

Induksi Organogenesis pada Mikropropagasi Anggrek *Vanda tricolor* Lindl. serta Deteksi Variasi Genetik Hasil Perbanyakan dengan RAPD

RINDANG DWIYANI

Jurusan Agroekoteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Udayana
Jalan P.B. Sudirman, Denpasar
E-mail: rindangdwiyani@yahoo.co.id

ABSTRACT

Induction of Organogenesis on Micropropagation of *Vanda tricolor* Orchid and Detection of Genetic Variation of the Progenies Using RAPD Marker.

Research concerning on micropropagation of *Vanda tricolor* orchid and detection of genetic variation among the progenies has been conducted in the year of 2015. The objective of the research was to obtain the most appropriate explant type for inducing organogenesis and to observe genetic variation of the progenies using Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD). Various pieces of organ from 18 month old-seedlings were used as material of micropropagation, i.e. shoot tip, shoot base, leaf tip and leaf base. Explants were planted on MS medium without plant growth regulator. The percentage of explant producing shoots and the average number of shoots per-explant were observed at 12 weeks after planting. Progenies resulted from the micropropagation were then analysed using RAPD with 5 primers, i.e. OPA8 (5' GTGACGTAGG 3'), OPA9 (5' GGGTAACGCC 3'), OPA10 (5' GTGATCGCAG 3'), OPA11 (5' CAATCGCCGT 3'), OPA13 (5' CAGCACCCAC 3'). The results showed that the most appropriate explant for inducing organogenesis was shoot base. Analysis of RAPD showed that the slight variation was detected between mother plant and the progenies and also among the progenies. The results obtained from the current research are promising and suggests that RAPD markers can be utilized as a simple molecular tool to assess the genetic variation of plants derived in-vitro.

Keywords: Organogenesis, Vanda tricolor orchid, genetic variation, RAPD

PENDAHULUAN

Vanda tricolor Lindl. var. *suavis* adalah salah satu spesies anggrek alam Indonesia. Anggrek ini tumbuh di beberapa daerah di Indonesia, yaitu Sulawesi, Bali, Yogyakarta (tepatnya di lereng Merapi), Jawa barat, Jawa tengah, dan Jawa timur (Dwiyani, 2012). Dwiyani (2012) juga melaporkan bahwa spesies anggrek *V.*

tricolor Lindl. var. *suavis* yang tumbuh di lereng merapi kini punah akibat erupsi Gunung Merapi pada November 2010 yang lalu. Upaya konservasi diperlukan untuk mengatasi permasalahan ini. Upaya ini dapat dilakukan melalui perbanyakan vegetatif untuk mendapatkan tanaman yang identik dengan induknya.

RINDANG DWIYANI. Induksi Organogenesis pada Mikropropagasi Anggrek *Vanda tricolor*...

Perbanyak vegetatif melalui stek dapat dilakukan untuk spesies anggrek yang bersifat monopodial seperti *V. tricolor*. Namun perbanyak lewat stek kurang efisien karena jumlah anakan yang dihasilkan dari satu tanaman induk sangat sedikit, berkisar 2 sampai 3 anakan. Penelitian ini menawarkan solusi perbanyak vegetatif melalui mikropropagasi, karena dari bahan tanam yang berukuran sangat kecil (0.5 -1.0 cm) dapat dihasilkan jumlah anakan yang sangat banyak dan identik dengan induknya.

Salah satu sistem regenerasi dalam mikropropagasi adalah organogenesis. Dalam organogenesis, eksplan diarahkan untuk membentuk organ (biasanya tunas). Pembentukan tunas ini dapat terjadi secara langsung maupun tidak langsung (melalui kalus). Dibandingkan dengan melalui fase kalus, organogenesis secara langsung menghasilkan jumlah anakan yang lebih sedikit, namun kemungkinan terjadinya variasi somaklonal (penyimpangan morfologi dan genetik pada anakan) lebih sedikit.

Penelitian ini menggunakan induksi tunas secara langsung dengan perlakuan jenis irisan organ. Zat pengatur tumbuh (ZPT) tidak digunakan dalam penelitian ini, karena penelitian pendahuluan yang dilakukan penulis menunjukkan bahwa sitokinin tidak berpengaruh terhadap induksi tunas pada spesies anggrek *V. tricolor* (tidak dipublikasikan). Mikropropagasi tanpa penggunaan ZPT ini sekaligus memberikan informasi terkini untuk mikropropagasi pada tanaman anggrek yang ramah lingkungan, karena penggunaan bahan kimia seperti ZPT dapat dieliminir.

Sementara itu, jenis irisan organ (sebagai bahan eksplan) dilaporkan mempengaruhi jumlah propagul yang dihasilkan pada mikropropagasi tanaman anggrek *Phalaenopsis amabilis* (Utami, 2009) dan anggrek *Dendrobium* hibrida (Hong Nhat dan Dung, 2009), namun belum diketahui bagaimana jenis irisan organ berpengaruh terhadap pembentukan propagul pada spesies anggrek *V. tricolor* Lindl. var. *suavis*.

Perubahan genetik pada hasil perbanyak melalui kultur jaringan yang dikenal dengan istilah variasi somaklonal sudah dilaporkan oleh banyak riset pada berbagai spesies tanaman seperti tomat (Soniya *et al.*, 2001), padi (Abeyaratne *et al.*, 2004), buah kiwi (Palombi and Damiano, 2002), buah nenas (Santos *et al.*, 2008) dan lain sebagainya. Dalam penelitian ini deteksi perubahan genetik pada hasil perbanyak dilakukan dengan *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD). Deteksi variasi somaklonal menggunakan RAPD pada hasil perbanyak melalui mikropropagasi telah dilaporkan pada beberapa spesies tanaman seperti nenas (Roostika *et al.*, 2015), *Eucalyptus citrodora* (Rani and Raina, 2000) dan *Cinnamomum sp* (Soulange *et al.*, 2007).

Tujuan dari penelitian ini adalah mendapatkan jenis eksplan yang paling sesuai dalam menginduksi proliferasi tunas serta mempelajari variasi genetik hasil perbanyak pada mikropropagasi tanaman anggrek *Vanda tricolor* Lindl.

BAHAN DAN METODE

Induksi Organogenesis pada Eksplan dari Berbagai Jenis Irisan Organ

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari hingga Juli 2015 di Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman Fakultas Pertanian, Universitas Udayana beralamat di Jalan Pulau Moyo, Denpasar.

Bahan tanaman yang digunakan sebagai sumber bahan eksplan adalah bibit angrek botol *V. tricolor* Lindl. var. *suavis* berumur 18 bulan setelah semai (hasil selfing). Bahan eksplan yang digunakan adalah daun dan batang, masing-masing diiris menjadi dua, ujung dan pangkal sehingga ada 4 macam jenis eksplan, yaitu ujung batang, pangkal batang, ujung daun dan pangkal daun. Keempat macam irisan eksplan tersebut ditanam pada media padat MS (Murashige dan Skoog, 1962), pH 5.8 yang disterilisasi dengan autoklaf, suhu 121°C selama 30 menit.. Bioagar sebanyak 7 gram per liter media digunakan sebagai pematat. Perlakuan irisan organ tersebut diulang sebanyak 6 kali, sehingga ada 24 botol kultur yang masing-masing ditanami 5 eksplan.

Pengamatan dilakukan terhadap beberapa peubah, yaitu:

- Persentase eksplan yang menghasilkan tunas = (jumlah eksplan bertunas / jumlah eksplan ditanam) x 100%;
- Jumlah tunas yang dihasilkan per-eksplan = Jumlah tunas yang dihasilkan seluruhnya/ jumlah eksplan yang ditanam

Deteksi Variasi Genetik Hasil Perbanyakan dengan RAPD

Penelitian molekuler ini dilaksanakan dari bulan Agustus hingga November 2015 bertempat di Laboratorium Rekayasa Genetika Universitas Udayana, di Jalan Sudirman Denpasar.

Bahan penelitian menggunakan 1 tanaman induk (TI), 4 tanaman berasal dari hasil perbanyakan menggunakan eksplan irisan pangkal batang (PB1, PB2, PB3, PB4) dan 3 tanaman berasal dari hasil perbanyakan menggunakan eksplan berasal dari irisan pangkal daun (PD1, PD2, PD3), sehingga seluruhnya ada 8 tanaman yang dianalisis molekuler dengan RAPD. Daun tanaman digunakan sebagai sumber DNA genom.

Bahan kimia yang dibutuhkan meliputi bahan kimia untuk ekstraksi DNA tanaman meliputi Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) (Merck, Jerman), larutan CIAA (24 Chloroform : 1 Isoamyl alkohol), sodium asetat 3 M, iso propanol (Merck, Jerman), etanol 70%, buffer 10T 0,1E pH 8; 4; Bahan kimia untuk PCR: aquades bebas nuklease, buffer 10x Ex-Taq (Takara, Jepang), dNTPs, Ex-Taq polymerase (Takara, Jepang), serta primer RAPD yakni OPA8 (5' GTGACGTAGG 3'), OPA9 (5' GGGTAACGCC 3'), OPA10 (5' GTGATCGCAG 3'), OPA11 (5' CAATCGCCGT 3'), OPA13 (5' CAGCACCCAC 3'). Selain itu juga digunakan bahan kimia untuk elektroforesis:: agarose (Sigma, USA), buffer TBE (Tris-Boric acid EDTA) 0,5x, etidium bromida, loading dye (Toyobo, Jepang), DNA marka VC 100bp Plus DNA Ladder dari Vivantis (nomor produk NL 0403).

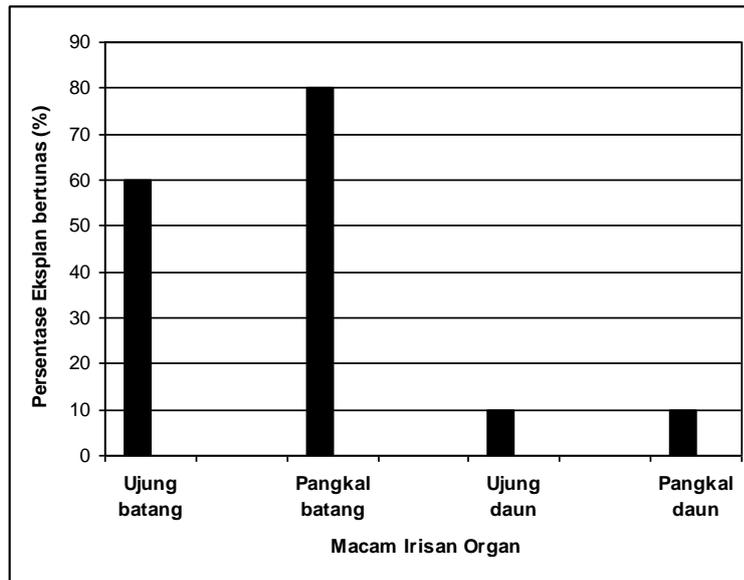
Ekstraksi DNA dilakukan dengan metode Doyle dan Doyle (1990). Prosedur secara detail dapat dilihat pada Dwiyani (2012). Reaksi PCR sebanyak 50 µl dibuat dengan jalan menambahkan secara berturut-turut : 5 µl 10X Ex Taq buffer PCR; 4 µl dNTP 2,5 µM; 1 µl primer F1 *KNATI* 50 µM; 1 µl primer RAPD 50 µM; 0,5 µl enzim Taq polymerase; 10 µl sampel DNA yang sudah diencerkan; kemudian ditambah 28,5 µl *nanopure distilled water* sampai mencapai volume total 50 µl. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi selama 2 detik untuk homogenitas dari campuran reaksi tersebut, kemudian tabung PCR dimasukkan ke dalam mesin PCR (thermocycler, Jerman). Reaksi dilakukan dengan kondisi sebagai berikut: 94°C selama 5 menit (denaturasi awal), kemudian dilakukan 30 siklus yang terdiri dari 94°C selama 45 detik (denaturasi), 58 °C selama 1 menit (*annealing*), dan 72°C selama 1 menit 30 detik (*elongation*). Pemanjangan waktu selama 5 menit dilakukan pada suhu 72°C, dan terakhir suhu dijaga pada 4°C. DNA hasil amplifikasi selanjutnya dicek dengan elektroforesis dengan gel agarose 1%, kemudian divisualisasi dengan UV transluminator .

Pita yang muncul sebagai hasil amplifikasi setiap primer diskor sebagai data biner (tidak ada/absen = 0; ada = 1). Data biner ini kemudian dianalisis dengan program SIMQUAL, SAHN dan TREE dari the Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System version 2.02 (NTSYS-pc 2.02). Derajat kesamaan dihitung menggunakan Dice coefficient

HASIL DAN PEMBAHASAN

Induksi Organogenesis pada Eksplan dari Berbagai Jenis Irisan Organ

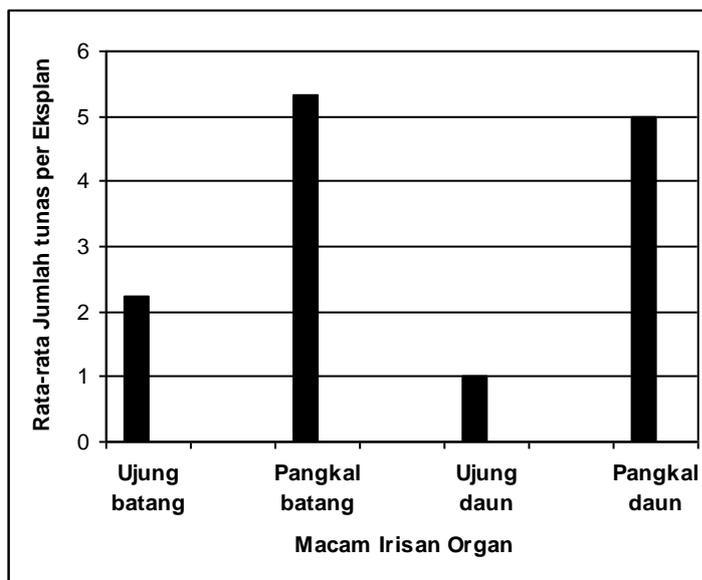
Hasil pengamatan pada 12 minggu setelah tanam menunjukkan bahwa jenis eksplan dari irisan pangkal batang menghasilkan 'persentase eksplan bertunas' tertinggi dibandingkan jenis eksplan ujung batang, ujung daun dan pangkal daun (Gambar 1), mengindikasikan bahwa eksplan irisan pangkal batang paling memberikan respon terhadap hara yang terkandung pada media MS. Tunas yang dihasilkan oleh pangkal batang, ujung daun dan pangkal daun disebut tunas adventif karena pada irisan eksplan tersebut tidak terdapat bakal tunas seperti halnya pada eksplan irisan ujung batang yang memang mengandung 'pre-existing shoot' atau bakal tunas. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pangkal batang memberikan respon yang sangat baik terhadap media MS, karena eksplan tetap menghasilkan tunas meskipun tanpa memiliki bakal tunas. Perkembangan sistim pembuluh pada pangkal batang merupakan yang paling 'advanced' (berkembang) dibandingkan irisan organ lainnya, sehingga diduga paling kaya akan fotosintat (karbohidrat) serta hasil metabolisme hara lainnya seperti protein dan lemak dan juga paling kaya akan hormon endogen. Hal ini diduga menjadi penyebab banyaknya eksplan yang menghasilkan tunas pada eksplan pangkal batang.



Gambar 1. Persentase Eksplan Bertunas dari Beragam Irisan Organ

Jumlah tunas per eksplan dari beragam irisan organ dapat ditunjukkan oleh Gambar 2. Terlihat bahwa eksplan pangkal batang dan pangkal daun menghasilkan jumlah tunas

yang relatif sama, namun secara visual tunas-tunas yang dihasilkan oleh pangkal daun relatif lemah dan berkembang lambat.

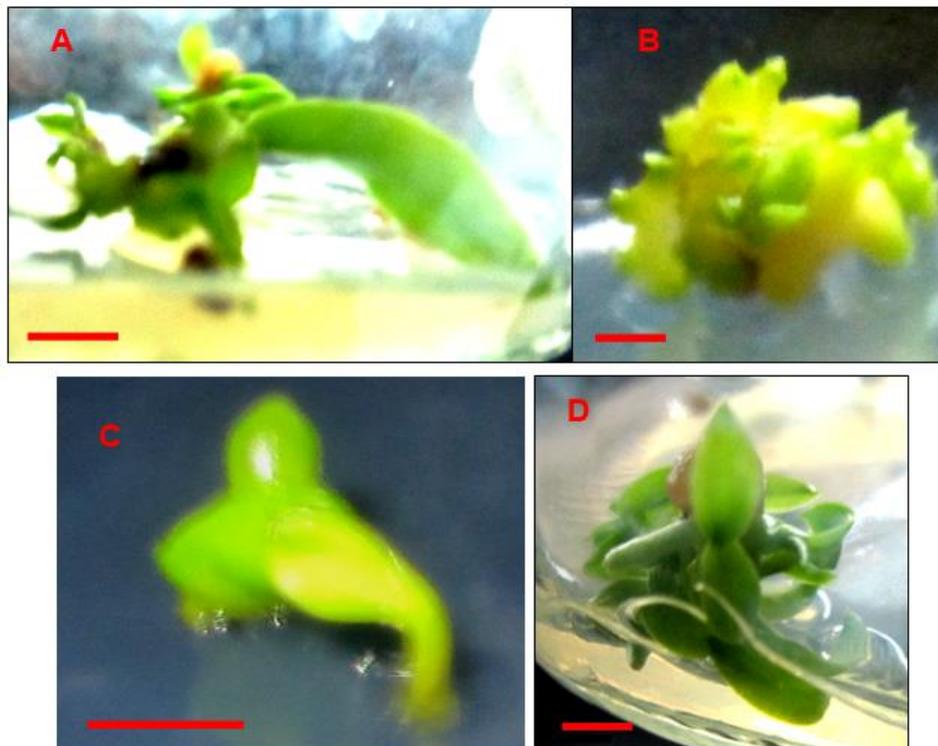


Gambar 2. Rata-rata Jumlah Tunas per-Eksplan dari Beragam Irisan Organ

RINDANG DWIYANI. Induksi Organogenesis pada Mikropropagasi Anggrek *Vanda tricolor*...

Hingga 15 minggu sejak penanaman, eksplan pangkal daun belum menghasilkan plantlet, sedangkan eksplan pangkal batang dan ujung batang sudah menghasilkan

plantlet (tanaman), sementara eksplan ujung daun tidak menunjukkan perkembangan (Gambar 3).



Gambar 3. Pertumbuhan Eksplan dari Beragam Irisan Organ pada 15 Minggu Setelah Tanam
A = Ujung batang; B= Pangkal daun; C = Ujung daun; D = Pangkal batang

Pengaruh tipe eksplan pada kultur in vitro dari beberapa spesies sudah banyak dilaporkan (Gubis *et al.*, 2003; Blinstrubiene *et al.*, 2004; Tsay *et al.*, 2006). Kebanyakan eksplan irisan buku (nodal segmen) merupakan yang paling baik untuk proliferasi tunas pada beberapa spesies tanaman berkayu seperti *Citrus lemon* (Rathore *et al.*, 2004) dan *rough lemon* (Ogunsda & Ilori, 2008). Sementara itu, dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa eksplan irisan pangkal batang dari anggrek *Vanda tricolor* Lindl. memberikan hasil terbaik untuk pertumbuhan

tunas dibandingkan eksplan pangkal daun, ujung daun serta ujung batang. Yang perlu digarisbawahi dari hasil penelitian ini adalah tidak digunakannya zat pengatur tumbuh dalam penelitian ini untuk terjadinya organogenesis. Pada umumnya untuk menginduksi tunas dalam kultur in vitro, digunakan zat pengatur tumbuh dari golongan sitokinin. Pada penelitian ini, tunas tetap dapat tumbuh dan membentuk plantlet meskipun tidak ditambahkan sitokinin pada media.

Deteksi Variasi Genetik Hasil Perbanyakan dengan RAPD

Lima primer yang digunakan untuk analisis RAPD dalam penelitian ini mengamplifikasi 40 macam pita dengan panjang berkisar dari 100-1100 bp. Dua

puluh empat (24) dari pita tersebut bersifat polimorfik, sisanya (16) merupakan pita monomorfik. Pita polimorfik terbanyak dihasilkan dari amplifikasi oleh Primer OPA11, diikuti oleh OPA13, OPA8, OPA10 dan OPA9 (Tabel 1).

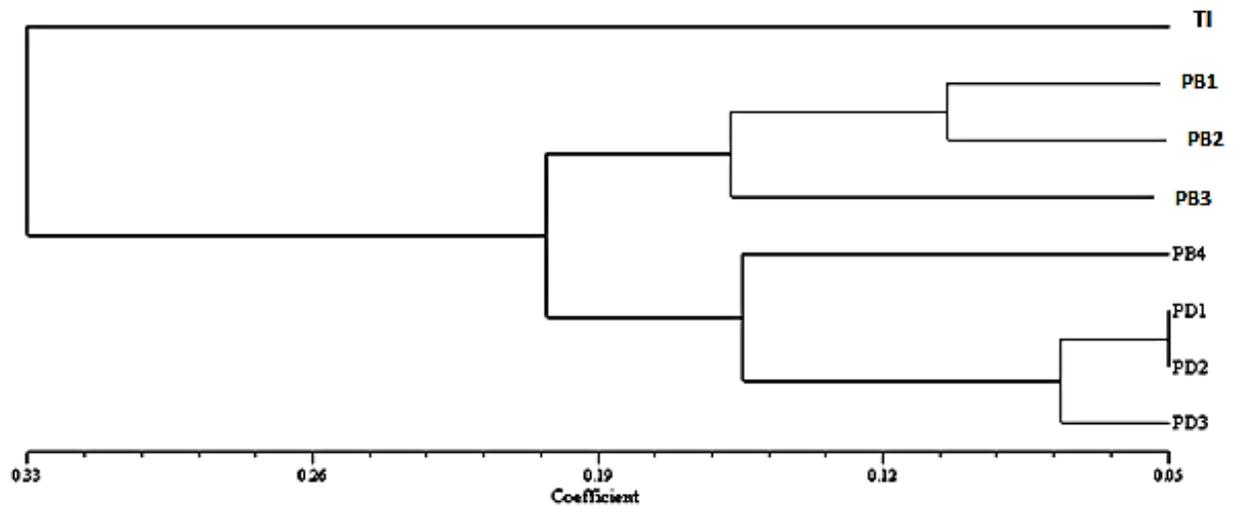
Tabel 1. Primer RAPD yang Digunakan serta Pita Hasil Amplifikasi

Primer RAPD	Sekuens	Jumlah pita teramplifikasi	Panjang pita	Jumlah pita polimorfik
OPA8	5'GTGACGTAGG3'	10	100-1100bp	5
OPA9	5'GGGTAACGCC3'	4	300-800bp	1
OPA10	5'GTGATCGCAG3'	7	100-800bp	4
OPA11	5'CAATCGCCGT3'	9	200-800bp	8
OPA13	5'CAGCACCCAC3'	10	400-1100bp	6

Primer RAPD yang mampu mengamplifikasi banyak pita polimorfik merupakan primer yang baik digunakan untuk mendeteksi polimorfisme dalam suatu populasi melalui analisis RAPD (Filho *et al.*, 2000; Romdhane *et al.*, 2016). Primer dengan kode OPA lebih baik digunakan untuk mendeteksi variasi somaklonal pada hasil perbanyakan melalui kultur in vitro pada tanaman anggrek *Phalaenopsis* (Chen *et al.*, 1998) dan tanaman nenas (Roostika *et al.*, 2015) dibandingkan primer dengan kode OPJ. Penelitian ini menggunakan 5 primer dengan kode OPA untuk mendeteksi polimorfisme pada hasil perbanyakan melalui kultur in vitro anggrek *V. tricolor* dan menghasilkan rata-rata pita polimorfik sebanyak 54.21% per-primer. Nilai ini tak jauh berbeda dengan hasil yang diperoleh Malik *et al.* (2012) yang mendapatkan rata-rata pita polimorfik 51.83% per-primer dalam analisis RAPD untuk mendeteksi populasi asesi *Indian citrus*. Nilai rata-rata

pita polimorfik di atas 50% per-primer meskipun tidak tinggi namun dapat dikatakan bahwa analisis RAPD yang dihasilkan sudah kredibel untuk digunakan (Roostika *et al.*, 2015). Peningkatan jumlah primer dalam penelitian ini diperlukan untuk meningkatkan kredibilitas hasil yang diperoleh.

Analisis NTSYS menghasilkan dendrogram yang dapat dilihat pada Gambar 4 dengan jarak genetik antar sampel (coefficient dissimilarity) antara 0.05 - 0.33. Delapan tanaman yang dianalisis adalah TI (tanaman induk), PB1, PB2, PB3, PB4, (anakan berasal dari eksplan pangkal batang), PD1, PD2 dan PD3 (anakan berasal dari eksplan pangkal daun). Keseluruhan anakan tersebut memiliki fenotip normal dan menyerupai induknya. Jika dilihat dari dendrogram tersebut, seluruh anakan hasil mikropropagasi tersebut memiliki jarak genetik antar sampel yang relatif rendah terutama anakan yang berasal dari pangkal daun.



Gambar 4. Dendrogram berdasarkan jarak genetik antar sampel. TI = Tanaman induk; PB=anakan dari eksplan pangkal batang; PD=anakan dari eksplan pangkal daun.

Terlihat adanya dua klaster utama yang memisahkan tanaman induk dengan anakan hasil perbanyakan. Tanaman induk (TI) memiliki jarak genetik tertinggi yaitu 0.33 dan terpisah dari kelompok anakannya. Hasil penelitian ini membuktikan bahwa anakan hasil perbanyakan melalui kultur in vitro secara genetik tidak seratus persen sama dengan induknya, meskipun relatif rendah namun ada jarak genetik sebesar 0.33 antara anakan dengan induknya, mengindikasikan adanya perbedaan genetik sebesar 33 persen atau persamaan genetik sebesar 67 persen.

Variasi genetik yang terjadi pada tanaman hasil perbanyakan secara in vitro dikenal sebagai variasi somaklonal yang bisa bersifat genetik permanen atau epigenetik (Kaepler *et al.*, 2000; Gaafar and Saker, 2006; Gitonga *et al.*, 2010). Variasi tersebut disebabkan oleh banyak faktor diantaranya faktor genotip, polyploidy, sumber eksplan, umur tanaman induk, perubahan cytogenetic, DNA metilasi, lamanya proses kultur dan

penggunaan zat pengatur tumbuh (Jain, 1997). Dalam penelitian ini, adanya sedikit perbedaan secara genetik antara tanaman hasil perbanyakan secara in vitro dengan tanaman induknya dan juga perbedaan antara tanaman hasil perbanyakan itu sendiri diduga disebabkan oleh lamanya waktu kultur serta proses sub-kultur yang berulang. Terlepas dari kurangnya jumlah primer RAPD yang digunakan, namun hasil penelitian ini menyimpulkan bahwa analisis RAPD dapat digunakan untuk mendeteksi polimorfisme pada tanaman anggrek *V. tricolor* hasil perbanyakan melalui kultur in-vitro.

SIMPULAN

Penelitian ini menyimpulkan bahwa eksplan irisan pangkal batang merupakan eksplan terbaik untuk induksi organogenesis dalam perbanyakan tanaman anggrek *V. tricolor* melalui kultur in-vitro.

Polimorfisme terhadap hasil perbanyakan dapat dideteksi dengan analisis

RAPD. Dendrogram yang dihasilkan dengan Analisis NTSYS menunjukkan adanya jarak genetik sebesar 0.33 antara tanaman induk dengan anakan hasil perbanyakan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia melalui Hibah Bersaing 2013-2015, untuk itu penulis mengucapkan terimakasih. Terimakasih juga penulis ucapkan kepada rekan yang membantu dalam pelaksanaan penelitian, Hestin Yuswanti, Ida Ayu Putri Darmawati dan Tantri Suwandari.

DAFTAR PUSTAKA

- Abeyaratne, W.M., De Silva, U.N., Kumari, H.M.P.S. & De.Z.Abeysiriwardena, D.S. 2004. Callus induction, Plantlet regeneration and occurrence of somaclonal variation in somatic tissues of some indica rice varieties. *Annals of the Sri Lanka Department of Agriculture* 6, 1-11.
- Blinstrubiene A, Sliesaravicius A, Burbulis N. 2004. Factors affecting morphogenesis in tissue culture of linseed flax (*Linum isitatisimum* L.). *Acta Universitatis Latviensis, Biol.*, 676: 149-152.
- Chen WH, Chen TM, Fu YM, Hsieh RM, Chen WS. 1998. Studies on somaclonal variation in Phalenopsis. *Plant Cell Rep* 18:7-13.
- Doyle, J.J. , Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Dwiyani, R. 2012, 'Mikropropagasi Tanaman Anggrek *Vanda tricolor* Lindl. var *suavis* forma Bali yang membawa gen *KNOTTED1-LIKE Arabidopsis thaliana (KNAT1)*', Disertasi, Program Studi Bioteknologi, Sekolah Pasca Sarjana, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Filho, H.D.C., Machado, M.A., Luiza, M., Targon, P.N. and Pompeu Jr. J. 2000. The use of random amplified polymorphic DNA to evaluate the genetic variability of Ponkan mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) accessions. *Genetics and Molecular Biology* 23 (1): 169-172
- Gaafar, R.M. & Saker, M.M. 2006. Monitoring of cultivars identity and genetic stability in strawberry varieties grown in Egypt. *W. J. Agric. Sci.* 2 (1), 29-36.
- Gitonga, L.N., Gichuki, S.T., Ngamau, K., Muigai, A.W.T., Kahangi, E.M., Wasilwa, L.A., Wepukhulu, S. and Njogu, N. 2010. Effect of explant type, source and genotype on in vitro shoot regeneration in Macadamia (*Macadamia* spp.). *J. Agric. Biotech. and Sustainable Dev.* Vol. 2(7): 129-135.
- Gubis J, Lajchová Z, Fragó J, Jureková Z. 2003. Effect of explant type on shoot regeneration in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in vitro. *Czech. J. Plant. Breed.*, 39(1): 9-14.
- Hong Nhat, N.T., Dung, T.T. 2009. In vitro propagation of Dendrobium orchid through thin stem section culture. *Biotechnology Department-Nong Lam University* (Download 01/04/2015).
- Jain, S. M. 1997. Micropropagation of selected somaclones of Begonia and Saint paulia. *J. Biosci* 22, 585-592.
- Kaeppler, S.M., Kaeppler, H.F. & Yong, R. 2000. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Kluwer Academic Publishers* 43, 179-188.
- Malik SK, Rohini MR, Kumar S, Choudhary R, Pal D, Chaudhury R. 2012. Assessment of Genetic Diversity in

RINDANG DWIYANI. Induksi Organogenesis pada Mikropropagasi Anggrek *Vanda tricolor*...

- Sweet Orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] Cultivars of India Using Morphological and RAPD Markers. *Agric Res* 1: 317-324.
- Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 472-497.
- Ogunsola KE, Ilori CO. 2007. In vitro propagation of miracle berry (*Synsepalum dulcificum* Daniel) through embryo and nodal cultures. *Afr. J. Biotechnol.*, 7 (3): 244-248.
- Palombi, M.A. & Damiano, C. 2002. Comparison between RAPD and SSR molecular markers in detecting genetic variation in kiwifruit (*Achnidia deliciosa* A.Chev). *Plant Cell Rep.* 20, 1061-1066.
- Rani, V. & Raina, S.N. 2000. Genetic fidelity of organized meristem-derived micropropagated plants: a critical reappraisal. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 36, 319-330.
- Rathore JS, Rathore V, Shekhawat NS, Singh RP, Lilar G, Phlwaria M, Dagla HR 2004. *Plant biotechnology and molecular markers.* Springer, Netherlands., pp. 195-205.
- Romdhane, M.B., Riahi, L., Selmi, A., and Zoghalmi, N. 2016. Molecular characterization and genetic relationships among Tunisian Citrus rootstocks. *Journal of New Sciences, Agriculture and Biotechnology*, 32(2):1853-1858
- Roostika, I., Khumaida, N., Ardie, S.W. 2015. RAPD Analysis to Detect Somaclonal Variation of Pineapple In Vitro Cultures During Micropropagation. *Biotropia* 22 (2): 109 - 119
- Santos, M.D.M., Buso, G.C.S. & Torres, A.C. 2008. Evaluation of genetic variability in micropropagated propagules of ornamental pineapple [*Ananas comosus* var. *bracteatus* (Lindley) Coppens and Leal] using RAPD markers. *Genetics and Molecular Research* 7 (4), 1097-1105.
- Soniya, E.V., Banerjee, N.S & Das, M.R. 2001. Genetic analysis of somaclonal variation among callus-derived plants of tomato. *CURRENT SCIENCE* 80, 1213-1215.
- Soulange, J.G., Ranghoo-Sammukhiya, V.M. & Seeburrn, S.D. 2007. Tissue Culture and RAPD Analysis of *Cinnamomum champora* & *Cinnamomum verum*. *Biotechnology* 6 (2): 239-244
- Tsay HS, Lee, CY, Agrawal, DC, Basker S 2006. Influence of ventilation closure, gelling agent and explant type on shoot bud proliferation and hyperhydricity in *Scrophularia yoshimurae* - a medicinal plant. *Plant*, 42(5): 445-449.
- Utami, E.S.W. 2009. Embriogenesis Somatik Anggrek Bulan (*Phalaenopsis amabilis* L. (Blume)). Disertasi. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.