

# Pengaruh $\alpha$ -Naphtaleneacetic Acid (NAA) Terhadap Embriogenesis Somatik Anggrek Bulan *Phalaenopsis Amabilis* (L.) Bl

The influence of  $\alpha$ -Naphtaleneacetic Acid (NAA) on somatic embryogenesis moon orchid *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl.

EDY SETITI WIDA UTAMI<sup>1</sup>, ISSIREP SUMARDI<sup>2</sup>, TARYONO<sup>3</sup>, ENDANG SEMIARTI<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Biologi Reproduksi, Fakultas MIPA UNAIR Surabaya 60282

<sup>2</sup>Laboratorium Anatomi Tumbuhan, Fakultas Biologi UGM Yogyakarta 55282

<sup>3</sup>Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan, Fakultas Pertanian UGM Yogyakarta 55282

<sup>4</sup>Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan, Fakultas Biologi UGM Yogyakarta 55282.

Diterima: 30 Mei 2007. Disetujui: 26 September 2007.

## ABSTRACT

An experiment to analyze the effect of plant growth regulator  $\alpha$ -Naphtaleneacetic Acid (NAA) on somatic embryogenesis moon orchid *Ph amabilis* (L.) Bl. was carried out. One year old of plantlets were used as explants sources. Basal leaf of these explants were cultured in medium New Phalaenopsis (NP) added with 0,1 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L, 3 mg/L, and 4 mg/L NAA. The explants were cultured in medium NP without NAA were used as control. The formation of embryogenic callus was observed every day, while the formation of somatic embryo was observed every week for 6 week using a dissecting microscope. The result showed that somatic embryogenesis *Ph amabilis* (L.) Bl were influenced by plant growth regulator NAA. Explants were cultured in medium NP without NAA didn't embryo formed, while explants were cultured in medium NP added with 2 mg/L, 3 mg/L, and 4 mg/L NAA embryo formed at embryogenic callus appear. These somatic embryos formed as an indirect via callus phase.

© 2007 Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta

**Key words:** moon orchid,  $\alpha$ -Naphtaleneacetic Acid (NAA), somatic embryogenesis

## PENDAHULUAN

Embriogenesis somatik atau embriogenesis aseksual adalah proses dimana sel-sel soma berkembang menjadi embrio melalui tahap-tahap morfologi yang khas tanpa melalui fusi gamet (Taurus *et al.*, 1991 dalam Toonen dan de Vries, 1996). Embrio somatik yang berasal dari kultur sel, jaringan, atau organ dapat terbentuk secara langsung dan tidak langsung. Embrio somatik yang terbentuk secara langsung meliputi pembentukan embrio dari sel tunggal atau kelompok sel yang menyusun jaringan eksplan tanpa melalui pembentukan kalus, sedangkan embrio yang terbentuk secara tidak langsung adalah pembentukan embrio melalui fase kalus (Dixon, 1985).

Aplikasi embrio somatik selain untuk mikropropagasi dan untuk pelestarian plasma nutfah (Hartman *et al.*, 1997) dapat juga digunakan untuk mendukung program pemuliaan tanaman (Komamine *et al.*, 2005). Saat ini embrio somatik mendapat perhatian yang besar di bidang bioteknologi tanaman, yaitu untuk regenerasi tanaman transgenik dan produksi biji sintetik atau *artificial seed* (Brischia *et al.*, 2002; Mamiya & Sakamoto, 2001; Nieves *et al.*, 2001; Sicurani *et al.*, 2001). Melalui DNA rekombinan,

penggunaan struktur embrio somatik lebih disukai karena tanaman berasal dari sel tunggal (satu sel), sehingga akan memberikan hasil yang lebih tinggi dengan mengurangi terjadinya *chimera* (Bajaj, 1995; Ellis, 1995).

Keberhasilan embriogenesis melalui kultur *in vitro* dipengaruhi beberapa faktor. Faktor-faktor dimaksud adalah: (1) genotip tanaman donor, (2) kondisi fisiologis tanaman donor (Jimenez & Victor, 2001), (3) jenis medium dan kondisi fisik medium, (4) lingkungan kultur, dan (5) Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) (Borries *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2000).

Zat pengatur tumbuh merupakan salah satu faktor yang menentukan keberhasilan embriogenesis somatik, seperti auksin (Chen & Chang, 2001; Tokuhara & Mii, 1993; Tokuhara & Mii, 2001) dan sitokinin (Chen & Chang, 2001; Kuo *et al.*, 2005; Murty & Pyati, 2001; Park *et al.*, 2003).

Auksin merupakan salah satu ZPT yang sangat berperan dalam berbagai proses perkembangan tumbuhan, seperti pembelahan dan pemanjangan sel (Davies, 1995), diferensiasi sel dan inisiasi pembentukan akar lateral (Bhalerao *et al.*, 2002; Reed *et al.*, 1998; Guilfoyle *et al.*, 1998), pembesaran sel (Stern *et al.*, 2003); dominansi apikal (Thimann & Skoog, 1934 dalam Hopkins, 1995), perkembangan pembuluh (jaringan pengangkut) (Mattsson *et al.*, 1999), perkembangan aksis embrio (Friml *et al.*, 2003), tropisme (Friml *et al.*, 2002), serta perkembangan embrio (Mc Glasson, 1978 dalam Ludford, 1990)

Peran auksin dalam embriogenesis somatik antara lain untuk inisiasi embriogenesis somatik (Chough & Khurana,

### ▼ Alamat Korespondensi:

Jl. Airlangga no. 4-6 Surabaya  
Telp.: +62-031.5342557. Faks. +62-031.5032557  
Email : -

2002), induksi kalus embriogenik (Chithra *et al.*, 2005; Dudits *et al.*, 1995; Vargas *et al.*, 2005), proliferasi kalus embriogenik (Huan *et al.*, 2004), induksi embrio somatik (Shinoyama *et al.*, 2004).

Penelitian embriogenesis somatik khususnya pada angrek bulan spesies *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl. belum pernah dilaporkan. Chen dan Chang (2004) meneliti embriogenesis dari eksplan protokorm, namun menggunakan angrek hibrid *Ph amabilis* var. Formosa Shimadzu. Kuo *et al.*, (2005) meneliti embriogenesis langsung dari eksplan daun, namun menggunakan angrek hibrid *Phalaenopsis* Little Steve.

Berdasarkan uraian di atas, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh NAA terhadap embriogenesis somatik angrek bulan spesies *Ph amabilis* (L.) Bl secara *in vitro*.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan penelitian

Untuk penelitian ini sebagai sumber eksplan adalah *plantlet Ph amabilis* (L.) Bl hasil kultur *in vitro* biji umur 12 bulan, yang diperoleh dari Pusat Angrek Royal Orchid, Prigen, Jawa Timur. Eksplan yang dipakai adalah bagian pangkal helaian daun urutan ke 2 dari pucuk. Bahan kimia penyusun media New Phalaenopsis (NP) menurut Islam *et al.* (1998), dan zat pengatur tumbuh  $\alpha$ -Naphthalenacetic Acid (NAA).

### Rancangan penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), dengan sampel sebanyak 180 eksplan yang dikelompokkan secara acak menjadi 6 kelompok. Setiap kelompok terdiri atas 30 eksplan yang ditanam dalam 6 botol kultur, setiap botol kultur berisi 5 eksplan. Pemberian perlakuan pada masing-masing kelompok adalah sebagai berikut:

- Kelompok I : eksplan ditanam dalam media NP tidak diberi NAA (kelompok kontrol)
- Kelompok II : eksplan ditanam dalam media NP + 0,1 mg/L NAA
- Kelompok III : eksplan ditanam dalam media NP + 1,0 mg/L NAA
- Kelompok IV : eksplan ditanam dalam media NP + 2,0 mg/L NAA
- Kelompok V : eksplan ditanam dalam media NP + 3,0 mg/L NAA
- Kelompok VI : eksplan ditanam dalam media NP + 4,0 mg/L NAA

### Cara kerja

#### Pembentukan plantlet

Biji berumur 4 bulan hasil penyerbukan dikulturkan secara aseptis di atas medium NP padat, ditambah 100 g/L ekstrak tomat dan 20 g/L sukrose tanpa zat pengatur tumbuh. Kultur diinkubasi pada suhu  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$  dengan intensitas cahaya 3000 lux selama 2 bulan. Protokorm dari biji umur 2 bulan selanjutnya dikulturkan ke medium NP cair, ditambah 1 mg/L BA, 0,5 mg/L NAA dan 5 g/L sukrose dan diletakkan di atas *shaker* dengan kecepatan 80 rpm. Setiap bulan protokorm dipindah ke dalam medium NP cair yang baru sampai terbentuk kecambah, setelah 3 bulan dipindahkan ke medium NP padat ditambah 150 mL/L air kelapa, 20 g/L sukrose dan 1 g/L arang aktif selama 7

bulan. *Plantlet* yang terbentuk dengan 4 daun selanjutnya digunakan sebagai sumber eksplan

#### Perlakuan dan pengamatan

Bagian pangkal daun nomor 2 dari pucuk *plantlet* umur 12 bulan dipotong (1-1,5 cm) secara aseptis dan digunakan sebagai bahan eksplan. Eksplan tersebut ditanam dalam botol kultur berisi medium NP yang telah diberi perlakuan sesuai kelompoknya. Kultur di inkubasi di dalam ruang pada suhu  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$  dengan intensitas cahaya 3000 lux. Setiap 2 minggu sekali kultur dipindah pada medium yang sama dan diamati perkembangannya. Pengamatan terhadap pembentukan kalus dan kalus embriogenik dilakukan setiap hari. Pengamatan pembentukan embrio somatik dilakukan secara rutin seminggu sekali selama 6 minggu menggunakan disekting mikroskop.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

**Tabel 1.** Rerata waktu induksi kalus, persentase eksplan membentuk kalus, rerata waktu induksi kalus embriogenik, dan persentase eksplan membentuk kalus embriogenik setelah selama 6 minggu dalam kultur

Perlakuan	Rerata waktu induksi kalus (hari)	Persentase eksplan membentuk kalus (%)	Rerata waktu induksi kalus embriogenik (hari)	Persentase eksplan membentuk kalus embriogenik (%)
I	13,8	30/30 (100)	—	0/30 (0)
II	12,6	30/30 (100)	—	0/30 (0)
III	12,2	30/30 (100)	—	0/30 (0)
IV	5,1	30/30 (100)	22,2	26/30 (86,6)
V	5,4	30/30 (100)	24,1	24/30 (80)
VI	6,7	30/30 (100)	25,5	23/30 (76,6)

Hasil pengamatan terhadap persentase eksplan membentuk kalus (Tabel 1) menunjukkan bahwa kalus terinduksi pada semua eksplan (100 %) baik pada perlakuan II, III, IV, V, VI maupun pada perlakuan I (kontrol) walaupun waktu yang diperlukan untuk induksi kalus berbeda-beda. Perbedaan tersebut tampak pada perlakuan I (kontrol) yang membentuk kalus paling lama yaitu rata-rata 13,8 hari, sedangkan pada perlakuan II, III, IV, V, dan VI terbentuknya kalus lebih cepat walaupun tidak serentak. Pembentukan kalus tercepat (5,1 hari) terjadi pada perlakuan IV. Ini menunjukkan bahwa hormon endogen berperan dalam induksi kalus. Terbentuknya kalus terjadi pada bagian luka bekas irisan (Gambar 1.A.), kemudian berlanjut dengan pertumbuhan kalus sebagai akibat dari proliferasi sel-sel penyusun kalus, sehingga menutup sebagian permukaan bekas irisan (Gambar 1.B.). Hal ini sesuai dengan pendapat Dodds & Robert (1982) yang menyatakan bahwa terjadinya kalus di tempat irisan bertujuan untuk menutup luka. Pembentukan kalus embriogenik hanya terjadi pada perlakuan IV, V, dan VI, sedang pada kelompok perlakuan I (kontrol), perlakuan II, dan pada perlakuan III tidak terbentuk kalus embriogenik. Persentase eksplan membentuk kalus embriogenik paling tinggi (86,6%) terjadi pada perlakuan IV, sedangkan pada perlakuan V dan VI hanya 24 eksplan (80%) dan 23

eksplan (76,6%) dari 30 eksplan yang mampu berkembang membentuk kalus embriogenik. Hal ini diduga karena kemampuan setiap jaringan berbeda-beda untuk mengalami embriogenesis.

Pada penelitian ini perlakuan NAA 2 mg/L (kelompok IV) merupakan konsentrasi yang paling cocok untuk induksi kalus embriogenik. Induksi kalus embriogenik pada perlakuan ini paling cepat dibanding dengan perlakuan yang lain, yaitu rata-rata 22,2 hari (Tabel 1.). Diduga pemberian NAA 2 mg/L menyebabkan perubahan konsentrasi auksin endogen, sehingga tercapai keseimbangan relatif untuk induksi kalus embriogenik. Dari Tabel 1. diketahui bahwa persentase pembentukan kalus embriogenik pada perlakuan NAA 2 mg/L paling tinggi.

Pengamatan menggunakan disekting mikroskop terhadap eksplan setelah dikultur selama 2 minggu tampak bahwa semua eksplan yang dikultur pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan memberikan respon yang sama yaitu kalus tampak jernih, berbutir-butir, dan berdingding tipis (Gambar 1.B.). Sampai 3 minggu lamanya dikultur, semua struktur kalus tidak menunjukkan perbedaan (Gambar 1.C.), namun pada minggu ke-4 sampai minggu ke-5 eksplan yang dikultur pada perlakuan IV, V, dan VI memberikan respon yang berbeda yaitu kalus berubah warna menjadi hijau kekuningan, remah, mengkilat, dan nodular, sedangkan eksplan yang dikultur pada perlakuan III kalus berubah warna menjadi kekuningan, dan eksplan yang dikultur pada perlakuan I dan II tidak menunjukkan perkembangan atau perubahan morfologi kalus. (Gambar 1.D dan E; Tabel 2.). Pengamatan menggunakan disekting mikroskop, kalus yang berwarna hijau kekuningan, remah, mengkilat dan nodular merupakan kalus yang dapat mengikuti pola embriogenik. Untuk induksi kalus dibutuhkan auksin. Pemberian auksin secara eksogen, berperan penting dalam pembelahan sel, dan ini sangat berkaitan dengan inisiasi pembentukan embrio somatik. Dudits *et al.*, 1995 *dalam* Arnold *et al.*, 2002 menyatakan bahwa untuk inisiasi kalus embriogenik dibutuhkan program ekspresi gen embriogenik. Arus ekspresi gen tersebut dikendalikan oleh auksin. Pemberian ZPT secara eksogen yaitu auksin berperan penting dalam reaktivasi siklus sel dan inisiasi pembentukan embrio somatik. Auksin mampu mengaktivasi sinyal transduksi sehingga sel dapat melakukan pemrograman kembali ekspresi gen yang diperlukan untuk menginduksi kalus embriogenik.

Sel-sel kalus dapat berkembang membentuk embrio somatik, tetapi tidak semua sel-sel kalus tersebut mampu berkembang menjadi embrio somatik. Hal ini disebabkan karena adanya kompetisi diantara sel-sel embriogenik untuk mengadakan perkembangan lebih lanjut.

Selanjutnya pada minggu ke-6, pada kelompok perlakuan IV, V, dan VI terbentuk kalus hijau kekuningan dengan embrio somatik fase globular pada permukaan kalus (Gambar 1.F.), sedangkan pada perlakuan I (kontrol), perlakuan II, dan III sel-sel kalus tidak mampu membentuk embrio. Pada penelitian ini terjadi embriogenesis tidak langsung

karena diawali dengan pembentukan kalus dan sesudah itu terbentuk embrio somatik, seperti yang dilaporkan Franz (1998) dan Vasil *et al.*, (1984) bahwa embriogenesis tidak langsung dicirikan dengan terbentuknya kalus terlebih dahulu.

Berdasarkan pengamatan, kalus embriogenik dan embrio somatik terbentuk beberapa hari setelah eksplan dikultur. Hal ini menunjukkan bahwa ZPT membutuhkan waktu tertentu untuk menginduksi respon fisiologis tertentu. Respon tersebut adalah pembentukan kalus embriogenik dan embrio somatik. Meskipun respon pemberian auksin di tingkat seluler dimulai sejak 2 hari setelah eksplan dikultur dan selama 5 hari periode induksi (Vasseur, 1993 *dalam* Raghavan, 1997), namun secara visual respon tersebut pada penelitian ini baru dapat diamati pada minggu ke-4 dan sampai ke-6 setelah kultur.

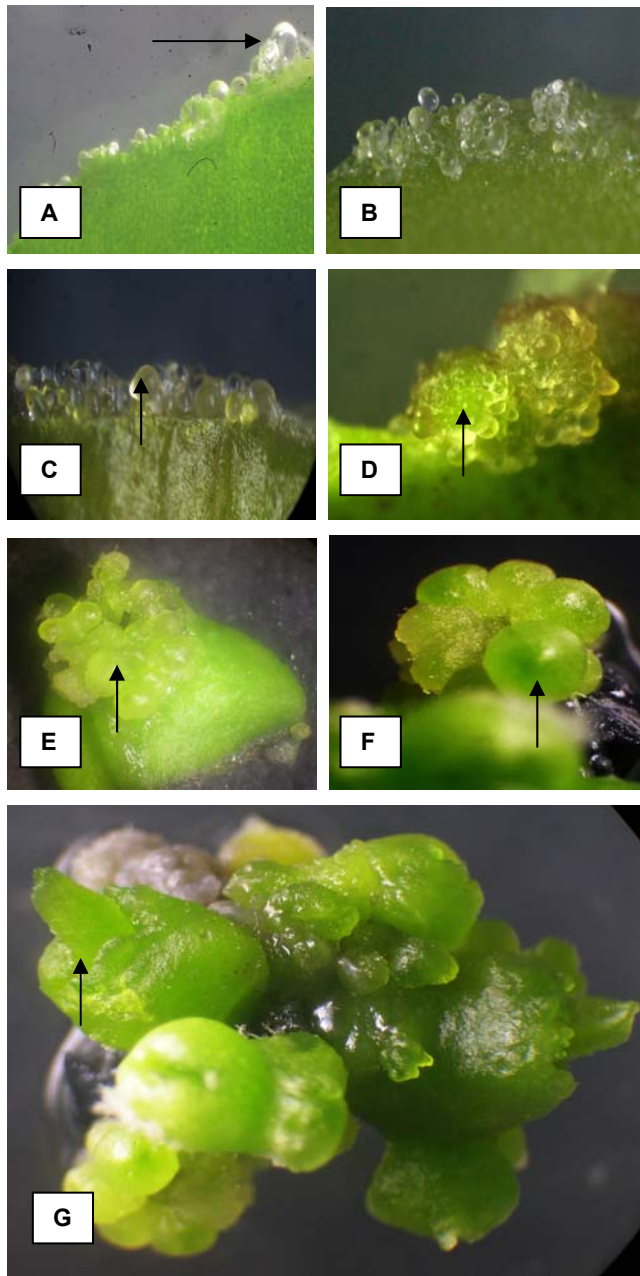
Pengamatan terhadap perkembangan kalus yang dimulai dari awal terbentuknya kalus (Tabel 1.) sampai terbentuk kalus embriogenik yang selanjutnya berkembang menjadi embrio somatik fase globular, menunjukkan bahwa kalus embriogenik dan berkembang menjadi embrio somatik adalah kalus yang terbentuk pada minggu pertama pada kelompok perlakuan IV, V, dan VI, sedangkan kalus yang terbentuk lebih dari 7 hari (pada perlakuan I, II, III) tidak menjadi embriogenik dan tidak dapat berkembang menjadi embrio somatik hingga akhir pengamatan (6 minggu setelah kultur). Ini mengindikasikan bahwa jaringan yang mudah membentuk kalus adalah jaringan yang sensitif terhadap perlakuan NAA sehingga menjadi lebih responsif dan lebih mudah diinduksi menjadi embriogenik dan mampu berkembang menjadi embrio somatik. Bell *et al.*, (1993) dan Somleva *et al.*, (1995) menyatakan bahwa sensitivitas sangat penting dalam menunjukkan kompetensi embriogenik eksplan dalam kultur *in vitro*. Keberadaan ZPT dalam medium kultur merupakan faktor penting untuk pengaturan pertumbuhan dan diferensiasi jaringan tanaman hanya jika jaringan yang digunakan sebagai sumber eksplan adalah bersifat responsif.

Selama perkembangannya, tidak semua kalus sel-selnya mampu mengalami embriogenesis, tetapi kalus, baik yang kompeten maupun yang inkompeten menjadi embriogenik dapat dihasilkan pada eksplan yang sama. Hal ini mengindikasikan bahwa sel yang identik dapat memberikan respon yang berbeda terhadap rangsang yang

**Tabel 2.** Morfologi kalus pada medium dengan perlakuan NAA dan tanpa NAA pada minggu ke-2, 4 dan 6.

Perlakuan	Morfologi kalus pada minggu ke...		
	2	4	6
I	Jernih, berbutir-butir, berdingding tipis.	Tidak ada perkembangan kalus	Tidak ada perkembangan kalus
II	Jernih, berbutir-butir, berdingding tipis.	Tidak ada perkembangan kalus	Tidak ada perkembangan kalus
III	Jernih, berbutir-butir, berdingding tipis.	Kalus berubah warna menjadi kekuningan	Kalus kekuningan tanpa embrio
IV	Jernih, berbutir-butir, berdingding tipis.	Kalus berubah warna menjadi hijau kekuningan, remah, mengkilat, noduler	Kalus hijau kekuningan dengan embrio
V	Jernih, berbutir-butir, berdingding tipis.	Kalus berubah warna menjadi hijau kekuningan, remah, mengkilat, noduler	Kalus hijau kekuningan dengan embrio
VI	Jernih, berbutir-butir, berdingding tipis.	Kalus berubah warna menjadi hijau kekuningan, remah, mengkilat, noduler	Kalus hijau kekuningan dengan embrio

sama, dan hanya sel tertentu yang dapat merespon. Respon tersebut berupa perubahan untuk memprogram kembali sel sehingga kompeten menjadi embrio, sedang sel yang lain tidak responsif terhadap rangsang sehingga terjadi perkembangan yang tidak sinkron (Gambar 1.G.).



**Gambar 1.** Perkembangan kalus anggrek bulan *Ph amabilis* (L.) Bl. A. Pembentukan kalus (panah) pada bagian luka bekas irisan 1 minggu setelah dikultur pada media NP ditambah 2 mg/L NAA (perlakuan IV), B. Pembentukan kalus 2 minggu setelah dikultur, kalus tampak jernih, berbutir-butir, dan ber dinding tipis. C. Kalus (panah) 3 minggu setelah dikultur. D. Kalus (panah) setelah 4 minggu dikultur, kalus berubah menjadi hijau kekuningan, remah, mengkilat, dan nodular. E. Kalus embriogenik 5 minggu setelah dikultur. F. Terbentuk kalus berwarna hijau kekuningan dengan embrio tipe globular (panah) 6 minggu setelah kultur. G. Perkembangan embrio lebih lanjut, yaitu munculnya tunas pucuk (panah). Perkembangan embrio yang terbentuk tidak sinkron. (Bar = 1 mm).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa NAA 2 mg/L adalah konsentrasi yang optimum untuk induksi kalus

embriogenik dan inisiasi embrio somatik dari eksplan pangkal daun anggrek bulan *Ph amabilis* (L) Bl. Konsentrasi optimum NAA yang digunakan untuk induksi kalus embriogenik dan inisiasi embrio somatik pada penelitian ini lebih tinggi dibanding penelitian lain pada embriogenesis somatik anggrek bulan lain yang pernah dilakukan sebelumnya. Konsentrasi optimum NAA untuk induksi kalus embriogenik dan embrio somatik pada anggrek hibrid *Phalaenopsis* (PM 292) adalah 0,1 mg/L (Tokuhara & Mii, 2001), dan konsentrasi NAA optimum untuk induksi dan multiplikasi *Protocorm-like Bodies* (PLB) dari eksplan tunas pucuk tangkai bunga anggrek *Phalaenopsis* dan *Doritaenopsis* adalah 0,1 mg/L NAA dan 1 mg/L BAP (Tokuhara & Mii, 1993). Dari informasi ini membuktikan bahwa kebutuhan NAA yang harus ditambahkan untuk induksi kalus embriogenik dan embriogenesis somatik bervariasi untuk setiap jenis yang mempunyai sifat genetik yang berbeda.

## KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh pemberian NAA terhadap embriogenesis somatik anggrek bulan *Ph amabilis* (L) Bl. Konsentrasi NAA yang optimal untuk induksi pembentukan kalus embriogenik dan inisiasi embrio somatik adalah 2 mg/L. Embrio somatik terbentuk secara tidak langsung melalui tahap kalus.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Terima kasih disampaikan kepada Pimpinan Proyek DUE-Like Batch III Universitas Airlangga yang telah membiayai penelitian ini melalui kompetisi Riset Grant, dan semua pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian maupun penulisan ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Arnold, S.V., I. Sabala, P. Bozhlov, J. Dyachok, and L. Filonova. 2002. Developmental Pathway of Somatic Embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 69: 233-249.
- Bajaj, Y.P.S. 1995. Somatic Embryogenesis and its Applications for Crop Improvement. In: Bajaj, Y.P.S. (ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. 105-118.
- Bell, L.M., R.N. Trigiano, and B.V. Conger. 1993. Relationship of Abscisic Acid to Somatic Embryogenesis in *Dactylis glomerata*. *Environmental and Experimental Botany*. 33: 495-499.
- Bhalerao, R.P., J. Eklof, K. Ljung, A. Marchant, M. Bennett, and G. Sanberg. 2002. Shoot-derived Auxin is Essential for Early Lateral Root Emergence in Arabidopsis Seedling. *Plant Journal*. 29: 325-332.
- Borries, E.F., L. Gennztittel, H. Serieys, G. Alibert, and A. Sarrafi. 1999. Influence of Genotype and Gelling Agents on *In Vitro* Regeneration by Organogenesis in Sunflower. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 59 : 65-69
- Brischia, R., E. Piccioni, and A. Standardi. 2002. Micropropagation and Synthetic Seed in M.26 Apple Rootstock (II): A. New Protocol for Production of Encapsulated Differentiating Propagules. *Plant Cell, Tissue and Organ culture*. 68: 137-141.
- Chen, J.T. and W.C. Chang. 2001. Effect of Auxin and Cytokinins on Direct Somatic Embryogenesis on Leaf Explant of *Oncidium* "Gower Ramsey". *Plant Growth Regulation*. 34: 229-232.
- Chen, J.T. and W.C. Chang. 2004. Induction of Repetitive Embryogenesis from Seed Derived Protocorms of *Phalaenopsis amabilis* var. *formosa shimadzu*. *In Vitro Cellular and Development Biology Plant*. 40: 290-293.
- Chithra, M., K.P. Martin, C. Sunandakumari, and P.V. Madhusoodanan. 2005. Somatic Embryogenesis, Encapsulation, and Plant Regeneration of *Rotula aquatica*, A Rare Rhoeophytic Woody Medical Plant. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. 41 : 28-31.
- Chough, A. and P. Khurana. 2002. Gene Expression During Somatic Embryogenesis-Recent Advances. *Current Science*. 80(6): 715-718.

- Davies, P.J. 1995. *Plant Hormones : Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
- Dixon, R.A. 1985. *Plant Tissue Culture. A Practical Approach Series*. Academic Press Inc. New York.
- Dodds, Y. and L.W. Robert. 1982. *Experiment in Plant Tissue Culture*. Cambridge University Press. London.
- Dudits, D.J.G., L. Bogre, and L. Baho. 1995. Molecular biology of somatic embryogenesis. In: Thorpe, T.A. (ed.). *In Vitro Embryogenesis In Plants*. Kluwer Acad. Publ. Dordrecht. The Netherlands. 471-538.
- Ellis, D. 1995. Genetic Transformation of Somatic Embryos. In: Bajaj, Y.P.S. (ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Springer-Verlag Berlin Heidenberg New York. 207-218.
- Franz, P.F. 1998. Cytodifferentiation during Callus Initiation and Somatic Embryogenesis in *Zea mays* L. 73-113
- Friml, J., A. Vieten, M. Sauer, D. Wajjer, H. Schwarz, T. Hamann, R. Offringa, and G. Jurgens. 2003. Efflux-dependent Auxin Gradients Establish the Apical-basal Axis of *Arabidopsis*. *Nature*. 426: 147-153.
- Friml, J., J. Wisniewska, E. Benkova, K. Mendgen, and K. Palme. 2002. Lateral Relocation of Auxin Efflux Regulator PIN3 Mediates Tropism in *Arabidopsis*. *Nature*. 415: 806-809.
- Guilfoyle, T., G. Hagen, T. Ulmazow, and J. Murfett. 1998. How does Auxin Turn on Gene? *Plant Physiol*. 118: 341-34.
- Hartmann, T.H., E.D. Kester, T.F. Davies, and L.R. Geneve. 1997. *Plant Propagation: Principles and Practice*, sixth edition. Prentice Hall. New York.
- Hopkins, W.G. 1995. *Introduction to Plant Physiology*. John Wiley & Sons, Inc. New York, Toronto, Singapore. 285-321.
- Huan, L.V.T., T. Takamura, and M. Tanaka. 2004. Callus Formation and Plant Regeneration from Callus Through Somatic Embryo Structures in *Cymbidium* orchid. *Plant Science*. 166: 1443-1449.
- Islam, M.O., S. Ichihashi, and S. Matsui. 1998. Control of Growth and Development of Protocorm like Body Derived from Callus by Carbon Sources in *Phalaenopsis*. *Plant Biotechnology*. 15 (4) : 183-187.
- Jimenez, V.M. 2001. Regulation of *In Vitro* Somatic Embryogenesis with Emphasis on the Role of Endogenous Hormones. *R. Bras. Fisiol. Veg.*, 13(2): 196-223
- Komamine, A., M. Natsuko, and N. Koji. 2005. Mechanism of Somatic Embryogenesis in Carrot Suspension Cultures – Morphology, Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology. *In Vitro Cell & Dev Biol Plant*. 41: 6-10.
- Kuo, H.L., J.T. Chen, and W.C. Chang. 2005. Efficient Plant Regeneration Through Direct Somatic Embryogenesis from Leaf Explants of *Phalaenopsis* "Little Steve". *In Vitro Cellular and Development Biology Plant*. 41(4): 453-456.
- Ludford, P.M. 1990. Postharvest Hormone Changes in Vegetables and Fruits. In: Davies, P.J. (ed.). *Plant Hormone and Their Role in Plant Growth and Development*. Kluwer Ac. Press Pub. Boston-London. 574-592.
- Mamiya, K. and Y. Sakamoto. 2001. A Method to Procedure Encapsulatable Units For Synthetic Seed in *Asparagus officinalis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 64: 27-32.
- Mattsson, J., Z.R. Sung, and T. Berleth. 1999. Responses of Plant Vascular Systems to Auxin Transport Inhibition. *Development*. 126: 2979-2991.
- Murthy, H.N, and A. Pyati. 2001. Micropropagation of *Aerides maculosum* Lindl (Orchidaceae). *In Vitro Cellular and Development Biology-Plant*. 37(4): 223-226.
- Nieves, N., M.E. Martinez, L. Castillo, M.A. Blanco, and J.L.G. Olmedo. 2001. Effect of Abscisic Acid and Jasmonic Acid on Partial Desiccation of Encapsulated Somatic Embryos of Sugarcane. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 65: 15-21.
- Park, S.Y., H.N. Murthy, and K.Y. Paek. 2003. Protocorm-like body Induction and Subsequent Plant Regeneration from Root Tip Cultures of *Doritaenopsis*. *Plant Science*. 164: 919-923.
- Raghavan, V. 1997. *Experimental Embryogenesis in Vascular Plants*. Academic Press. London. 349-350; 358-381.
- Reed, R.C., S.R. Brady, and G.K. Munday. 1998. Inhibition of Auxin Movement from the Shoot Into the Root Inhibits Lateral Root Development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 118: 1369-1378.
- Shinoyama, H., Y. Nomura, T. Tsuchiya, and T. Kazuma. 2004. Simple and Efficient Method for Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Leaves of *Chrysanthemum (Dendranthema x grandiflorum)* (Ramat.) Kitamura). *Plant Biotechnology*. 21(1): 25-33.
- Sicurani, M.E., A. Piccioni, and Standardi. 2001. Micropropagation and Preparation of Synthetic Seed in M.26 Apple Rootstock I: Attempts towards Saving Labor in the Production of Adventitious Shoot Tips Suitable for Encapsulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 66: 207-216.
- Somleva, M.M., V. Kapchina, V. Alexieva, and E. Golovinsky. 1995. Anticytokinin Effects on *In Vitro* Response of Embryogenic and Nonembryogenic Genotypes of *Dactylis glomerata* L. *Plant Growth Regulation*. 16: 109-112.
- Stern, K.R., S. Jansky, and J.E. Bidlack. 2003. *Introductory Plant Biology*. The McGraw-Hill Companies, Inc. New York. Amerika.
- Tokuhara, K. and M. Mii. 1993. Micropropagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* by Culturing Shoot Tips of Flower Stalk Buds. *Plant Cell Rep*. 13:7-11.
- Tokuhara, K. and M. Mii. 2001. Induction of Embryogenic Callus and Cell Suspension Culture from Shoot Tips Excised from Flower Stalk Buds of *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *In Vitro Cell. Dev Biol-Plant*. 37 : 457-461.
- Toonen, M.A.J. and S.C. de Vries. 1996. Initiation of Somatic Embryos from Single Cells. In: Wang, T.L, and A. Cuming (ed.). *Embryogenesis the generation of plant*. Bios Scientific Publishers Limited. Oxford. 173-177.
- Vargas, T. E., E.D. Garcia, and M. Oropeza. 2005. Somatic Embryogenesis in *Solanum tuberosum* from Cell Suspension Cultures: Histological Analysis and Extracellular Protein Pattern. *Journal of Plant Physiology* 162: 449-456.
- Vasil, V., I.K. Vasil, and Chin-yi Lu. 1984. Somatic Embryogenesis in Long-term Callus Cultures of *Zea mays* L. (Gramineae). *Amer J Bot*. 71 (1) : 158.
- Zhang, B., F. Liu, and C. Yao. 2000. Plant Regeneration via Somatic Embryogenesis in Cotton. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 60: 89-94.