

Regenerasi Massa Sel Embrionik Tanaman Kedelai setelah Diseleksi dengan Al dan pH Rendah

Sri Hutami, I. Mariska, M. Kosmiatin, S. Rahayu, dan W.H. Adil

Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor

ABSTRAK

Varietas kedelai yang adaptif terhadap lahan masam jumlahnya terbatas. Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk mendapatkan genotipe baru yang toleran lahan masam ialah melalui seleksi *in vitro*. Massa sel yang dihasilkan dari eksplan (kotiledon atau embrio zigotik muda) diseleksi dengan $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ (0-500 ppm) dan pH 4. Varietas yang digunakan adalah Wilis, Sindoro, dan Slamet. Media Murashige dan Skoog dimodifikasi, yaitu konsentrasi beberapa garam makro diturunkan dan Fe yang digunakan tidak *dichelate*. Untuk lebih meningkatkan keragaman genetik, eksplan diradiasi (0-400 rad) kemudian di-ulang kembali dengan dosis yang ditingkatkan, yaitu 5 dan 10 krad. Hasil penelitian menunjukkan bahwa varietas Willis yang diradiasi 400 rad setelah diseleksi dengan Al dan pH rendah menghasilkan benih somatik paling banyak (69) diikuti varietas Sindoro (55). Varietas Slamet yang diradiasi 400 rad kemudian di-seleksi dengan Al dan pH rendah membentuk benih somatik paling sedikit (13). Dosis radiasi yang tinggi menyebabkan kematian pada massa sel yang diseleksi. Proses pendewasaan dan perkecambahan tidak terbentuk secara serempak.

Kata kunci: *Glycine max*, seleksi *in vitro*, lahan masam, aluminium, massa sel

ABSTRACT

Soybean variety adapted to acid soil is still limited. One of efforts of producing new genotypes tolerant to acid soil is *in vitro* selection. Cell mass produced from explants (cotyledone or young zygotic) were selected by treating them with $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ (0-500 ppm) in pH 4. Varieties used in this study were Wilis, Sindoro, and Slamet. Culture medium used was Murashige and Skoog modified by reducing some macro nutrient and Fe was not chelated. To increase genetic variability the explants were irradiated (0-400 rad) and reirradiated with 5 or 10 krad. Results showed that Wilis irradiated with 400 rad and selected with Al in low pH produced the largest number of somatic seed (69) followed by Sindoro (55). The variety Slamet irradiated with 400 rad and selected with Al in low pH produced the least somatic seed (13). High irradiation intensity resulted in the cell mass killed after selection. Maturation and germination processes were not uniformly developed.

Key words: *Glycine max*, selection *in vitro*, acid soil, aluminum, cell mass

PENDAHULUAN

Kedelai (*Glycine max* L. Merr.) merupakan sumber bahan baku utama bagi kelangsungan berbagai industri antara lain tempe dan tahu. Pasokan kedelai nasional sampai saat ini hanya mampu memenuhi sekitar 10% dari total kebutuhan sehingga sisanya 90% harus diimpor. Salah satu upaya yang

dapat dilakukan adalah memanfaatkan lahan masam yang luasnya mencapai 101.519 ha (Sudjadi, 1984). Pada tanah masam, kelarutan Al meningkat (Marschner, 1986) sehingga menghambat pertumbuhan kedelai (Delhaize dan Ryan, 1995). Kendala umum yang dijumpai pada lahan masam, antara lain pH rendah (3,5-5), Al tinggi, miskin unsur hara N, P, K, Ca, Mg, dan Mo, serta menurunnya beberapa aktivitas mikro-organisme penting. Dengan demikian, tanah masam yang banyak mengandung aluminium dapat menjadi racun bagi pertumbuhan tanaman. Gejala umum yang dijumpai ialah sistem perakarannya yang tidak berkembang (pendek dan tebal) karena proses pemanjangan sel terhambat dan rusaknya plasmalema sel akar (Ishikawa dan Wagatsuma, 1998). Sampai saat ini, jumlah varietas kedelai yang tahan terhadap lahan masam sangat terbatas. Untuk meningkatkan keragaman genetik tanaman kedelai khususnya keragaman ketahanan terhadap Al, dapat digunakan teknologi alternatif, yaitu seleksi *in vitro*. Mutasi spontan dapat terjadi pada tingkat sel dan perubahan sifat genetik dapat ditingkatkan dengan pemberian mutagen baik secara fisik maupun kimia serta perlakuan faktor lain seperti komposisi media, penggunaan sel yang tidak terdiferensiasi, serta zat pengatur tumbuh (antara lain 2,4-D) yang banyak dilaporkan dapat menyebabkan mutasi.

Seleksi *in vitro* merupakan salah satu metode variasi somaklonal namun hasilnya lebih efektif dan efisien karena penjarangan sifat dilakukan lebih terarah. Untuk mendapatkan varietas baru yang tahan lahan masam digunakan $AlCl_3$ sebagai komponen seleksi dengan kemasaman media yang rendah (sekitar 4) (Short *et al.*, 1987). Metode tersebut telah dilakukan pada tanaman tomat dan kentang (Starvarek dan Rains, 1984), sorgum (Smith *et al.*, 1983), wortel (Ojima dan Ohira, 1986), tembakau (Yamamoto *et al.*, 1994), dan padi (Van Sint Jan *et al.*, 1997). Masalah yang sering dihadapi pada seleksi *in vitro* adalah sulitnya meregenerasikan massa sel yang tahan Al dan pH rendah. Mariska *et al.* (1999) telah berhasil mendapatkan metode embriogenesis somatik pada beberapa varietas kedelai dengan keberhasilan yang relatif lebih tinggi. Dari 10 varietas kedelai yang diteliti, diperoleh empat varietas (Wilis, Tambora, Black Manchu, dan Argomulyo) yang lebih bersifat embriogenik daripada varietas lainnya. Di samping itu, terdapat beberapa formulasi media yang lebih efektif dalam menginduksi regenerasi melalui jalur embriogenesis somatik. Dari penelitian tahun 1999/2000 telah diperoleh struktur embrio somatik yang berasal dari massa sel yang diseleksi dengan Al dan pH rendah. Varietas yang diuji terdiri dari Wilis, Sindoro, dan Slamet (Mariska *et al.*, 2000). Pembentukan embrio somatik dewasa tidak terjadi secara serentak dan benih somatik yang dihasilkan jumlahnya relatif masih rendah.

Untuk memantapkan metode tersebut, kegiatan perlu diulang agar diperoleh populasi yang tinggi. Dengan populasi yang tinggi maka keragaman genetik akan meningkat dan kemungkinan keberhasilan seleksi akan lebih besar. Langkah selanjutnya ialah dengan aklimatisasi bibit somatik yang

dihasilkan. Sasaran yang dituju adalah populasi tanaman dengan keragaman genetik yang tinggi, sehingga diperoleh individu baru yang mempunyai sifat menguntungkan untuk dikembangkan.

Tujuan penelitian ialah untuk mendapatkan metode produksi struktur embrio somatik dan benih somatik dari beberapa varietas kedelai hasil regenerasi massa sel yang tahan Al dan pH rendah.

BAHAN DAN METODE

Varietas yang digunakan dalam penelitian ini adalah Wilis, Slamet, dan Sindoro. Percobaan terdiri dari dua macam. Percobaan pertama, eksplan embrio zigotik muda diradiasi sinar gamma dengan dosis 0 dan 400 rad dan percobaan kedua diradiasi dengan dosis yang ditingkatkan, yaitu 0, 400 rad, 5 krad, dan 10 krad. Setelah radiasi, eksplan dikulturkan pada media M4C (Hutami *et al.*, 1999). Kalus embriogenik yang terbentuk kemudian diseleksi pada media M4C yang diberi $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0, 100, 200, 300, 400, dan 500 ppm) dengan pH media 4. Media M4C yang digunakan merupakan modifikasi, yaitu konsentrasi NH_4NO_3 ditingkatkan serta $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan KH_2PO_4 diturunkan serendah mungkin. Di samping itu, ion Fe tidak *dichelate* oleh EDTA. Modifikasi tersebut dilakukan untuk menimbulkan sifat toksik dari Al. Setelah seleksi selama 1-2 bulan, embrio somatik yang terbentuk dalam media seleksi dipindahkan pada media pendewasaan (MSo atau MS + sitokinin 0,3 mg/l). Untuk tahap perkecambahan maka embrio somatik dewasa dipisahkan satu sama lain dan disubkultur kembali pada media yang sama atau konsentrasi sitokininnya direndahkan.

Benih somatik yang tumbuhnya tegar kemudian diaklimatisasi dengan media tumbuh campuran kompos dengan tanah di rumah kaca.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua varietas yang dicoba mampu membentuk struktur embrio somatik hanya persentase keberhasilannya berbeda (Tabel 1).

Radiasi 400 rad dapat meningkatkan kemampuan produksi embrio somatik pada varietas Wilis dan Sindoro sedangkan perlakuan radiasi pada varietas Slamet menurunkan kemampuan eksplan membentuk struktur embrio somatik. Sifat embriogenik varietas Wilis meningkat dari 26,3% menjadi 76,0% bila eksplan diradiasi 400 rad. Demikian pula varietas Sindoro, dengan radiasi persentase eksplan membentuk embrio somatik 55,3%, sedangkan tanpa radiasi hanya 27,1%. Eksplan varietas Wilis yang tidak diradiasi dapat membentuk kalus yang lebih besar dibandingkan dengan varietas Sindoro dan Slamet. Pertumbuhan kalus yang cepat menurunkan daya regenerasi membentuk embrio somatik. Radiasi 400 rad pada varietas Slamet dapat menyebabkan tunas terminal berubah menjadi hitam dan umumnya eksplan tidak mampu menghasilkan kalus.

Kemampuan regenerasi yang meningkat karena radiasi sering pula ditemukan pada tanaman lain, terutama dengan dosis radiasi yang relatif rendah. Kondisi ini dimungkinkan karena adanya penurunan kemampuan sekumpulan sel pada daerah embriogenik yang dapat menyebabkan meningkatnya aktivitas sekumpulan sel lainnya (Ichikawa dan Ikoshima, 1967).

Dengan perlakuan radiasi 400 rad, persentase eksplan membentuk embrio somatik paling tinggi berasal dari varietas Wilis (76%) diikuti varietas Sindoro (55,3%) dan paling rendah berasal dari varietas Slamet (23,6%).

Embrio somatik (globular, hati) yang paling banyak terbentuk dari perlakuan radiasi 400 rad berasal dari varietas Wilis (201) dan paling sedikit (49) dari varietas Slamet (Tabel 2). Tanpa radiasi, eksplan varietas Slamet lebih bersifat embriogenik dibandingkan dengan varietas Wilis dan Sindoro. Dengan radiasi jumlah embrio somatik pada varietas Wilis meningkat 3½ kali dibandingkan dengan kontrol, menurun ½ kali pada varietas Slamet, dan tiga kali lebih banyak daripada kontrol pada varietas Sindoro.

Struktur embrio somatik yang diseleksi pada media yang mengandung

Tabel 1. Persentase eksplan beberapa varietas kedelai yang membentuk struktur embrio somatik umur 6 minggu

Varietas/radiasi	Persentase eksplan membentuk embrio somatik
Wilis	
0 rad	26,3
400 rad	76,0
Slamet	
0 rad	23,6
400 rad	23,6
Sindoro	
0 rad	27,1
400 rad	55,3
400 rad	146/264

Tabel 2. Jumlah struktur embrio somatik yang terbentuk dari beberapa varietas kedelai umur 6 minggu

Varietas/radiasi	Jumlah embrio somatik/jumlah eksplan
Wilis	
0 rad	49/207
400 rad	201/264
Slamet	
0 rad	35,5
400 rad	80/225
Sindoro	
0 rad	49/207
400 rad	27,1
400 rad	57/230
400 rad	146/264

Tabel 3. Jumlah struktur embrio somatik yang terbentuk pada media seleksi

Varietas/radiasi	Jumlah benih somatik						Jumlah
	AI 0	AI 100	AI 200	AI 300	AI 400	AI 500	
Wilis							
Kontrol	12	10	7	4	6	7	46
400 rad	132	105	67	52	42	48	448
Sindoro							
Kontrol	10	9	6	8	7	6	45
400 rad	62	69	25	25	23	21	224
Slamet							
Kontrol	23	20	14	15	10	10	92
400 rad	14	9	13	10	6	8	50

Al dan pH rendah ada yang mampu berploriferasi, terutama dengan perlakuan radiasi 400 rad pada varietas Wilis dan Sindoro (Tabel 3). Kemampuan perkembangan embrio somatik varietas Slamet yang tidak diradiasi lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol varietas Wilis dan Sindoro.

Kondisi stres yang disebabkan Al menyebabkan kemampuan tumbuh dan berkembangnya sel somatik menurun. Demikian pula pada sel tembakau yang telah diseleksi dengan Al sulit beregenerasi (Yamamoto *et al.*, 1994). Walaupun demikian, pada semua taraf konsentrasi Al yang dicoba, sel somatik kedelai dari semua varietas yang diuji dapat berkembang membentuk embrio somatik.

Menurut Taylor (1995) tetap berkembangnya sel embrio somatik pada media Al dan pH rendah menunjukkan adanya sifat ketahanan pada tingkat sel. Demikian pula menurut Rath (1996) bahwa hanya sel toleran yang mampu hidup bila diinkubasi pada media yang mengandung komponen seleksi. Seleksi pada tingkat sel merupakan teknologi potensial untuk menghasilkan genotipe baru yang adaptif terhadap cekaman lingkungan (Adkins *et al.*, 1995; Bertin *et al.*, 1995). Adanya perubahan sifat genetik pada kultur *in vitro* telah diperoleh sejak 30 tahun yang lalu (Mitra dan Steward, 1961; Larkin dan Scrowcroft, 1981).

Semakin meningkat konsentrasi Al maka kemampuan perkembangan embrio somatik semakin menurun, sejalan dengan hasil penelitian seleksi *in vitro* pada padi. Menurut Vant Sint Jan *et al.* (1997), memberikan kondisi stres dengan konsentrasi Al yang tinggi menguntungkan karena stres dapat menurunkan jumlah tanaman yang akan diseleksi secara *in vivo* sehingga merupakan seleksi yang bertahap.

Struktur torpedo yang terbentuk pada media seleksi, kemudian dikedambahkan pada media baru. Proses pendewasaan dan perkecambahan tidak terjadi secara serempak karena jumlah benih somatik pada setiap konsentrasi Al berkurang (Tabel 4) dibandingkan dengan jumlah embrio somatik awal (Tabel 3). Benih somatik hasil seleksi dengan perlakuan radiasi 400 rad paling banyak, yaitu 69 berasal dari varietas Wilis diikuti varietas

Sindoro sebanyak 55, dan paling sedikit (13) berasal dari varietas Slamet. Benih somatik yang dihasilkan varietas Slamet tanpa radiasi sebanyak 44. Untuk meningkatkan dan menyerempakkan pendewasaan dan perkecambahan maka akan dicoba komponen organik lain seperti yang digunakan oleh Merkle *et al.* (1995).

Untuk setiap taraf konsentrasi Al, jumlah benih somatik yang diperoleh sangat beragam. Benih somatik paling banyak berasal dari varietas Wilis dengan perlakuan radiasi 400 rad setelah diseleksi dengan Al 200 ppm sedangkan varietas Slamet dengan perlakuan yang sama belum menghasilkan benih somatik. Benih somatik yang terbentuk dari setiap media dengan pemberian stres beberapa taraf konsentrasi Al saat ini sedang diaklimatisasi di rumah kaca.

Tabel 4. Jumlah benih somatik setelah seleksi dengan Al pada media perkecambahan

Varietas/radiasi	Jumlah benih somatik (ppm)						Jumlah
	Al 0	Al 100	Al 200	Al 300	Al 400	Al 500	
Wilis							
Kontrol	3	16	8	1	7	4	39
400 rad	9	15	24	12	6	3	69
Sindoro							
Kontrol	0	0	3	0	1	1	5
400 rad	5	4	9	17	11	9	55
Slamet							
Kontrol	7	15	4	7	4	7	44
400 rad	3	2	1	1	0	6	13

Tabel 5. Persentase eksplan beberapa varietas kedelai yang membentuk struktur embrio somatik dan jumlahnya per eksplan, umur 6 minggu

Varietas/radiasi	Persentase eksplan membentuk embrio somatik	Jumlah embrio somatik/eksplan
Wilis		
0 rad	30	18/60
400 rad	55	33/60
5 krad	16,6	10/60
10 krad	0	0/60
Slamet		
0 rad	56,6	34/60
400 rad	26,6	16/60
5 krad	3	2/60
10 krad	0	0/60
Sindoro		
0 rad	25	15/60
400 rad	55	33/60
5 krad	3	2/60
10 krad	0	0/60

Asencion *et al.* (1997) mendapatkan varietas baru kedelai hasil perlakuan radiasi sinar gamma pada embrio zigotik dengan dosis antara 20-25 krad. Demikian pula di Korea telah dihasilkan mutan baru tanaman kedelai yang berasal dari perlakuan radiasi sinar gamma 15-20 krad. Mutan yang diperoleh mempunyai karakter yang lebih baik dan telah banyak digunakan oleh petani setempat (Kany, 1997). Untuk itu, pada kegiatan penelitian selanjutnya dicoba perlakuan radiasi tetapi dengan dosis yang ditingkatkan (Tabel 5). Kombinasi seleksi *in vitro* (pemberian kondisi stres) dengan perlakuan radiasi sinar gamma (3-14 krad) telah dilakukan oleh Tepper dan Ashri (1991).

Dosis radiasi sinar gamma yang tinggi (10 krad) dapat menyebabkan kematian pada eksplan embrio zigotik muda. Dari ketiga varietas yang diuji tidak ada satu-pun eksplan yang dapat membentuk embrio somatik. Untuk perlakuan 5 krad, per-sentase eksplan yang membentuk embrio somatik juga rendah bila dibandingkan dengan kontrol dan 400 rad. Dengan demikian, embrio zigotik muda dari ketiga varietas yang dicoba sangat peka terhadap dosis radiasi yang tinggi. Jumlah embrio somatik yang paling banyak terbentuk, yaitu 33 berasal dari varietas Wilis dan Sindoro yang diradiasi 400 rad.

Embrio somatik yang berasal dari perlakuan 5 krad tidak ada satupun yang dapat berkembang membentuk embrio somatik dewasa (Tabel 6). Berbeda dengan pemberian dosis radiasi yang rendah (400 rad) terutama pada varietas Wilis jumlah embrio somatik dewasa yang terbentuk cukup tinggi, yaitu 51. Jumlah embrio somatik yang terbentuk dari varietas Sindoro tanpa radiasi sebanyak 40 yang berarti lebih tinggi dibandingkan dengan radiasi 400 rad, yaitu 18. Jumlah embrio somatik yang terbentuk dari setiap perlakuan konsentrasi Al beragam dan umumnya lebih banyak dihasilkan dari kontrol (Al 0 ppm). Berbeda dengan varietas Slamet, antara kontrol dan beberapa taraf konsentrasi Al (400 dan 500 ppm) jumlahnya sama. Secara visual terlihat bahwa proses pendewasaan tidak terjadi secara serempak bahkan beberapa biakan torpedo dengan cepat berkembang membentuk benih somatik. Pembentukan benih somatik yang cepat dapat menyebabkan ketidakseimbangan pertumbuhan antara tunas dan akar atau benih somatiknya tidak normal.

Struktur embrio somatik dewasa yang dihasilkan, saat ini sedang dikulturkan pada media perkecambahan. Apabila benih somatik sudah terbentuk maka tahap selanjutnya akan dilakukan aklimatisasi di rumah kaca.

KESIMPULAN

1. Massa sel embrionik yang diseleksi dengan AI dan pH rendah dapat di-regenerasikan membentuk benih somatik.
2. Varietas Wilis yang diradiasi sinar gamma sebesar 400 rad mempunyai kapasitas regenerasi yang lebih tinggi daripada varietas Sindoro dan Slamet. Radiasi dosis tinggi (5 dan 10 krad) menyebabkan kematian pada massa sel yang di-seleksi.
3. Proses pendewasaan dan perkecambahan embrio somatik hasil seleksi belum terjadi secara serempak.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Saudara Sri Utami, Mujiman, Joko Tamami, Wawan Sukmawan, Saefudin, Bertha, Ismijatun, Sanusi, Tatang, Marnah, dan Wawan Darmawan yang telah membantu dalam pembuatan media, aklimatisasi, dan pengumpulan data.

DAFTAR PUSTAKA

Tabel 6. Jumlah struktur embrio somatik yang terbentuk pada media seleksi

Varietas/radiasi	Jumlah benih somatik						Jumlah
	AI 0	AI 100	AI 200	AI 300	AI 400	AI 500	
Wilis							
0 rad	7	5	4	4	3	2	25
400 rad	14	12	12	7	5	1	51
5 krad	0	0	0	0	0	0	0
10 krad	0	0	0	0	0	0	0
Sindoro							
0 rad	10	10	6	5	5	4	40
400 rad	3	2	3	2	3	5	18
5 krad	0	0	0	0	0	0	0
10 krad	0	0	0	0	0	0	0
Slamet							
0 rad	4	3	2	2	4	5	20
400 rad	5	5	4	2	4	5	25
5 krad	0	0	0	0	0	0	0
10 krad	0	0	0	0	0	0	0

- Adkins, S.W., R. Kunanuvatchaidach, and I.D. Godwin. 1995.** Somaclonal variation in rice. Drought tolerance and other agronomic characters. *Aust. J. Bot.* 43:201-209.
- Asencion, A.B., A. Barrida, I.S. Santos, and F.I. Medina. 1997.** Improvement of soybean through mutation breeding. Proc. Seminar on Mutation Breeding in Oil and Industrial Crops for Regional Nuclear Cooperation in Asia. RDA and Japan Atomic Industrial Forum, October 12-18. Suwon, Korea.
- Bertin, P.J., M. Kinet, and J. Boucharmont. 1995.** Heritable chilling tolerance improvement in rice through somaclonal variation and cell line selection. *Aust. J. Bot.* 214:91-105.
- Delhaize, E. and P.R. Ryan. 1995.** Aluminum toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiol.* 107:315-321.
- Hutami, S., I. Mariska, M. Kosmiatin, A. Husni, W.H. Adil, dan Y. Supriati. 1999.** Regenerasi dan seleksi *in vitro* untuk mendapatkan sifat ketahanan terhadap aluminium pada tanaman kedelai. Laporan Hasil Penelitian Balitbio Bogor.
- Ichikawa, S. and I. Ikoshima. 1967.** A development study of diploid oats by means of radiation induced somatic mutation. *Rad. Bot.* 7:205-215.
- Ishikawa, S. and T. Wagatsuma. 1998.** Plasma membrane permeability of root-tip cells following temporary exposure to Al ions a rapid measure of Al tolerance among plant species. *Plant Cell Physiol.* 39(5):526-525.
- Kany, C. 1997.** Progress and prospects of oil seed and industrial crops mutation breeding in Korea. Proc. Seminar on Mutation Breeding in Oil and Industrial Crops for Regional Nuclear Cooperation in Asia. RDA and Japan Atomic Industrial Forum, October 12-18. Suwon, Korea.
- Larkin, P.J. and W.R. Scrowcroft. 1981.** Somaclonal variant, a novel source of variability from cell culture improvement. *Theoretical Applied Genetic* 60:197-214.
- Mariska, I., Hobir, M. Tombe, A. Husni, M. Kosmiatin, dan I. Roostika. 1999.** Regenerasi kalus panili yang tahan fusaric acid dan pengujian bibit hasil seleksi *in vitro*. Dalam Pemanfaatan Kultur *In Vitro* untuk Meningkatkan Keragaman Genetik Panili, Lada, dan Jahe. Laporan Hasil Penelitian Balitbio Bogor.
- Mariska I., Hobir, M. Tombe, D. Manohara, S. Hutami, W.H. Adil, E. Gati, R. Purnamaningsih, D. Sukmadjaya, M. Kosmiatin, A. Husni, dan S. Rahayu. 2000.** Peningkatan keragaman genetik melalui seleksi *in vitro* dan keragaman somaklonal untuk ketahanan terhadap faktor biotik dan abiotik. Laporan Hasil Penelitian Balitbio Bogor.

- Marschner, H. 1986.** Mineral Nutrition in Higher Plants. Academic Press. Inc. London. 674 p.
- Mitra, I. and F. Steward. 1961.** Growth induced in culture, of *Haplopappus gracilis*. II. The behaviour of the nucleus. Amer. J. Bot. 48:358-368.
- Merkle, S.A., W.A. Parrot, and B.S. Flinn. 1995.** Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In Thorpe, T.A. (Ed.). *In Vitro* Embryogenesis in Plants. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. p. 155-203.
- Ojima, K. and K. Ohira. 1986.** Characterization and regeneration of aluminum tolerant variant from carrot cell culture. Jap. Ann. Plant Tissue Culture. Tokyo.
- Rath, I. 1996.** Selection of plants for resistance against phytotoxis, agricultural chemicals and antimetabolites using *in vitro* techniques. *Dalam* Kedelai. Prosiding Badan Litbang Pertanian. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan. hlm. 1-10.
- Short, K.C.I. Warburton, and A.V. Roberts. 1987.** *In vitro* hardening of cultures cauliflower and chrysanthemum plantlets to humidity. Acta Hort. (2)120:329-324.
- Smith, R.H., S. Bhaskaran, and K. Scherts. 1983.** Sorghum plant regeneration from aluminum selection media. Plant Cell Rep. 2:129-132.
- Starvarek, S.Y. and D.W. Rains. 1984.** The development of tolerance cell to mineral stress. Hort. Sci. 19:377-382.
- Sudjadi, M. 1984.** Problem soil in Indonesia and their management. In Pricharda, L. (Ed.). Ecology Food and Fertility Tech. Center for Asia and Pasific Region. Taiwan.
- Taylor, G.J. 1995.** Overcoming barriers to understanding the cellular basis of aluminum resistance. Plant and Soil 171:89-103.
- Tepper, T.Z.V.M. and A. Ashri. 1991.** A simple rapid photometric estimation of the growth response of immobilized cells to fusaric acid and gamma radiation. Plant Cell Report 10:481-481.
- Van Sint Jan, V., C. Costa de Macedo, J.M. Kinet, and J. Bouharmont. 1997.** Selection of Al-resistant plants from a sensitive rice cultivar, using somaclonal variation, *in vitro*, and hydroponic cultures. Euphytica 97:303-310.
- Yamamoto, Y. Sanae R., Yi-Chieh, K. Ono, K. Monibu, and H. Matsumoto. 1994.** Quantitative estimation of aluminum toxicity in cultured tobacco cells. Corelation between Aluminum Uptake and Growth Inhibitor. Plant Cell Physiol. 35(4):575-583.