

Karakterisasi secara Morfologi Abnormalitas Embrio Somatik Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq) dari Eksplan Daun

Nesti F. Sianipar¹, Gustav A. Wattimena², Hajrial Aswidinnoor², Maggy Thenawidjaya S.³,
⁴Nurita Toruan-Mathius, dan ⁵Gale Ginting

¹Universitas Kristen Krida Wacana, Jl. Arjuna No. 6 Jakarta 115110

²Jurusan Agronomi, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Dramaga, Bogor

³Fakultas Teknologi Pangan, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Dramaga, Bogor

⁴SEAMEO Biotrop, Jl. Raya Tajur Km 6 PO Box 116, Bogor

⁵Pusat Penelitian Kelapa Sawit, PO Box. 1103 Medan 20001, Jl. Brigjen Katamsa 51 Kp. Baru, Medan 20158

ABSTRACT

Morphological Characterization on Abnormalities of Oil-palm (*Elaeis guineensis* Jacq) Embryo Somatic Generated from Leaf Explant. Nesti F. Sianipar, Gustav A. Wattimena, Hajrial Aswidinnoor, Maggy Thenawidjaya S., Nurita Toruan-Mathius, and Gale Ginting. Somatic embryogenesis is the development of somatic cells to form a structure alike zygotic embryo direct or indirectly. Somatic embryos from young leaf explants could be induced from primary callus formed surrounding the palm-leaf rib. Embryogenic callus will develop to be somatic embryos which grew nonuniformly. Embryo somatic growth pattern of globular, asymmetric heart shape, and cotyledonary stage produced different morphological variation. Morphological variability of *in vitro* somatic embryos could be due to high application of growth regulator 2,4-D at the beginning of initiation, subculture frequency, loaded cells, and polysomic cells from certain tissues. From the three clones used, which were clone 638, 636, and 558, there were different variation at each step of development stages, grouping morphologically into normal and abnormal based on the development of somatic embryos. The percentage of abnormality from the three clones used was clone 27% (638), 30% (636), and 46% (558). The normal somatic embryos at globular stage were round and bipolar shaped; while the abnormal embryos were oval and no bipolar. At heart-shape stage, the normal somatic embryos had symmetrical polarized surface; while the abnormal embryos had asymmetrical polarized surface. At the cotyledon stage, the normal embryos had monocotyledon; the abnormal ones were more than one cotyledon.

Key words: *Elaeis guineensis*, somatic embryogenesis, abnormality, morphology.

PENDAHULUAN

Kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) merupakan tanaman monokotil dan tidak dapat diperbanyak secara vegetatif dengan metode konvensional. Em-

briogenesis somatik digunakan sebagai alat untuk memperbanyak vegetatif. Perkembangan embrio somatik yang tidak seragam, perkecambahan yang rendah dan pembentukan planlet yang tidak efisien merupakan kendala utama untuk penerapan embriogenesis somatik dalam memperbanyak massal tanaman unggul (Tahardi *et al.* 2003). Teknik kultur jaringan kelapa sawit pada saat ini lebih banyak dikembangkan melalui embriogenesis somatik dalam kultur cair dengan tujuan otomatisasi dan produksi embrio somatik serta meningkatkan pertumbuhan dan keseragaman kultur (Touchet *et al.* 1991, Duval *et al.* 1993, Sumaryono *et al.* 1994, Teixeira *et al.* 1995, Ginting dan Fatmawati 1997, Tahardi 1998a, 1999).

Embriogenesis somatik adalah perkembangan embrio dari sel somatik sampai struktur yang menyerupai embrio zigotik yang dapat terjadi secara langsung maupun tidak langsung (Pierik 1987). Embrio somatik yang dapat berdiferensiasi secara langsung adalah pembentukan embrio dari sel atau jaringan tanpa melalui pembentukan kalus (Williams dan Maheswaran 1986). Eksplan yang mengandung sel embriogenik dapat langsung memperbanyak diri dan berkembang menjadi embrio somatik berbentuk globular, hati, torpedo, dan kotiledon (Jurgens *et al.* 1991).

Auksin 2,4-D lebih efektif dibandingkan dengan auksin yang lain untuk meningkatkan perkembangan dan proliferasi kultur embriogenik. 2,4-D mendorong pertumbuhan embrio somatik dari embriogenesis. Dengan 2,4-D yang lebih rendah sehingga memblokir ekspresi gen-gen yang dibutuhkan untuk perubahan bentuk ke tahap hati (Zimmerman 1993).

Kebutuhan 2,4-D atau zat pengatur tumbuh lain untuk inisiasi embriogenesis somatik sangat besar ditentukan oleh tahap perkembangan dari jaringan eksplan. Kalus embriogenik umumnya dibentuk pada medium yang mengandung auksin. Satu mekanisme, auksin dapat mengatur embriogenesis melalui asidifikasi

pada sitoplasma dan/atau dinding sel (Kutschera 1994).

Ada dua mekanisme yang penting dalam pembentukan embriogenesis suatu sel, yaitu, pembelahan sel asimetrik dan pemanjangan sel kontrol (De Jong *et al.* 1993). Pembelahan sel asimetrik dipengaruhi oleh zat pengatur tumbuh yang mengubah sel polaritas melalui interfensi dengan gradien pH daerah sekitar sel (Smith dan Krikorian 1990).

Auksin mempunyai dua peranan dalam perkembangan tanaman, yaitu pemanjangan sel pada jaringan tanaman seperti pada koleoptil jagung atau ruas kancang serta dalam pembelahan, diferensiasi, morpogenesis sel. Reinert (1958) melaporkan bahwa auksin berperan penting dalam regenerasi dinding sel pada beberapa spesies tanaman seperti dalam sel embriogenik wortel. Auksin dapat mengendalikan RNA dan sintesis protein dengan cara berperan sebagai pengaktif mRNA (Griffith *et al.* 1993).

Zat pengatur tumbuh 2,4-D pada konsentrasi rendah akan menginduksi terbentuknya kalus, namun pada konsentrasi tinggi akan menyebabkan timbulnya mutasi karena 2,4-D bersifat herbisida dan akan menyebabkan perubahan jaringan tanaman (Goldsworthy dan Mina 1991). Embrio somatik yang dihasilkan melalui kultur jaringan menunjukkan keragaman somaklonal yang tinggi. Keragaman somaklonal ditunjukkan pada abnormalitas secara sitologi dan mutasi fenotipe secara kualitatif dan kuantitatif, serta perubahan kariotipe dan perubahan sekuens (Duncan 1997). Variasi somaklonal disebabkan oleh proses kultur jaringan yang diinduksi dari lingkungan dengan pemberian 2,4-D (Deambrogio dan Dale 1980).

Keragaman somaklonal adalah keragaman genetik tanaman yang dihasilkan melalui kultur jaringan (Larkin dan Scowcroft 1981). Keragaman genetik yang terjadi di dalam kultur jaringan disebabkan oleh penggantian jumlah set kromosom (fusi, endomitosis), endoreduplikasi, perubahan jumlah kromosom (*lagging, non disjunction*), perubahan struktur kromosom, perubahan gen, dan perubahan sitoplasma (Griffith *et al.* 1993, Kumar 1995). Menurut Van Harten (1998) variasi somaklonal kemungkinan disebabkan oleh ketidakaturan mitotik yang berperan dalam terjadinya ketidakstabilan kromosom dan amplifikasi atau delesi gen.

Keunggulan teknik kultur jaringan adalah mampu menghasilkan bibit secara massal dalam waktu yang relatif singkat, seragam, memiliki sifat identik dengan induknya, masa non produktif lebih singkat, dan produktivitasnya lebih tinggi. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan karakterisasi abnormalitas embrio so-

matik kelapa sawit dari beberapa tahap perkembangan.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Anatomi Institut Pertanian Bogor, mulai September 2005 sampai Januari 2006.

Bahan tanaman yang digunakan sebagai eksplan diambil dari daun muda yang belum mekar berasal dari pohon kelapa sawit yang telah dewasa varietas Tenera unggul hasil seleksi (ortet terpilih) dari Pusat Penelitian Kelapa Sawit. Bahan tanaman yang digunakan terdiri dari 3 klon, yaitu klon 638, 636, dan 558. Penelitian dilakukan dengan menginisiasi kalus embriogenik dan proliferasi embrio somatik pada medium MS padat.

Inisiasi dan Proliferasi Kalus Embriogenik, Embrio Somatik pada Medium Padat

Eksplan daun muda ditanam pada medium Murashige dan Skoog (MS) yang ditambahkan 2,4-D 100 mg/l dengan kinetin 0,1 mg/l, arang aktif 2 g/l, air kelapa 10%, dan sukrosa 30 g/l pada tabung untuk inisiasi kalus. Kultur diinkubasi dalam ruangan gelap. Kalus embriogenik yang terbentuk setelah 4 bulan di proliferasi pada medium DF (de Fossard *et al.* 1974). Embrio somatik diinduksi dari kalus embriogenik dalam medium DF yang mengandung 2,4-D 0,1 mg/l dan kinetin 0,1 mg/l (Tahardi 1998b).

Karakterisasi Abnormalitas Embrio Somatik secara Morfologi

Karakterisasi morfologi embrio somatik kelapa sawit normal atau abnormal sebagai berikut:

1. Untuk tahap globular didasarkan pada bentuk dan bidang polaritas.
2. Untuk tahap hati didasarkan pada bidang pembelahan sel asimetri atau simetri
3. Untuk tahap kotiledon didasarkan pada jumlah kotiledon

Pengamatan dilakukan pada embrio somatik tahap globular, hati asimetri (*heart-shape*), dan kotiledon. Morfologi masing masing tahapan embrio difoto dengan mikroskop binokuler dengan perbesaran 40 x (*stereomicroscope Technical, Japan*).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perkembangan embrio somatik kelapa sawit yang diinisiasi dari eksplan daun muda menghasilkan embrio somatik melalui kalus primer yang terbentuk di sekitar lidi dan sebagian muncul sepanjang pembuluh

daun bekas irisan (Schwendiman *at al.* 1988). Kalus primer bersifat *massif*, berwarna kuning kecoklatan, berbentuk bulat, berhubungan satu sama lainnya secara bersambungan. Kalus embriogenik mengandung bagian sel-sel meristematik yang dilokasikan pada permukaan kalus. Pada bagian kalus yang meristematik akan cepat membentuk embrio somatik ke tahap globular (Kysely dan Jacobsen 1990). Perkembangan embrio somatik pada tanaman dikotil melalui tahap globular, hati (*heart-shaped*), torpedo, dan kotiledon (Jurgens *et al.* 1991), sedangkan pada tanaman monokotil melalui tahap globular, hati scutellar, dan kotiledon. Embrio somatik berbeda dengan embrio zigotik karena embrio somatik tidak mempunyai suspensor pada tingkat globular, tetapi mempunyai fase perkembangan yang sama, yaitu globular, hati, torpedo, dan kotiledon.

Tingkat persentase abnormalitas embrio somatik yang tertinggi pada klon 558 (46%) dan terendah pada klon 636 (30%) (Tabel 1). Persentase abnormalitas yang tinggi dapat disebabkan oleh subkultur yang berulang kali dan umur kalus (Paranjothy *et al.* 1993, Ignacimuthu 1997). Tingkat persentase abnormalitas embrio somatik yang tinggi hingga 46% diduga karena penggunaan 2,4-D yang juga menyebabkan terjadinya abnormalitas dalam proses pembelahan sel yang menyebabkan keragaman somaklonal. 2,4-D bukan saja bersifat auksin, tetapi suatu fenoksi herbisida yang membunuh gulma berdaun lebar.

Hasil pengamatan terhadap perkembangan mor-

fologi embrio somatik dari 3 klon, yaitu klon 638, 636, dan 558 dikelompokkan secara normal dan abnormal untuk masing-masing tahapan. Klon 638, 636, dan 558 memiliki bentuk, permukaan, dan polaritas yang berbeda-beda (Tabel 2).

Morfologi embrio somatik normal dan abnormal pada tahap globular sangat bervariasi. Hal ini mungkin dapat disebabkan oleh adanya perubahan saat pembelahan sel pada tahap kalus embriogenik. Tahap awal perkembangan sel embriogenik dikarakterisasi melalui proliferasi sel polar. Karakterisasi sel embriogenik yang telah dipelajari pada tingkat sitologi, histokimia, dan biokimia menunjukkan bahwa sel embriogenik adalah unik (Natesh dan Rau 1984, Williams dan Maheswaran 1986).

Morfologi globular pada klon 638 mempunyai bentuk dan permukaan tidak beraturan, berbeda antara normal dengan abnormal. Morfologi globular abnormal bervariasi bentuknya, yaitu lonjong, bentuk permukaannya tidak rata dan globularnya bergerombol (Gambar 1), sedangkan pada klon 636 embrio somatik globular abnormal mempunyai permukaan yang kasar sama halnya dengan klon 558 (Gambar 1).

Perubahan morfologi pada tahap globular yang ditunjukkan pada ketiga klon yang diamati, menunjukkan terjadinya variasi somaklonal yang disebabkan beberapa faktor sewaktu pada masa kultur. Perubahan ekspresi suatu karakter disebabkan oleh perubahan genetik atau epigenetik. Perubahan genetik karena perubahan set kromosom, jumlah kromosom, struktur

Tabel 1. Persentase abnormalitas embrio somatik berdasarkan karakterisasi morfologi.

Klon	Embrio somatik						Persentase embrio somatik	
	R1		R2		R3		N	AB
	N	AB	N	AB	N	AB		
638	17/20	3/20	14/20	6/20	13/20	7/20	73	27
636	15/20	5/20	14/20	6/20	13/20	7/20	70	30
558	10/20	10/20	15/20	5/20	9/20	11/20	56	46

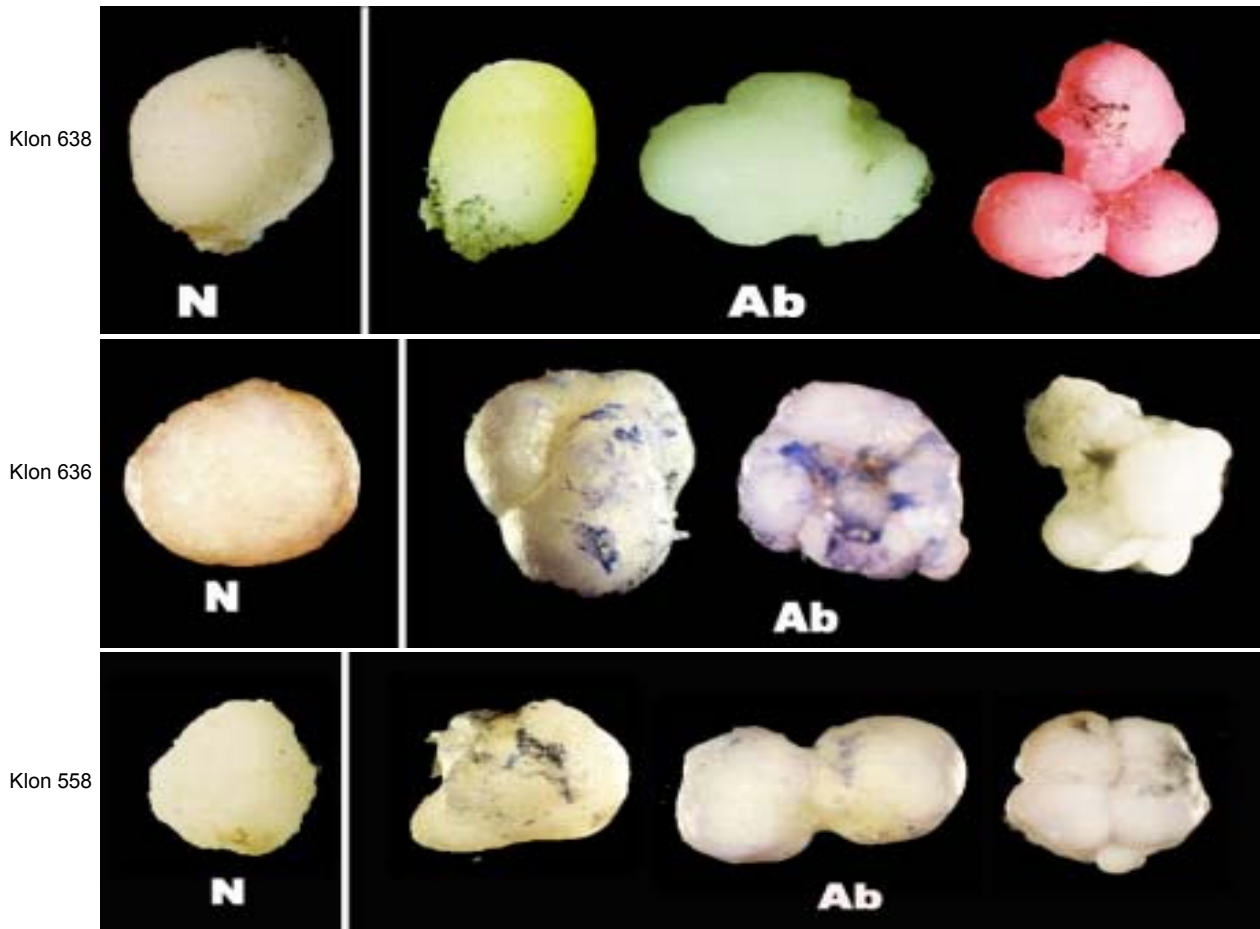
N = normal, AB = abnormal, R1 = ulangan 1, R2 = ulangan 2, R3 = ulangan 3.

Tabel 2. Hasil karakterisasi abnormalitas embrio somatik secara morfologi.

Karakterisasi	Tahapan perkembangan embrio somatik		
	Globular	Hati	Kotiledon
Normal	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Bulat ◆ Bipolar ◆ Permukaan rata 	Simetri	Monokotiledon
Abnormal klon 638	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Lonjong ◆ Bergerombol ◆ Permukaan tidak rata 	Tidak simetri	Lebih dari satu kotiledon
Abnormal klon 636	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Bulat tidak beraturan ◆ Tidak bipolar 	Tidak simetri	Lebih dari satu kotiledon
Abnormal klon 558	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Dua bulatan yang tidak terpisah ◆ Tidak bipolar 	Tidak simetri	Lebih dari satu kotiledon

kromosom atau gen. Ekspresi dari karakter tersebut dapat terjadi pada tingkat morfologi, fisiologi, dan bio-

kimia (D'Amato 1986, Griffith *et al.* 1993, Kumar 1995).



Gambar 1. Karakterisasi abnormalitas morfologi embrio somatik tahap globular, N (normal) dan Ab (abnormal).

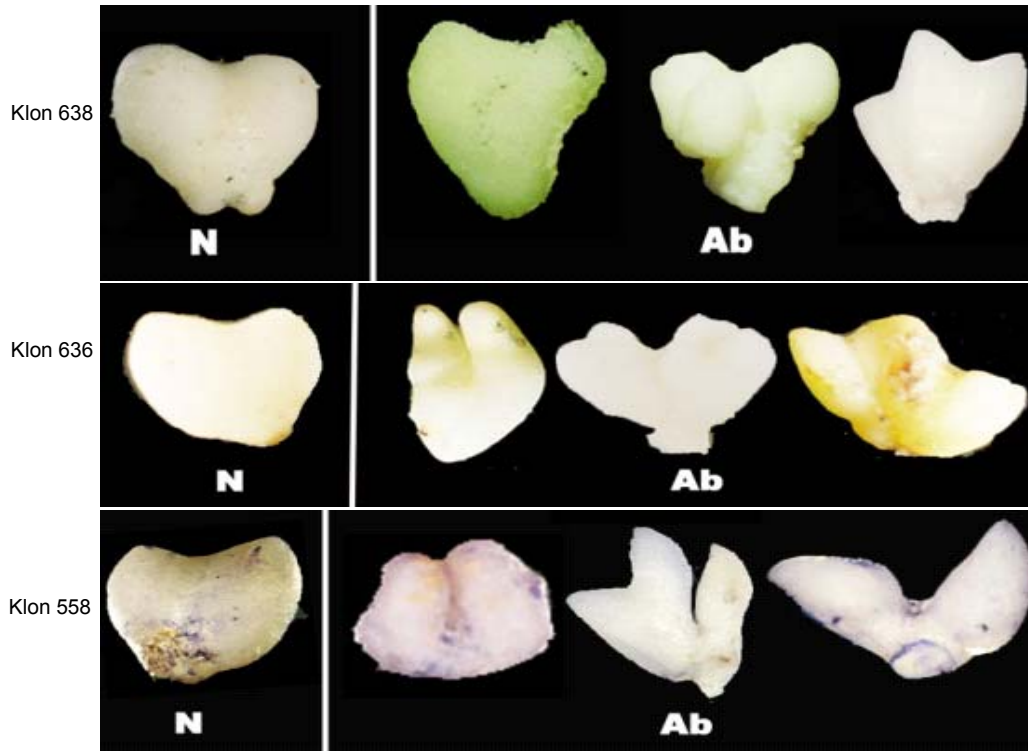
Teknik kultur jaringan tidak selalu menghasilkan tanaman yang identik dengan induknya karena selama proses kultur jaringan dapat terjadi variasi fenotipik baik yang disebabkan oleh perubahan genetik maupun epigenetik yang disebut variasi somaklonal. Keragaman genetik tanaman yang dihasilkan melalui kultur jaringan dapat diturunkan pada zuriat tanaman hasil regenerasi (Larkin dan Scowcroft 1981, Skrivin *et al.* 1993). Variasi somaklonal merupakan keragaman genetik yang terjadi secara spontan hasil regenerasi sel somatik pada kultur *in vitro*. Variasi somaklonal dapat juga berasal dari keragaman genetik eksplan yang disebabkan adanya sel-sel bermutasi maupun adanya polisomik dari jaringan tertentu (Wattimena 1992).

Dari klon 638, 636, dan 558 menghasilkan embrio somatik pada tahap hati scutellar yang mempunyai variasi sangat beragam. Bentuk hati scutellar adalah normal, yaitu hati yang permukaannya halus (Gambar 2), sedangkan bentuk hati scutellar abnormal mempu-

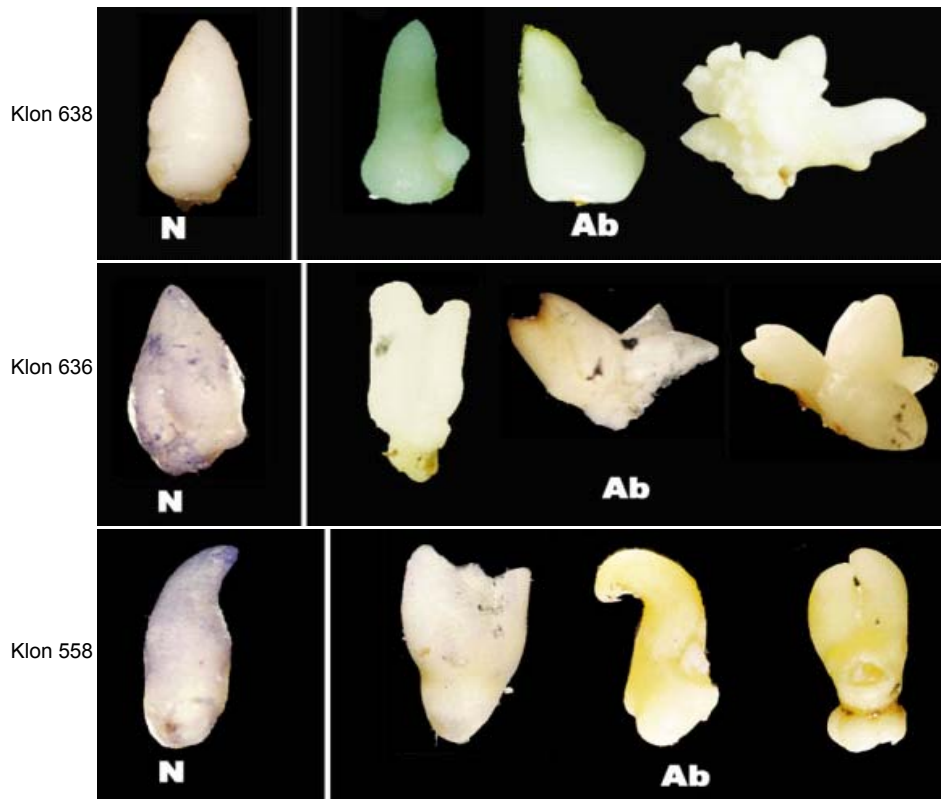
nyai bentuk bercabang (*zigzag*), permukaannya kasar dan tidak polar.

Variasi embrio somatik pada tahap kotiledon mempunyai bentuk yang sangat beragam (Gambar 3). Perubahan perkembangan embrio somatik pada tahap kotiledon sangat dipengaruhi oleh tahap perkembangan dari globular dan hati scutellar. Pada tahap kotiledon terlihat bentuk yang bergerombol, yaitu tidak terpisah satu sama lain, juga memiliki penonjolan ke kanan, ada yang berbentuk bunga dan memiliki kotiledon lebih dari satu. Variasi bentuk yang sangat beragam ini dapat disebabkan penggunaan zat pengatur tumbuh 2,4-D (100 mg/l) yang tinggi sewaktu inisiasi kalus dari eksplan. Zat pengatur tumbuh merupakan pengatur perkembangan tanaman.

Pengaruh 2,4-D dalam menginduksi embrioso- matik sangat baik (Dudits *et al.* 1991, Yeung 1995). 2,4-D mempunyai peranan sebagai pusat memediasi



Gambar 2. Karakterisasi abnormalitas embrio somatik tahap hati scutellar, N (normal) dan Ab (abnormal).



Gambar 3. Karakterisasi abnormalitas morfologi embrio somatik pada tahap kotiledon, N (normal) dan Ab (abnormal).

transduksi signal untuk ekspresi gen. Hasil pembelahan sel yang diinduksi dari pertumbuhan kalus yang tidak terorganisasi atau awal pertumbuhan polarisasi merupakan proses pembentukan embrio somatik. Kemampuan induksi embriogenik tergantung pada bermacam-macam sensitivitas dari sel (Dudits *et al.* 1991). Ada dua mekanisme yang penting dalam pembentukan sel embriogenik, yaitu pembelahan sel asimetrik dan kontrol pemanjangan sel (De Jong *et al.* 1993, Emons 1994). Pembelahan sel asimetrik didorong oleh zat pengatur tumbuh yang mengubah polaritas sel melalui interferensi gradien pH (Smith dan Krikorian 1990).

Perkembangan embrio somatik pada tahap kotiledon dari masing-masing klon menghasilkan bentuk, ukuran, dan permukaan kotiledon yang bervariasi. Ada bentuk kotiledon pada bagian ujung (*shoot*) mempunyai bentuk seperti *zigzag*, runcing, bengkok, di kotiledon (Gambar 3). Morfologi embrio somatik yang dihasilkan 3 klon pada masing-masing tahapan baik tahap globular, hati scutellar, dan kotiledon memperlihatkan bentuk yang sangat bervariasi (Gambar 1, 2, dan 3).

Menurut Jurgens *et al.* (1991) bahwa hasil pemanjangan pada vascular primordium dan pembelahan sel paralel dapat memperbesar permukaan apikal dari bagian embrio yang berperan penting untuk pembentukan primordia secara lateral pada kotiledon, yang ditandai pembentukan hati scutellar. Selama transisi dari tahap globular ke hati, simetri bilateral terbentuk untuk inisiasi kotiledon.

Variasi fenotipik pada embrio somatik ditentukan faktor genetik dan epigenetik. Variasi somaklonal didefinisikan sebagai genetik dan variasi fenotipik di antara propagasi tanaman secara klon yang berasal dari sumber satu klon (Lee dan Phillips 1988, Duncan 1997, Veillux dan Johnson 1998, Olhoft dan Phillips 1999). Penyebab variasi somaklonal melalui proses kultur jaringan juga dapat dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Aspek epigenetik dari variasi somaklonal terjadi melalui mekanisme *silencing* gen atau inaktivasi gen dan bukan karena aberasi kromosom atau perubahan sekuens. Perubahan ini mungkin tidak stabil atau dapat kembali secara somatik (Patterson *et al.* 1993, Cubas *et al.* 1999).

KESIMPULAN

Karakterisasi morfologi dari embrio somatik kelapa sawit dari tahap globular, hati scutellar, dan kotiledon menghasilkan variasi yang sangat besar. Tingkat persentase abnormalitas embrio somatik pada

klon 638 (27%), klon 636 (30%), dan klon 558 (46%). Karakterisasi normal dan abnormal dari klon 638, 636, dan 558 pada masing-masing tahapan berbeda. Embrio somatik tahap globular normal mempunyai bentuk bulat dan bipolar sedangkan abnormal berbentuk lonjong, bulat tidak beraturan, dan tidak bipolar. Tahap hati normal mempunyai bidang polarisasi sel asimetri sedangkan hati abnormal memiliki bidang polarisasi tidak simetri. Tahap kotiledon normal memiliki satu kotiledon sedangkan abnormal memiliki lebih dari satu kotiledon.

Bentuk morfologi embrio somatik yang abnormal bisa terjadi disebabkan faktor genetik atau epigenetik. Perubahan genetik karena perubahan set kromosom, jumlah kromosom, struktur kromosom atau gen. Ekspresi dari karakter tersebut dapat ditingkat morfologi, fisiologi, dan biokimia.

DAFTAR PUSTAKA

- Cubas, P., C. Vincent, and E. Coen. 1999. An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry. *Nature* 401:157-161.
- D'Amato, F. 1986. Cytogenetic of plant cell and tissue cultures and their regenerates. *CRC* 3:73-112.
- Deambrogio, E. and P.I. Dale. 1980. Effect of 2,4-D on the frequency of regenerated plant in barley (*Hordeum vulgare*) cultivar 'Akka' and on genetic variability between Them. *Cereal Res. Commun.* 8:417-424.
- de Fossard, R.A., A. Myint, and E.C.M. Lee. 1974. A broad spectrum tissue culture experiment with tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) pith tissue callus. *Physiol. Plant.* 30:125-130.
- De Jong, A.J., E.D.L. Schmidt, and S.C. de Vries. 1993. Early events in higher plant embryogenesis. *Plant Mol. Biol.* 22:367-377.
- Dudits D., L. Bogre, and J. Gyorgyey. 1991. Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells *in vitro*. *J. Cell. Sci.* 99:475-484.
- Duncan, R.R. 1997. Tissue culture-induced variation and crop improvement. *Adv. Agron.* 58:201-240.
- Duval Y., F. Aberlenc, and B. de Touchet. 1993. Use of embriogenic suspension for oil palm micropropagation. *In Rao et al. (Eds.). Recent Dev in Oil Palm Tissue Culture and Biotechnology.* p. 38-47.
- Emons A.M.C. 1994. Somatic embryogenesis: Cell biological aspects. *Acta Bot. Neerl.* 43:1-4.
- Evans, D.A, W.R. Sharp, and P.V. Amimirato. 1986. Somaclonal and gametoclonal variation. *Handbook of Plant Cell Culture* 4:97-132.

- Ginting, G. dan Fatmawati. 1997.** Suspensi sel pada kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.). Jurnal Penelitian Kelapa Sawit 5(3):153-160.
- Goldsworthy, A. and M.G. Mina. 1991.** Electrical patterns of tobacco cells in media containing indole-3-acetic acid or 2,4-D. *Planta* 183:386-373.
- Griffiths, A.J.F., Suzuki, J.H. Miller, and R.C. Lewontin. 1993.** An introduction to genetic analysis. Fifth Edition. W.H. Freeman and Co. 840 p.
- Ignacimuthu, S. 1997.** Plant biotechnology. Science Publisher. Inc. 284 p.
- Jurgens, G., U. Mayer, R.A. Torrez-Ruiz, T. Berleth, and S. Misera. 1991.** Genetic analysis of pattern formation in the arabidopsis embryo. *Development (supplement)* 1:27-38.
- Kysely, W. and H.J. Jacobsen. 1990.** Somatic embryogenesis from pea embryos and shoot apices. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 20:7-14.
- Kumar, A. 1995.** Somaklonal variation and molecular genetics department. Scottish Crop Research Institute, Invergowrie Dundee. Canada. p. 197-212.
- Kutschera, A. 1994.** The current status of the acid-growth hypothesis. *New Phytol.* 126:549-569.
- Larkin, P.J. and W.R. Scowcroft. 1981.** Somaclonal variation—a novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theor. Appl. Gen.* 60:197-214.
- Lee, M.L. and R.L. Phillips. 1988.** The Chromosomal basis of somaclonal variation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39:413-437.
- Natesh, S. and M.A. Rau. 1984.** The embryo. *In* Johri, B.H. (Ed.). *Embryology of Angiosperms*. New York. Springer-Verlag. p. 377-443.
- Olhoft, P.M. and R.L. Phillips. 1999.** Genetic and epigenetic instability in tissue culture and regenerated progenies. *In* Lerner, H.R. (Ed.). *Plant Responses to Environment Stresses: from Phytohormones to Genome Reorganization*. Marcel Dekker, New York. p. 111-148.
- Paranjothy, K., R. Othman, C.C. Tan, G. Wang, and A.C. Soh. 1993.** Incidence of abnormalities in relation to *in vitro* protocols. *In* Rao *et al.* (Eds.). *Recent Dev in Oil Palm Tissue Culture and Biotechnology*. p. 131-141.
- Patterson, G.I., C.J. Thorpe, and V.L. Chandler. 1993.** Paramutation, an allelic interaction, is associated with a stable and heritable reduction of transcription of maize regulatory gene. *Genetics* 135:881-894.
- Pierik, L.L.M. 1987.** *In vitro* cultures of hinger plant. Martinus-Nijhoff Publ. Dordrecht. Netherlands. 344 p.
- Phillips, R.L., D.J. Plunkett, and S.M. Kaeppeler. 1990.** Do we understand somaclonal variation?. *In* Nijkamp *et al.* (Eds.). *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*. Proc. 7th Internat. Cong. Plant Tiss. Cell Cult. p. 131-141.
- Reinert, J. 1958.** Untersuchungen über die morphogenese an gewebe-kulturen. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 71:15.
- Schwendiman, J., C. Panetier, and N. Michaux-Ferriere. 1988.** Histology of somatic embryogenesis from leaf explant of oil palm *Elaeis guineensis*. *Ann. Bot.* 62:43-52.
- Skirvin, R.M., K.D. McPheeters, and M. Norton. 1993.** Source and frequency of somaclonal variation. *Hort. Sci.* 29:1232-1237.
- Smith, D.L. and A.D. Krikorian. 1990.** pH control of carrot somatic embryogenesis. *Nijkamp et al. (Eds.). Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. p. 449-453.
- Sumaryono, N. Mardiana, and J.S. Tahardi. 1994.** Embryogenesis from cell suspension culture of oil palm. *Menara Perkebunan* 62(3):41-46.
- Tahardi J.S. 1998a.** Somatic embryogenesis from cell suspension culture of oil palm. *In* Tahardi *et al.* (Eds.). Proc. BTIG Workshop on Oil Palm Improvement through Biotechnology, Bogor, Indonesia. p. 27-32.
- Tahardi, J.S. 1998b.** Somatic embryogenesis from cell suspension culture of oil palm. *In* Tahardi *et al.* (Eds.). Proc. BTIG Workshop on Oil Palm Improvement through Biotechnology, Bogor. Indonesia. p. 27-32.
- Tahardi, J.S. 1999.** Characteristics of embryogenic cells of oil palm in bioreactor cultures. *Jurnal Bioteknologi Pertanian* 4(2):49-55.
- Tahardi, J.S., I. Riyadi, and W.A. Dodd. 2003.** Enhancement of somatic embryo development and plantlet recovery in *Camellia sinensis* by temporary liquid immersion. *Jurnal Bioteknologi Pertanian* 8(1):1-7.
- Teixeira, J.B., M.R. Sondahl, T. Nakamura, and E.G. Kirby. 1995.** Establishment of oil palm cell suspension and plant regeneration. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 40:105-115.
- Touchet, B., C. Pannetier, and de, Y. Duval. 1991.** Plant regeneration from embryogenic suspension culture of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Plant Cell Rep.* 10:529-532.
- Van Harten, A.M. 1998.** Mutation breeding. Theory and Practical Applications. Cambridge Univ. Press.
- Veilleux, R.E. and A.T. Johnson. 1998.** Somaclonal variation; molecular analysis, transformation interaction and utilization. *Plant Breed. Rev.* 16:229-268.
- Wattimena, A.G. 1992.** Bioteknologi tanaman. Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman. Pusat Antar Universitas, Institut Pertanian Bogor. 309 hlm.
- Williams, E. and G. Maheswaran. 1986.** Somatic embryogenesis; factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. *Ann. Bot.* 57:443-462.

Yeung, E.C. 1995. Structural and developmental pattern in somatic embryogenesis. *In* Thorpe, T.A. (Ed.). Embryogenesis in Plants. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston, London. p. 205-247.

Zimmerman, J.L. 1993. Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *Plant Cell* 5:1411-1423.
