

PENGARUH PEPTON TERHADAP PERTUMBUHAN EMBRIO ANGGREK *Vanda tricolor* Lindley var. *Suavis* ASAL MERAPI SECARA *IN VITRO*

RIZKA RILIAN PUSPASARI, IKHSANUDIN NUR ROSYIDI, EKA FITRIANA CANDRA NINGRUM, ENDANG SEMIARTI

Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

ABSTRACT

Orchidaceae is a valuable ornamental plant in Indonesia's export commodities. The growth of orchid in nature is prolonged due to its microscopic size of the seed and has no endosperm. In the mass-production, an inducer is required to accelerate the growth in an in-vitro culture, one of which is peptone. The embryos used in this study is Merapi endemic orchid, the *Vanda tricolor* Lindley var. *Suavis*. This study aimed to determine the effect of peptone on the growth of eight weeks old of *Vanda tricolor* Lindley var. *Suavis* embryos and to determine the optimal peptone concentration to induce the growth of the orchid embryo. This experiment was conducted in the Biotechnology Laboratory of the Faculty of Biology Universitas Gadjah Mada from September to October 2016. The treatments applied in this study was a variety of peptone concentrations (0–3 g/L) in growth media to induce eight weeks old protocorm subcultures. The study measured the morphological development of protocorm to determine the effect. The results showed a positive effect of peptone on the growth of orchid embryos at the NP1 treatment concentration of 1 g/L. The growth reached the phase 6 with the rate measured about $6.85 \pm 0.001\%$ in the fourth week. This value was higher than the protocorm growth rate when it reached the phase 6 in the fourth week on the NP0 medium measured at $5.22 \pm 0.003\%$, on the medium NP2 at $1.15 \pm 0.002\%$, and on the medium NP3 at $1.02 \pm 0.001\%$. This result showed the effect of peptone concentration to induce the growth of *Vanda tricolor* Lindley var. *Suavis* embryo, but the excess concentration of peptone inhibited the growth of protocorm.

KEY WORDS: *In vitro*, Orchid, peptone, protocorm, *Vanda tricolor*

Corresponding author: ENDANG SEMIARTI | email: endsemiarti@ugm.ac.id

Submitted: 12-01-2018 | Accepted: 22-02-2018

PENDAHULUAN

Anggrek merupakan tanaman hortikultura yang mempunyai nilai ekonomi tinggi (Chugh *et al.*, 2009). Salah satu jenis anggrek yang potensial untuk dikembangkan yaitu *Vanda tricolor* Lindley var. *Suavis* Endemik Merapi. Anggrek *V. tricolor* merupakan tanaman monopodial dan epifit, dapat tumbuh baik di alam pada ketinggian 700–800 m di atas permukaan laut (Comber, 1990; Handoyo, 2010). Keunggulan dari *V. tricolor* yaitu tahan terhadap panas karena memiliki gen tahan panas sehingga jenis ini tetap tumbuh setelah terjadi erupsi Gunung Merapi pada tahun 2010. Meskipun demikian, anggrek jenis ini memiliki ukuran biji yang mikroskopis serta tidak mempunyai endosperm sebagai cadangan makanan. Keberhasilan perkecambahan biji *V. tricolor* di alam sangat rendah karena harus bersimbiosis dengan mikoriza untuk mendapatkan karbon sebagai sumber makanan. Oleh karena itu, konservasi sumber daya hayati anggrek *V. tricolor* dilakukan dengan mengecambahkan bijinya secara *in vitro* pada medium buatan (Semiarti *et al.*, 2007).

Kultur *in vitro* dapat dilakukan dengan 3 cara, yaitu pembentukan tunas adventif, proliferasi tunas lateral, dan embriogenesis somatik (Kosmiatin *et al.*, 2005). Setiap tunas yang dihasilkan dapat dijadikan sebagai sumber eksplan untuk penggandaan tunas selanjutnya, sehingga diperoleh tunas yang banyak dalam waktu yang relatif lebih singkat. Selain itu, kultur *in vitro* ini akan menghasilkan tanaman yang seragam dan bebas dari penyakit sehingga para ilmuwan mengembangkan teknik tersebut untuk berbagai penelitian (Razdan, 2003).

Pemberian medium perkecambahan yang tepat dapat terlihat pada embriogenesis zigotik anggrek (Zhang *et al.*, 2000). Perkembangan embrio zigotik umumnya terjadi dalam lima fase yaitu fase embrio anggrek sebelum ditanam, fase embrio membengkak, fase embrio tidak memiliki testa, fase ukuran embrio membesar, dan fase *Shoot Apical Meristem* (SAM) (Dwiyani *et al.*, 2012). Pengaruh medium tersebut dapat dianalisis secara kuantitatif maupun kualitatif. Analisis secara kuantitatif dapat dilakukan dengan pengamatan terbentuknya SAM (*Shoot Apical Meristem*) dan RAM (*Root Apical Meristem*) yang selanjutnya akan terdiferensiasi menjadi daun dan akar. Analisis secara kuantitatif dapat diukur dengan mengamati penambahan ukuran sel dalam setiap rentang hari tertentu (Hsiao *et al.*, 2011; Park, 2003).

Keberhasilan perkecambahan secara *in vitro* salah satunya ditentukan dengan pemberian nutrisi dalam jumlah dan perbandingan yang tepat pada medium kultur. Pemilihan medium kultur tergantung pada jenis tanaman, tujuan penelitian, serta perhitungan masing-masing peneliti. Sedangkan komposisi medium kultur dirancang secara khusus untuk setiap tujuan penelitian yang berbeda (Yu & Xu, 2007). Komponen medium kultur yang harus dipenuhi yaitu garam-garam anorganik, zat-zat organik, substansi organik kompleks, bahan pemat, pH, dan bahan tambahan lain. Substansi organik diperlukan dalam medium untuk membantu pertumbuhan eksplan, salah satunya adalah pepton. Pepton merupakan salah satu kelompok asam amino sistein yang memiliki karakteristik yaitu berwarna kuning, larut dalam air, bersifat asam, dan berbau seperti daging busuk (Nodine *et al.*, 2011; Yadav *et al.*, 2003).

Asam amino sistein dapat mempercepat pertumbuhan karena ikut berperan dalam pemecahan protein yang tersimpan, mengaktifkan protein untuk respon terhadap cekaman biotik dan abiotik, serta memprogram kematian sel untuk hipersensitif terhadap serangan patogen, diferensiasi elemen *tracheary*, dan *senescence organ* (Grudkowska & Zagdanska, 2004; Shekarriz *et al.*, 2014). Penggunaan pepton diketahui berperan sebagai sumber nitrogen bagi eksplan, germinasi biji, pembentukan *protocorm like body*, serta perkembangan *seedling* (Kauth *et al.*, 2008; Utami *et al.*, 2017). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pertumbuhan optimal embrio anggrek *V. tricolor* umur 8 minggu yang diinduksi dengan pepton secara *in vitro*.

METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, pada bulan September hingga Oktober 2016. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu berupa kultur *protocorm* anggrek endemik Gunung Merapi *Vanda tricolor* Lindley var. *Suavis* yang berumur 8 minggu. Media yang digunakan dalam kultur jaringan yaitu medium *New Phalaenopsis* (NP) (Islam *et al.*, 1998). Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu timbangan analitik, labu erlenmeyer, *magnetic stirrer*, cawan petri, spatula, gelas ukur, pH universal, autoklaf, *Laminar Air Flow* (LAF), scalpel, pinset, mikroskop, dan optilab.

Medium yang digunakan pada penelitian ini yaitu medium dasar NP tanpa perlakuan (NP0), medium NP dengan penambahan pepton 1 gr/L (NP1), medium NP dengan penambahan pepton 2 gr/L (NP2), dan medium NP dengan penambahan pepton 3 gr/L (NP3). Pembuatan medium dilakukan dengan menyiapkan akuades \pm 50 ml dalam erlenmeyer 500 ml, setiap komponen bahan kimia makronutrien dilarutkan satu persatu secara berurutan dan diaduk sampai homogen menggunakan *stirrer*, setelah itu ditambah dengan komponen mikronutrien, vitamin, stok besi, serta sukrosa, lalu ditambah dengan akuades hingga 400 ml. Medium dibagi menjadi 4 dalam erlenmeyer terpisah dan diukur pH larutan medium menggunakan pH universal hingga 5,2–6,0. Selanjutnya ditambahkan agar dan direbus hingga mendidih. Cawan petri dan medium disterilisasi dalam *autoclave* 121°C pada tekanan 1 atm selama 15 menit. Medium yang telah disterilisasi dituang ke dalam cawan petri di dalam LAF.

Protocorm yang telah berumur 8 minggu di-subkultur ke dalam medium kultur NP yang telah disiapkan dan diberi pembatas dengan ulangan sebanyak 5 kali, masing-masing ulangan terdiri dari 6 titik. Subkultur dilakukan di dalam LAF dengan membakar pinset yang telah disterilisasi di atas bunsen kemudian dicelupkan ke dalam botol berisi alkohol 70% dan dipanaskan sebentar dengan api bunsen. Pinset ditunggu hingga dingin atau ditempelkan ke tepi medium kultur, selanjutnya *protocorm* diambil dalam jumlah sedikit dan dipindahkan ke medium NP. Pinset dicelupkan ke dalam alkohol 70% dan dipanaskan kembali dengan api bunsen setiap akan melakukan subkultur *protocorm*. Cawan petri yang telah berisi subkultur *protocorm* ditutup dengan plastik *seal* dan disimpan dalam ruang sterilisasi.

Perubahan ukuran pada tiap fase perkembangan *protocorm* yang telah ditanam diamati setiap minggu selama empat minggu menggunakan mikroskop (Tabel 1).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perkembangan *protocorm V. tricolor* varietas *Suavis* Endemik Merapi setelah mencapai umur 8 minggu dapat dilihat pada Tabel 1.

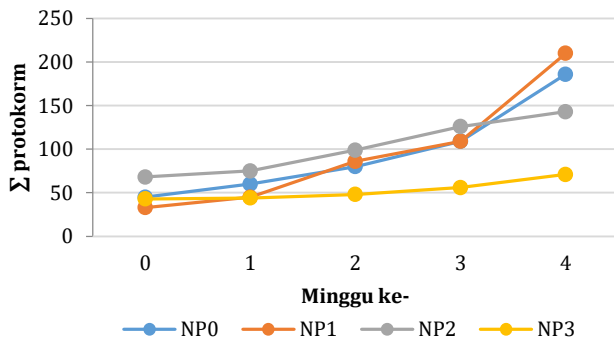
Tabel 1. Fase-fase perkembangan embrio anggrek *V. tricolor*

No. Gambar	Deskripsi
1	Embrio dalam biji/masih terlindungi testa. Panjang embrio \pm 0,21 mm.
2	Embrio membesar dan mengalami perubahan panjang \pm 0,1 mm, tampak bergaris-garis warna coklat menunjukkan testa yang pecah.
3	Embrio tidak memiliki testa, berbentuk bulat atau oval, warna putih, testa masih tersisa, dan mengalami penambahan panjang \pm 0,13 mm
4	Ukuran embrio membesar dan mengalami pemanjangan \pm 0,2 mm, bentuk bulat, warna kuning, dan testa masih tersisa.
5	Ukuran embrio membesar dan mengalami perubahan ukuran \pm 0,42 mm, bentuk bulat dan berwarna hijau.
6	Berbentuk oval, berwarna hijau, terdapat <i>Shoot Apical Meristem</i> (SAM) dan <i>absorbing hair</i> . <i>Protocorm</i> mengalami pemanjangan sebesar \pm 0,54 mm

Skala gambar = 1 mm

Fase-fase perkembangan embrio anggrek dibedakan berdasarkan kenampakan morfologi *protocorm*. Pada fase 1 dan 2 embrio masih terlindungi testa. Menurut Arditti & Ernst (1993), perkecambahan embrio anggrek dimulai dengan pembengkakan embrio hingga hilangnya testa. Testa mulai pecah pada fase 2 menuju 3 yang ditunjukkan dengan adanya garis-garis coklat, embrio berwarna putih dan berbentuk bulat. Testa benar-benar terlepas dari embrio anggrek setelah memasuki fase 3. Pada fase ini (fase 3–6) embrio berkembang menjadi *protocorm* yang dapat dibedakan berdasarkan warna, *white protocorm* (fase 3), *yellow protocorm* (fase 4), dan *green protocorm* (fase 5–6) (Semiarti *et al.*, 2007).

Perubahan warna *protocorm* pada fase 3 hingga 6 menunjukkan embrio anggrek *V. tricolor* melakukan aktivitas metabolisme untuk membentuk individu baru.



Gambar 1. Efek pepton terhadap kecepatan pertumbuhan *protocorm V. tricolor* pada fase 6.

Penambahan pepton dengan jumlah yang sesuai pada medium pertumbuhan embrio anggrek *V. tricolor* dapat mempercepat pembentukan fase 6 (Gambar 1). Fase tersebut adalah fase transisi dari *protocorm* menjadi individu baru yang ditandai dengan adanya *Shoot Apical Meristem* (SAM) dan *absorbing hair*. SAM merupakan struktur awal untuk membentuk batang dan daun, sedangkan *absorbing hair* merupakan struktur menyerupai rambut yang digunakan oleh eksplan untuk menyerap nutrisi yang ada di lingkungannya (Arnold *et al.*, 2002). Pembentukan keduanya merupakan parameter untuk mengetahui kecepatan pertumbuhan embrio maupun eksplan. Kesesuaian medium untuk pertumbuhan embrio akan membentuk banyak *absorbing hair* dan meningkatkan pemanjangan SAM (Park *et al.*, 2003). Arditti (1992) dan Nhut *et al.* (2008) menyatakan bahwa kandungan dalam pepton terdiri dari asam amino, protein, biotin, pyroxidine, tiamin, dan nitrogen sehingga dapat mempercepat proses perkembangan embrio anggrek.

Persentase kecepatan pertumbuhan *protocorm* pada fase 6 dapat dilihat pada Gambar 1 dan Tabel 2. Penambahan konsentrasi pepton yang optimal untuk

pertumbuhan embrio dan *protocorm* anggrek *V. tricolor* adalah NP1.

Persentase kecepatan pertumbuhan *protocorm* anggrek *V. tricolor* tertinggi pada minggu pertama adalah NP1 (1,08%), diikuti NP0 (1,02%), lalu NP3 (0,75%), dan NP2 (0,47%). Persentase kecepatan pertumbuhan *protocorm* anggrek *V. tricolor* tertinggi pada minggu kedua adalah NP2 (6,71%), diikuti NP1 (5,83%), lalu NP0 (1,36%), dan NP3 (0,27%). Persentase kecepatan pertumbuhan *protocorm* anggrek *V. tricolor* tertinggi pada minggu ketiga adalah NP1 (7,39%), diikuti NP0 (1,97%), lalu NP2 (1,83%), dan NP3 (0,54%). Persentase kecepatan pertumbuhan embrio tertinggi pada minggu keempat adalah NP1 (6,85%), diikuti NP0 (5,22%), lalu NP2 (1,15%), dan NP3 (0,95%). Hasil tersebut selaras dengan pernyataan David *et al.* (2015) bahwa penambahan pepton sebanyak 1 gr/L pada medium pertumbuhan anggrek *V. helvola* dapat mempercepat pembentukan daun dan akar. Kecepatan pertumbuhan *protocorm* dalam medium NP dengan konsentrasi pepton 3 gr/L (NP3) lebih lambat dibandingkan dengan kontrol (NP0). Setiap sel memiliki batasan dalam penyerapan suatu komponen dalam medium nutrisi. Pemberian pepton dengan konsentrasi yang tinggi menyebabkan terjadinya persaingan penyerapan antar komponen dalam medium sehingga dapat menghambat pertumbuhan *protocorm*.

Berdasarkan hasil pengukuran dalam penelitian ini serta analisis komparatif dengan hasil penelitian sebelumnya oleh Shekarriz (2014), dapat dinyatakan bahwa penambahan pepton pada medium NP dapat menginisiasi proses organogenesis pada tanaman. Proses organogenesis membutuhkan nitrogen dalam jumlah yang cukup, sedangkan pepton dapat berfungsi sebagai sumber nitrogen. Namun demikian menurut Shekarriz (2014) yang juga ditemukan dalam penelitian ini, ketika jumlah nitrogen terlalu banyak akan mengakibatkan penurunan laju organogenesis dan pertumbuhan tanaman.

Tabel 2. Persentase pertumbuhan embrio anggrek *V. tricolor* dengan penambahan variasi konsentrasi pepton dalam medium NP setelah umur 8 minggu

Minggu ke-	Media	Fase					
		1	2	3	4	5	6
1	NP0	80 (0,81%±0,001)	100 (1,02%±0,001)	70 (0,68%±0,002)	41 (0,95%±0,001)	35 (0,95%±0,001)	60 (1,02%±0,001)
	NP1	100 (1,22%±0,003)	93 (0,81%±0,001)	55 (0,41%±0,001)	36 (0,81%±0,001)	47 (0,81%±0,001)	45 (1,08%±0,002)
	NP2	40 (0,68%±0,000)	57 (0,81%±0,001)	44 (0,47%±0,002)	20 (0,47%±0,001)	71 (1,69%±0,002)	75 (0,47%±0,001)
	NP3	55 (0,20%±0,001)	105 (0,81%±0,001)	63 (0,61%±0,001)	74 (0,95%±0,002)	65 (0,95%±0,001)	44 (0,75%±0,001)
2	NP0	42 (2,58%±0,004)	84 (1,08%±0,001)	78 (1,22%±0,002)	61 (1,63%±0,002)	40 (0,88%±0,001)	80 (1,36%±0,002)
	NP1	54 (3,12%±0,002)	79 (1,22%±0,002)	60 (0,61%±0,001)	47 (1,02%±0,002)	50 (0,34%±0,000)	86 (5,83%±0,001)
	NP2	29 (0,75%±0,000)	32 (2,10%±0,002)	58 (0,75%±0,001)	47 (3,19%±0,001)	42 (0,95%±0,000)	99 (6,71%±0,002)
	NP3	48 (0,47%±0,000)	95 (0,68%±0,000)	68 (0,75%±0,001)	79 (0,81%±0,001)	68 (0,88%±0,001)	48 (0,27%±0,001)
3	NP0	21 (1,42%±0,001)	44 (2,71%±0,002)	72 (0,54%±0,001)	81 (1,76%±0,003)	59 (1,29%±0,002)	109 (1,97%±0,001)
	NP1	25 (1,97%±0,001)	36 (2,44%±0,002)	71 (0,68%±0,001)	63 (4,27%±0,002)	72 (1,08%±0,001)	109 (7,39%±0,001)
	NP2	14 (1,02%±0,001)	23 (1,56%±0,000)	43 (0,75%±0,001)	53 (5,56%±0,002)	48 (0,68%±0,001)	126 (1,83%±0,001)
	NP3	37 (0,75%±0,001)	84 (0,75%±0,000)	70 (0,68%±0,001)	82 (0,61%±0,001)	77 (0,61%±0,001)	56 (0,54%±0,001)
4	NP0	16 (0,95%±0,001)	28 (1,90%±0,001)	52 (3,34%±0,001)	40 (2,78%±0,001)	64 (0,47%±0,001)	186 (12,61%±0,004)
	NP1	7 (0,39%±0,006)	13 (0,88%±0,001)	33 (2,03%±0,002)	35 (2,03%±0,002)	78 (1,36%±0,002)	210 (6,85%±0,003)
	NP2	5 (0,23%±0,000)	15 (1,02%±0,001)	35 (2,19%±0,004)	57 (1,08%±0,002)	52 (0,68%±0,001)	143 (1,15%±0,001)
	NP3	17 (1,36%±0,001)	77 (0,61%±0,001)	75 (0,75%±0,001)	86 (0,95%±0,001)	80 (0,47%±0,001)	71 (0,95%±0,001)

Total jumlah *protocorm* yang ditanam = 1.475

KESIMPULAN

Medium pertumbuhan *New Phalaenopsis* (NP) yang optimal untuk embrio angrek *Vanda tricolor* varietas Suavis Endemik Merapi setelah mencapai umur 8 minggu secara *in vitro* yaitu dengan penambahan konsentrasi pepton 1 gr/L (NP1).

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan banyak terima kasih kepada KEMENRISTEKDIKTI RI yang telah memberikan dana hibah Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi (PUPT) dengan No. Kontrak: 661/UN1-P.III/LT/DIT-LIT/2016, Dr. Budi Setiadi Daryono, M.Agr.Sc. selaku Dekan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, Dr.rer.nat. Ari Indrianto, S.U. dan seluruh staf di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, dan anggota BiOSC (Biology Orchid Study Club) yang telah membantu dan membimbing selama penelitian.

DAFTAR REFERENSI

- Arditti J. 1992. *Fundamentals of orchid biology*. John Wiley & Sons, America
- Arditti J, Ernst R. 1993. *Micropropagation of orchids*. John Wiley & Sons, Inc. Canada. pp:5-14.
- Arnold S, Sabala I, Bozhkov P, Dyachok J, Filonova L. 2002. Development pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss. & Org. Cult.* 69:233-249.
- Chugh S, Guha S, Rao IU. 2009. Micropropagation of orchids: a review on the potential of different explants. *Sci Hortic.* 122(4):507-520.
- Comber JB. 1990. *Orchids of Java*. Charoen Slip Press. Bangkok. p.219.
- David D, Jawan R, Marbawi H, Gansau JA. 2015. Organic additives improves the *in vitro* growth of native orchid *Vanda helvola* Blume. *Not Sci Biol.* 7(2):192-197
- Dwiyani R, Purwanto A, Indriarto A, Semiarti E. 2012. Konservasi angrek alam Indonesia *Vanda tricolor* Lindl. varietas Suavis melalui kultur embrio secara *in-vitro*. *Jurnal Bumi Lestari.* 12(1):93-98
- Grudkowska M, Zagdanska B. 2004. Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochim Pol.* 51(2):609-624
- Handoyo F. 2010. *Orchids of Indonesia*. vol 1. Indonesian orchid Society, Jakarta.
- Hsiao YY, Pan ZJ, Hsu CC, Yang YP, Hsu YC, Chuang YC, Shih HH, Chen WH, Tsai WC, Chen HH. 2011. Research on orchid biology and biotechnology. *Plant Cell Physiol.* 52(9):1467-1486
- Islam MO, Ichihashi S, Matsui S. 1998. Control of growth and development of protocorm like body derived from callusby carbon sources in *Phalaenopsis*. *Plant Biotechnol.* 15:83-187
- Kauth PJ, Dutra D, Johnson TR, Stewart SL, Kane ME, Vendrame W. 2008. Techniques and applications of *in vitro* orchid seed germination. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology.* V:377-39.
- Kosmiatin M, Husni A, Mariska I. 2005. Perkecambahan dan perbanyakan gaharu secara *in vitro*. *J Agro Biogen.* 1(2):62-67
- Nhut DT, Thi NN, Khiet BLT, Luan VQ. 2008. Peptone stimulates *in vitro* shoot and root regeneration of avocado (*Persea americana* Mill.). *Scientia Horticulturae.* 115:124-128.
- Nodine MD, Bryan AC, Racolta A, Jerosky KV, Tax FE. 2011. A few standing for many: embryo receptor-like kinases. *Trends Plant Sci.* 16: 211-217.
- Park SY, Murthy HN, Paek KY. 2003. Protocorm-like body induction and subsequent plant regeneration from root tip cultures of *Dorita enopsis*. *Plant Science.* 164:919-923
- Razdan MK. 2003. *Introduction to plant tissue culture*. 2nd ed. Science Publishers, Inc. India. p.71-72
- Semiarti E, Indrianto A, Purwanto A, Isminingsih S, Suseno N, Ishikawa T, Yoshioka Y, Machida Y, Machida C. 2007. Agrobacterium mediated transformation of the wild orchid species *Phalaenopsis amabilis*. *Plant Biotechnol.* 24:265-272.
- Shekarriz P, Mohsen K, Shirin DD, Masoud M. 2014. Coconut water and peptone improve seed germination and protocorm like body formation of hybrid *Phalaenopsis*. *Agriculture Science Developments.* 3(10):317-322
- Utami EDW, Hariyanto S, Manuhara YSW. 2017. *In vitro* propagation of the endangered medical orchid, *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm through mature seed culture. *Asian Pac J Trop Biomed.* 7(5):406-410
- Yadav AS, Deshmukh SR, Kamble PS. 2003. *Comprehensive practical and viva in biochemistry*. Jaypee Brothers Publishers. New Delhi. p.44
- Yu H, Xu Y. 2007. Orchids. In Pua EC, Davey MR. (Eds.) *Transgenic Crops VI. Biotechnology in Agriculture and Forestry.* Springer. 61: 73-279
- Zhang B, Liu F, Yao C. 2000. Plant regeneration via somatic embryogenesis in cotton. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 60:89-94.