties and forestry biotechnology, 9th Conifer biotechnology working group (CBWG) and IUFRO working parties 5.01.02: Natural variations in wood quality, 2.04.00: Genetics. Bordeaux. France.
- Rahmat, A. (2002). *Somatische Embryogenese und Gentransfer bei ausgehwahlten Tannenarten (Gattung Abies Mill)*. Dissertation. Mathematische-Naturuussenschaftlichen Fakultat I der Humbolt. Universitat zu Berlin.

- Salajova T., Jasic J., Salaj J. & Bratislava. (1998). *In Vitro Cultures of Conifers*. Veda Publishing House of Slovak Academy of Science.
- Salajova, T., Salaj, J., Jasic, J., & Kormutak, A. (1995). *Somatic Embryogenesis in Pinus nigra Arn.* dalam S. Jain, P.K. Gupta, & R Newton (eds). *Somatic Embryogenesis in Woody Plant Vol. 3*. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht Netherlands.
- Salisbury, F. B. & Ross, C. W. (1985). *Plant Physiology 4th Edition*. Wadword Publishing Company. California.
- von Arnold, S., Egertsdotter, U., Eberg I., Gupta, P., Mo, H., & Nörsgaard, J. (1995). *Somatic Embryogenesis in Norway Spruce (Picea abies)*. dalam S. Jain, P.K. Gupta, & R Newton (eds). *Somatic Embryogenesis in Woody Plant. Vol.3*. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht Netherlands.
- Zoglauer K., Behrendt U., Rahmat A., Ross H., & Taryono. (2003). *Somatic Embryogenesis - The Gate to Biotechnology in Conifers*. Laimer & Rucker (eds). *Plant Tissue Culture 100 Years since Gottlieb Haberlandt*. Austria: Springer Verlag.