

Pengujian Stabilitas Genetik *Plantlet* Citrumelo Hasil tTCL dari Kultur *In Vitro* Dengan Menggunakan Teknik Sekuen Berulang (*Genetic Stability Assessment of Plantlet Derived tTCL Citrumelo Using Repetitive Sequence Technique*)

Farida Yulianti, Hidayatul Arisah, dan Dita Agisimanto

Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika, Jln. Raya Tlekung No. 1, Junrejo, Batu, Jawa Timur, Indonesia, 65327
E-mail: adiraf212@gmail.com

Diterima: 21 Januari 2016; direvisi: 10 Maret 2017; disetujui: 27 Juli 2017

ABSTRAK. Protokol organogenesis untuk perbanyak *plantlet* Citrumelo menggunakan metode *transverse thin cell layer* (tTCL) batang telah berhasil dikembangkan. Identifikasi stabilitas genetik tanaman hasil kultur jaringan mutlak diperlukan untuk menguji keberadaan *off-type*. Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui potensi primer *retrotransposon* dan *inter simple sequence repeat* (ISSR) dalam mendeteksi stabilitas genetik tanaman Citrumelo dari periode kultur yang panjang. Penelitian dilaksanakan pada bulan Juni 2013 sampai dengan Oktober 2015 di Laboratorium Pemuliaan Tanaman, Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika, Tlekung. Sebanyak empat penanda dengan urutan basa berulang, yaitu *retrotransposon* dan ISSR digunakan untuk menguji stabilitas genetik *plantlet in vitro* yang berumur 22 bulan dan untuk mengonfirmasi metode yang dapat diandalkan untuk perbanyak jeruk Citrumelo yang *true-to-type* pada masa mendatang. Daun *plantlet* diseleksi dan diisolasi secara *bulk*. Amplifikasi dilakukan terhadap DNA dengan sistem *bulk segregant analysis* (BSA), dan kemudian dipisahkan menggunakan gel agarose. Tanaman *in vitro* yang sama secara morfologi dapat dibedakan oleh penanda INT-*retrotransposon* yang mendeteksi adanya kehilangan pita pada grup sampel dengan ukuran 550 bp. Keberadaan *retrotransposon* dalam genom berlimpah dan aktivasinya diinduksi oleh stres. Kondisi kultur jaringan berpotensi menginduksi aktivasi *retrotransposon*. Keragaman genetik diperoleh sebesar 2,6%, tetapi masih dapat diterima untuk *plantlet* yang dihasilkan dari kultur jangka panjang. *Plantlet* yang digunakan dalam penelitian ini adalah *plantlet* yang dikulturkan sejak awal tahun 2014 dan telah digunakan untuk mempelajari faktor media dan lingkungan kultur yang efisien pada Citrumelo selama periode 2014–2015. Aktivitas pengkajian variabilitas genetik *plantlet* yang dihasilkan melalui tTCL batang masih terus dilakukan. Kombinasi protokol dan deteksi berbasis penanda PCR menjadi sarana yang efektif untuk perbanyak massa benih berkualitas hasil kultur jaringan untuk mendukung program pemuliaan maupun perbenihan.

Kata kunci: Citrumelo; tTCL; Variabilitas genetik; Retrotransposon; ISSR

ABSTRACT. Assessment of genetic stability of long-term cultivation of plantlet derived tTCL Citrumelo using repetitive sequence primers. Regeneration of plantlet from organogenesis of stem transverse thin cell layer (tTCL) was achieved for Citrumelo, a valuable rootstock. Identification of the genetic stability of plant tissue culture is absolutely necessary. The aim of this study was to assess the potential retrotransposons and inter simple sequence repeat (ISSR) primers in detecting the genetic stability of the Citrumelo plantlet derived from tTCL technique. The research was conducted from Juni 2013 until October 2015 in Breeding Laboratory of Indonesian Citrus and Subtropical Fruits Research Institute. A four repetitive based sequences retrotransposon and ISSR marker assays were used to evaluate genetic stability of a group of 22 months old in vitro plantlets and to confirm the most reliable method for true-to-type propagation of Citrumelo. Leaves of plantlets were selected and isolated in bulk. Groups of DNA in bulk segregant analysis (BSA) were amplified and separated using agarose gel. Vitroplants that morphologically similar have been effectively distinguished by a selected primer INT- retrotransposon that detect a deletion band at 550 bp on a line a group of sample. Retrotransposon is abundance through the genome and its activation induced by stress condition. Tissue culture condition was reported potential to induce retrotransposon activation. The genetic variation of 2.6% was acceptable for the culture that produced from long-term. Plantlets used in this study were selected from population induced from early 2014, and employed for studying media as well as environment factors for efficiently organogenesis of citrumelo in period of 2014-2015. However, additional study is on going for evaluating genetic variability from a cycle plantlet production through tTCL of stems. This combination protocol of organogenesis and PCR based markers detection would be powerful tools for mass propagation of high quality seedling derived tissue culture for breeding or cultivation programs.

Keywords: Citrumelo; tTCL; Genetic variability; Retrotransposon; ISSR

Swingle Citrumelo merupakan hibrida antara jeruk trifoliata dan grapefruit varietas Duncan [*Citrus paradisi* MacFaden x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] yang dibuat oleh Walter S. Swingle tahun 1907. Citrumelo saat ini digunakan secara luas sebagai tanaman batang bawah di berbagai sentra produksi jeruk dunia (Filho *et al.* 2009), karena ketahanannya terhadap penyakit *Citrus tristeza virus* (CTV) (Castle

& Stover 2001, Roman *et al.* 2004), *Citrus sudden death associated virus* (CSDaV) (Roman *et al.* 2004), toleran terhadap penyakit *blight*, nematoda, dan *cold tolerance* (Castle & Stover 2001), *root rot* (*Phytophthora parasitica* Dast.) (Carpenter & Furr 1962, Castle & Stover 2001) dan toleran terhadap salinitas tinggi (Fadli *et al.* 2014). Batang bawah ini mereduksi pertumbuhan kanopi batang atas, tetapi

mendukung kuantitas dan kualitas buah yang lebih tinggi pada *grapefruit* (Castle *et al.* 2011), jeruk manis (Castle *et al.* 2010), dan jeruk keprok (Tazima *et al.* 2013). Kelemahannya tidak tahan terhadap penyakit *citrus spot disease* dan cekaman kekeringan (Molinari *et al.* 2004).

Jeruk Citrumelo merupakan jeruk batang bawah potensial untuk pengembangan kawasan produksi di lahan suboptimal Indonesia. Untuk mewujudkan ini, ketersediaan benihnya harus ditingkatkan. Penyediaan secara konvensional memerlukan waktu yang lama dan kawasan produksi yang luas. Penyediaan secara inkonvensional menggunakan metode kultur jaringan lebih memungkinkan.

Berbagai metode kultur jaringan terbukti efisien untuk proliferasi sel dan regenerasi tanaman (Ziv 2005). Metode regenerasi yang umum digunakan adalah organogenesis (George *et al.* 2008). Regenerasi tanaman jeruk melalui organogenesis melalui multiplikasi tunas adventif telah dilakukan sejak tahun 1982. Kelemahan metode ini adalah laju multiplikasi yang rendah. Hasil penelitian Schinor *et al.* (2011) terhadap lima varietas jeruk menghasilkan tunas adventif sebanyak 1–3 per eksplan.

Pengembangan teknik *thin cell layer* (TCL) oleh Teixeira-da-Silva (2009), yaitu metode mikropropagasi menggunakan eksplan tipis (0,1–0,5 mm) dari organ tanaman dapat menutupi kelemahan metode multiplikasi tunas adventif. Metode ini memiliki keunggulan, yaitu lebih sederhana dan cepat, serta memiliki efisiensi lebih tinggi dibandingkan perbanyakan melalui kultur jaringan konvensional melalui proliferasi tunas (Dobránszki & Teixeira-da-Silva 2011). Dengan menggunakan teknik tTCL, populasi tanaman yang diperoleh lebih banyak dalam waktu yang lebih pendek dari eksplan yang terbatas (Grabkowska *et al.* 2014, Teixeira-da-Silva 2009).

Teknik TCL mampu mengeliminasi mikroorganisme dan meminimalisir peluang terjadinya keragaman akibat mutasi variasi somaklonal, karena teknik TCL menggunakan eksplan dengan ukuran yang kecil dengan penambahan kombinasi ZPT dengan konsentrasi yang rendah (Teixeira-da-Silva & Dobranszki 2013, Steinmacher *et al.* 2007). Beberapa faktor yang berpengaruh terhadap induksi variasi somaklonal antara lain zat pengatur tumbuh (ZPT), genotipe, sumber dan umur eksplan, periode kultur, level ploidi, laju proliferasi, dan kondisi kultur (Skirvin *et al.* 1994). Kombinasi sitokinin eksogen dan pematangan tunas pucuk (Smulders & Klerk 2011) pada periode kultur yang lama menjadi faktor utama keragaman.

Berbagai metode pengamatan morfologi, fisiologis, sitologi, isozim (Gupta & Varshney 1999), dan molekuler (Devarumath *et al.* 2007) digunakan untuk mendeteksi stabilitas genetik. Perkembangan metode molekuler menuntaskan kelemahan pemuliaan konvensional dalam proses identifikasi (JinPing *et al.* 2009). Metode ini memiliki akurasi lebih tinggi untuk identifikasi stabilitas genetik tanaman (Bhattacharyya *et al.* 2014, Saha *et al.* 2014, Carra *et al.* 2012). Penanda molekuler berdasarkan sekuen berulang (*repetitive sequence*) makin banyak digunakan sebagai alat identifikasi. Sekuen berulang tersebar di sepanjang genom sebagai elemen dominan dari *nuclear-genome* dan organela (Kalender *et al.* 1999). Kondisi ini menguntungkan jika digunakan sebagai penanda.

Dua tipe sekuen berulang yang populer adalah ISSR dan *retrotransposon*. *Retrotransposon* adalah kelas utama DNA berulang, yang terdiri atas 40–60% dari genom pada tanaman, dominan dengan susunan basa yang panjang, jelas, urutan yang stabil, dan penyisipan *polimorfisme* baru yang diproduksi oleh sisi aktif secara replikasi (Weising *et al.* 2005, Hirochika 1995). ISSR menggunakan sekuen pendek *oligonukleotida*, 2–6 basa, diulang dalam susunan rangkaiannya, *simple sequence repeat*, yang tersebar di sepanjang genom eukaryotik (Tautz & Renz 1984), yang terdapat baik di dalam region intron gen dan *noncoding* gen (Scarano *et al.* 2002) sehingga jumlah pengulangan di sepanjang genom menjadi tinggi. Sebagai primer, penanda ISSR mudah dilakukan, sederhana, cepat, konsisten, membutuhkan kuantitas cetakan DNA rendah (10–30 bp), mampu membedakan individu-individu dengan kekerabatan yang dekat, dan tidak membutuhkan banyak informasi untuk mendesain primer (Zietkiewicz *et al.* 1994).

Retrotransposon diaktivasi oleh cekaman, seperti luka, elisitor biotik, serangan patogen, radiasi, dan kultur jaringan. Aktivasi ini menyebabkan sekuen *retrotransposon* melakukan replikasi dan insersi (Kumar & Bennetzen 1999), yang jika terjadi di dalam daerah kode (*coding region*) akan menyebabkan mutasi karena perubahan ekspresi gen (Grandbastien *et al.* 1997). Sifat ini memberi peluang sekuen *retrotransposon* digunakan sebagai indikator keragaman genetik dan penguji stabilitas genetik tanaman hasil kultur jaringan (Hirochika *et al.* 1996).

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui potensi primer *retrotransposon* dan ISSR dalam mendeteksi stabilitas genetik tanaman Citrumelo dari periode kultur yang panjang. Hipotesis yang diajukan

dalam penelitian ini adalah bahwa penggunaan kultur *in vitro* pada periode yang panjang diduga menyebabkan keragaman genetik.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juni 2013 sampai dengan Oktober 2015 di Laboratorium Pemuliaan Tanaman, Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika (Balitjestro).

Sumber Tanaman

Sumber tanaman dalam pengujian stabilitas genetik *plantlet Citrumelo* adalah *plantlet* yang dihasilkan dari hasil *transverse* TCL batang dan akar *in vitro* berukuran 200–300 μm (Gambar 1). Pada tahap awal, irisan hasil *transverse* TCL batang dan akar *in vitro* dikulturkan pada media MS yang diperkaya dengan 50 g/l sukrosa, 1 mg/l tidiazuron (TDZ) untuk induksi mata tunas. Eksplan selanjutnya dipindahkan ke dalam media MS yang ditambah dengan sukrosa 30 g/l, BAP 2 mg/l dan NAA 0,1 mg/l. Eksplan dipelihara di dalam media tersebut selama tiga kali subkultur dengan periode subkultur setiap bulan. *Plantlet* yang dihasilkan selanjutnya dipelihara dan diperbanyak di dalam media MS yang ditambah dengan sukrosa 30 g/l, metatopolin 1 mg/l, dan NAA 0,025 mg/l selama 22 bulan dengan periode subkultur setiap bulan. Tanaman yang digunakan sebagai kontrol adalah tanaman induk *Citrumelo*.

Ekstraksi, Isolasi, dan Kuantifikasi DNA

Ekstraksi, isolasi, dan kuantifikasi DNA dilakukan dengan mengikuti metode yang dikembangkan oleh



Gambar 1. *Plantlet Citrumelo* hasil perbanyakan dengan teknik tTCL

Doyle & Doyle (1990). Sampel yang digunakan yaitu daun yang diambil dari *plantlet Citrumelo* hasil TCL yang dikelola mengikuti metode BSA. Sebanyak 100 mg sampel daun yang berasal dari 10 *plantlet* dari sumber yang sama digerus di dalam 1,5 ml buffer ekstraksi (2% CTAB, 20 mM EDTA, 100 mM Tris HCl, 1,4 M NaCl, 2% PVP, dan 0,2% merkapto-ethanol). Cara ini dilakukan untuk delapan sampel berikutnya termasuk satu kontrol (nomor 9).

Campuran hasil gerusan dan *buffer* ekstraksi diinkubasi pada suhu 65°C selama 30 menit. Campuran didiamkan selama 2 menit pada suhu ruang kemudian ditambah dengan Na-asetat (1/10 x volume) dan 1 ml CHISAM (kloroform: isoamil-alkohol 24:1). Pemisahan campuran dilakukan dengan sentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 12.000 rpm. Supernatan yang terbentuk diambil dan dipindahkan ke dalam tabung sentrifuse baru selanjutnya ditambah dengan Na-asetat (1/10 x volume), diikuti dengan penambahan isopropanol (0,6 x volume) untuk presipitasi DNA. Campuran ini di sentrifuse pada kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit untuk mengendapkan DNA.

Endapan DNA dicuci dengan etanol 70%, dikering-anginkan dan dilarutkan kembali dengan 500 μl *buffer* TE. DNA yang sudah larut ditambah dengan RNase sebanyak 1 μl dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Supernatan dikoleksi setelah sentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 12.000 rpm, ditambah dengan Na-asetat (1/10 x volume) dan etanol absolut (2,5 x volume) untuk presipitasi DNA. Presipitasi DNA dibantu oleh sentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Endapan DNA dicuci dengan etanol 70%, dikering-anginkan dan dilarutkan kembali dengan 50–100 μl *buffer* TE.

Seleksi Primer

Pasangan primer *retrotransposon* yang digunakan adalah pasangan primer yang telah digunakan untuk membedakan jeruk tua dan turunan dengan keseragaman yang tinggi, yaitu tua Washington Navel (*C. sinensis*), Hart's Tardiff Valencia, W. Murcott (leluhur Tango), dan Tango (hasil radiasi W. Murcott budwood) (Crowley 2011). Pasangan primer tersebut didesain berdasarkan tiga daerah target pada *long terminal repeat* (LTR) *retrotransposon* golongan CIRE1, yaitu gen *reverse transcriptase* (RT) (F. 5'-GAAGGTGTAGATTTCAATG-3'/R. 5'-CTGACTTGTATTTGCTTGCA-3'), gen *integrase* (INT) (F. 5'-GATAGAA TCCAGCAACTG-3'/R. 5'-AGCTTTGAATTATCAGCATAC-3') dan daerah bagian kanan LTR (F. 5'-GAGCTGTTGTGCAGATTG-3'/R. 5'-CAGCAAGAC TCACG AATC-3'). Primer ISSR dari dinuklotida AG (AG8C) efektif mendeteksi

keragaman *vitroplant* anggur (Nookaraju & Agrawal 2012). Primer-primer ini telah digunakan untuk studi keragaman jeruk di Indonesia dengan derajat polimorfisme >90%.

Amplifikasi dan Separasi DNA

Amplifikasi sampel DNA dengan penanda (AG)8C (ISSR), LTR-*retrotransposon*, INT-*retrotransposon*, dan RT-*retrotransposon*. Sebanyak 50 ng DNA dan 0,5 pmol primer dimasukkan ke dalam buffer PCR (Dream Tag Green-PCR Master Mix, Thermo Scientific). Amplifikasi dilakukan dengan mesin PCR (Thermocycler-Biometra). Amplifikasi penanda ISSR diawali dengan satu siklus denaturasi suhu 94°C selama 3 menit, diikuti dengan 28 siklus denaturasi suhu 94°C selama 45 detik, *annealing* suhu 53°C selama 1 menit, dengan ekstensi suhu 72°C selama 2 menit. Siklus PCR untuk penanda ISSR ini diakhiri dengan satu siklus ekstensi akhir dengan suhu 72°C selama 10 menit (Scarano *et al.* 2002). Amplifikasi dengan penanda *retrotransposon* diawali dengan satu siklus denaturasi suhu 94°C selama 5 menit, diikuti dengan 30 siklus denaturasi suhu 94°C selama 1 menit, *annealing* suhu 45°C selama 2 menit, ekstensi suhu 72°C selama 3 menit dan diakhiri dengan satu siklus ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 10 menit dengan suhu pendinginan 4°C (Crowley 2011).

Pemisahan pita DNA hasil amplifikasi dilakukan dengan metode elektroforesis pada gel agarose (Vivantis, # PC0701) 2,5 % yang mengandung etidium bromida (10 mg/l) di dalam larutan 0,5 x TBE selama 60 menit pada kekuatan arus 100 volt. Deteksi pita DNA dilakukan dengan sistem biodokumentasi (BioDoc Analyzer-Biometra).

Parameter Pengamatan

Pengamatan dilakukan terhadap profil pita DNA yang dihasilkan melalui proses elektroforesis. Penambahan atau kehilangan pita DNA dibandingkan dengan kontrol menunjukkan adanya *off-type*.

Analisis Data

Profil DNA diterjemahkan ke dalam data biner berdasarkan kehadiran pita (1) dan tidak ada pita DNA (0). Pita-pita DNA dari hasil analisis molekuler marker dianggap sebagai satu karakter yang mewakili satu lokus DNA. Pita-pita DNA dengan laju migrasi yang sama diasumsikan sebagai lokus yang homolog. Data biner digunakan untuk membangun matriks kemiripan (data kualitatif). Persentase keragaman dihitung dengan menggunakan *software* DARWin5 (*dissimilaritys analysis representation for windows*). Persentase keragaman menunjukkan adanya *off-type*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

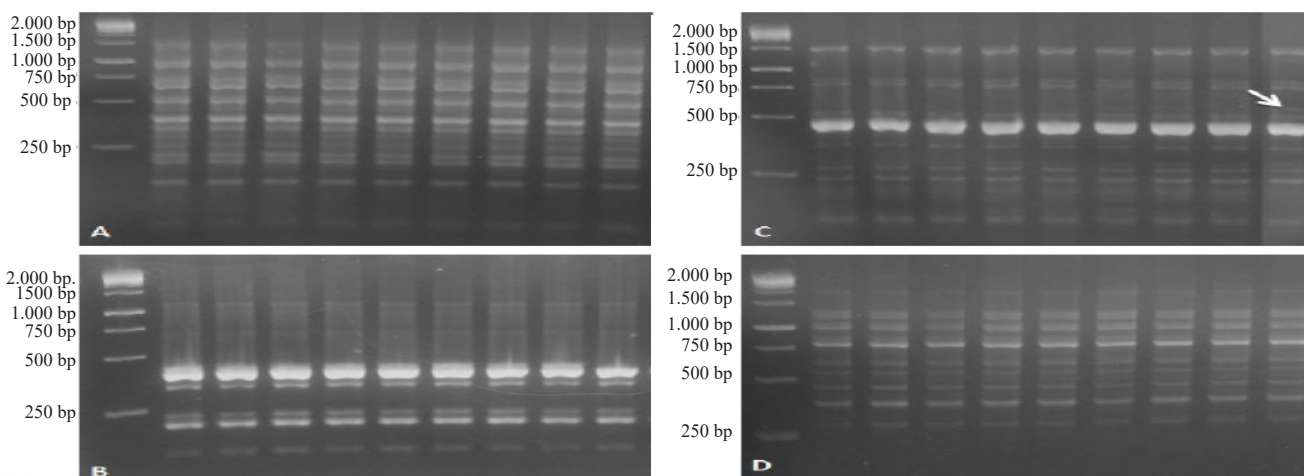
Pengujian stabilitas genetik merupakan salah satu prasyarat utama dalam produksi tanaman yang diperoleh melalui teknik kultur jaringan untuk memastikan efektivitas protokol dalam menghasilkan benih yang *true to type*. Pada penelitian ini sekuen berulang *retrotransposon* dan ISSR yang digunakan dapat mendeteksi dan mengamplifikasi 6-13 alel di daerah *retrotransposon* yang diobservasi pada sampel *vitroplant* Citrumelo (Tabel 1). Ini mengindikasikan bahwa ketiga daerah *long terminal repeat* (LTR) *retrotransposon* golongan CIRE1, gen *reverse transcriptase* (RT), gen integrase (INT), dan daerah bagian kanan LTR aktif pada genom Citrumelo.

Sementara primer ISSR hanya mendeteksi 10 alel yang mengindikasikan penyebaran sekuen dinukleotida AG pada Citrumelo. Pita DNA yang dihasilkan didominasi oleh pita monomorfik. Dari ke-4 primer yang diujikan, terjadi penyimpangan sebesar satu primer polimorfik (INT-*retrotransposon*) yang mendeteksi keragaman pada tanaman Citrumelo pada ukuran 550 bp (Tabel 1, Gambar 2). Pada Gambar 1c, kolom ke-9 memiliki pita DNA pada ukuran 550 bp sementara 80 sampel lainnya pada kolom 1–8 kehilangan pita DNA pada ukuran tersebut. Penggunaan penanda *retrotransposon* untuk mendeteksi keragaman tanaman selama periode kultur jaringan memang cepat dan efisien (Campbell *et al.* 2011).

Fenomena kemunculan keragaman dalam penelitian ini diyakini dipengaruhi bersama oleh lamanya periode kultur, yaitu 22 bulan dan penggunaan sitokinin (BAP dan metatopolin) selama periode kultur. Akumulasi sitokinin endogen di dalam sel somatik dapat meningkatkan level *reactive oxygen species* (ROS) di dalam sel tanaman. Molekul itu

Tabel 1. Keragaman jumlah alel yang dihasilkan sekuen berulang *retrotransposon* dan ISSR (*Variability of allele number derived from retrotransposon and ISSR repetitive sequences*)

| Penanda (Primer) | Jumlah alel (Number of allele) | Alel monomorfik (Monomorphic allele) |
|-----------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|
| LTR- <i>retrotransposon</i> | 13 | 13 |
| INT- <i>retrotransposon</i> | 11 | 10 |
| RT- <i>retrotransposon</i> | 8 | 8 |
| ISSR | 10 | 10 |
| | 38 | 37 |



Gambar 2. Pola pita DNA *plantlet* Citrumelo hasil tTCL dengan penanda LTR (A), RT (B), INT (C), dan ISSR (D). Line 1-8: sampel, line 9 : kontrol (*DNA banding pattern of plantlet of Citrumelo derived from tTCL using LTR (A), RT (B), INT (C), and ISSR (D) primers. Line 1-8: sample, line 9: control*)

dapat bereaksi dengan metabolit, protein, dan asam nukleat yang menyebabkan kerusakan sel. ROS dapat menyebabkan kerusakan oksidatif DNA inti dan organel melalui delesi dan substitusi DNA yang berakibat pada perubahan ekspresi gen, kerusakan jumlah atau struktur kromosom (Siragusa *et al.* 2007). Cekaman yang terjadi selama periode kultur jaringan berhubungan pula dengan terjadinya aktivasi elemen transposon (Kaeppler *et al.* 2000).

Hilangnya satu pita DNA pada ukuran 550 bp yang ditemukan oleh penanda INT-*retrotransposon* (Gambar 1C) menjadi indikator aktivasi *retrotransposon*. Aktivasi *retrotransposon* dalam penelitian ini sangat mungkin terjadi karena selama proses induksi dan pemeliharaan secara *in vitro* merupakan kondisi yang tidak alami. Pada kondisi ini, tanaman akan menerima sumber karbon (gula) dari media tumbuh untuk menggantikan fotosintesis, menerima tambahan ZPT (auksin dan sitokinin) yang ditambahkan dalam media dan terganggunya keseimbangan air dalam sel akibat kondisi kultur yang memiliki kelembapan tinggi (Smulders & Klerk 2011). Kondisi stress menyebabkan tanaman menyesuaikan diri dengan cara mengaktifkan *retrotransposon* (Kaeppler *et al.* 2000).

Hasil perhitungan dengan menggunakan *software* DARwin5 menunjukkan bahwa keragaman tanaman hasil mikropropagasi dengan teknik tTCL selama 22 bulan sebesar 2,6%. Namun, perubahan genetik sebesar 2,6% tersebut tidak diikuti perubahan morfologi sehingga perubahan genetik yang dideteksi dengan primer *retrotransposon* tersebut masih dapat diterima. Pada level ini keragaman sebagai respons terhadap kondisi kultur masih dianggap realistis dan

dapat diterima karena keragaman somaklonal yang terjadi masih di bawah 3% (Skirvin *et al.* 1994). Aktivasi *retrotransposon* yang tidak menunjukkan perubahan secara fenotipik seperti ini terjadi pula pada padi karena aktivitas Tos10, Tos17, dan Tos19 yang meningkatkan laju transkripsi (Kaeppler *et al.* 2000).

Deteksi sejak dini keragaman genetik pada tanaman hasil mikropropagasi penting untuk menghindari pengembangan tanaman yang telah berubah genetiknya, hemat waktu, dan lebih efisien (Chuang *et al.* 2009, Bairu *et al.* 2011). Keragaman genetik yang berujung kepada *off-type* klonal menurunkan nilai ekonomis *vitroplant* (Oh *et al.* 2007). Deteksi dini keragaman genetik menggunakan penanda molekuler diyakini sebagai cara terbaik (Aremu *et al.* 2013), seperti primer berbasis sekuen *retrotransposon*. *Retrotransposon* adalah tipe *transposable element* yang tersebar di sepanjang genom (Gupta & Rustgi 2004). Tipe *transposable element* ini dapat memperbanyak diri melalui *reverse transcription* bagian RNA intermediate. Potongan baru hasil kopi sekuen itu dapat menyisip ke berbagai posisi di sepanjang genom membentuk susunan basa yang baru. *Retrotransposon* ini terbagi ke dalam dua kelompok utama, yaitu LTR dan non-LTR. LTR memiliki dua subkelas Ty1-copia dan the Ty3-gypsy (Kumar & Bennetzen 1999). Aplikasinya dalam identifikasi keragaman akibat induksi variasi somaklonal dilaporkan pada jeruk (Asíns *et al.* 1999, Bernet & Asíns 2003, Tao *et al.* 2005), padi (Hirochika *et al.* 1996), *vitroplant* pisang (Ray *et al.* 2006), *vitroplant Aloe vera* (Rathore *et al.* 2011), apel (Venturi *et al.* 2006), kacang polong (Smýkal *et*

al. 2007), anggur (Walker *et al.* 2006), dan *Spartina anglica* (Baumel *et al.* 2002).

Hasil penelitian ini menunjukkan pula bahwa *retrotransposon* berperan sebagai penguji keragaman tanaman Citrumelo hasil kultur jaringan. Penggunaan 2 mg/l BAP atau 1 mg/l metatoplin atau konsentrasi yang lebih rendah dalam jangka panjang dapat menginduksi keragaman genetik. Keragaman genetik tersebut dapat diantisipasi dengan menurunkan level hormon yang digunakan atau memperpendek periode kultur.

KESIMPULAN DAN SARAN

Sekuen berulang (INT-*retrotransposon*) efektif digunakan untuk mengevaluasi keragaman genetik *vitroplant* Citrumelo hasil perbanyakan dengan metode tTCL. INT *retrotransposon* mendeteksi kehilangan pita pada ukuran 550 bp dari kelompok sampel berumur 22 bulan, menghasilkan keragaman genetik sebesar 2,6%. Kombinasi protokol mikropropagasi yang efisien dalam penggunaan auksin dan sitokinin serta deteksi berbasis penanda PCR dapat menjadi sarana yang efektif untuk perbanyakan massal benih berkualitas atau untuk membentuk populasi tanaman pemuliaan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Aremu, AO, Bairu, MW, Szu, L, Dolezal, K, Finnie, JF, & Staden, JV 2013, 'Genetic fidelity in tissue-cultured 'Williams' bananas - The effect of high concentration of topolins and benzyladenine', *Scientia Horticulturae*, vol. 161, pp. 324-7.
2. Asins, MJ, Monforte, AJ, Mestre, PF & Carbonell, EA 1999, Citrus and *Prunus copia*-like retrotransposons', *Theoretical Applied Genetics*, vol. 99, pp. 503-10.
3. Bairu, MW, Aremu, AO & Van Staden, J 2011, 'Somaclonal variation in plants: Causes and detection methods', *Plant Growth Regul.*, vol. 63, pp. 147-3.
4. Baumel, A, Ainouche, M, Kalendar, R & Schulman, AH 2002, 'Retrotransposons and genomic stability in populations of the young allopolyploid species *Spartina anglica* C.E. Hubbard (Poaceae)', *Mol. Biol. Evol.*, vol. 19, pp.1218-27.
5. Bernet, GP & Asins, MJ 2003, 'Identification and genomic distribution of gypsy like retrotransposons in Citrus and Poncirus', *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 108, pp.121-30.
6. Bhattacharyya, P, Kumaria, S, Diengdoh, R & Tandon, P 2014, 'Genetic stability and phytochemical analysis of the *in vitro* regenerated plants of *Dendrobium nobile* Lindl., an endangered medicinal orchid', *Meta Gene*, vol. 2, pp.489-504.
7. Campbell, BC, LeMare, S, Piperidis, G & Godwin, ID 2011, IRAP, a retrotransposon-based marker system for the detection of somaclonal variation in barley', *Mol Breed*, vol. 27, pp.193-206.
8. Carpenter, JB & Furr, JR 1962, 'Evaluation of tolerance to root rot caused by *Phytophthora parasitica* in seedlings of citrus and related genera', *Phytopathology*, vol. 52, pp. 1277-85.
9. Carra, A, Sajeve, M, Abbate, L, Siragusa, M, Sottile, F & Carimi, F 2012, 'In vitro plant regeneration of caper (*Capparis spinosa* L.) from floral explants and genetic stability of regenerants', *Plant Cell Tissue Organ Culture*, vol. 109, pp. 373-81.
10. Castle, B & Stover, E 2001, *Update on use of swingle Citrumelo rootstock*, Agricultural Science, Institute of Food and Agricultural Sciences. 4 p.
11. Castle, WS, Baldwin, JC & Muraro, RP 2010, 'Rootstocks and the performance and economic returns of 'Hamlin' Sweet Orange trees', *HortScience*, vol. 45, pp. 875-81.
12. Castle, WS, Bowman, KD, Baldwin, JC, Grosser, JW & Gmitter, FG 2011, 'Rootstocks affect tree growth, yield, and juice quality of 'Marsh' Grapefruit', *HortScience*, vol. 46, pp. 841-8.
13. Chuang, SJ, Chen, CL, Chen, JJ, Chou, WY & Sung, JM 2009, 'Detection of somaclonal variation in micro-propagated *Echniacea purpurea* using AFLP marker', *Sci.Hortic.*, vol. 120, pp. 121-6.
14. Crowley, JR 2011, 'A molecular genetic approach to evaluate a novel seedless phenotype found in tango, a new variety of mandarin developed from gamma-irradiated W. Murcott', Dissertation, University of California Riverside.
15. Devarumath, RM, Double, RB, Kawar, PG, Naikebawane, SB & Nerker, YS 2007, 'Filed performance and RAPP analysis to evaluate genetic fidelity of tissue culture raised plants vis-a-vis conventional setts derived plants of sugercane', *Sugar Tech*, vol. 1, no. 1, pp. 17-22.
16. Dobránszka, J & Teixeira-da-Silva, JA 2011, 'Adventitious shoot regeneration from leaf thin cell layers in apple', *Scientia Horticulturae*, vol. 127, pp. 460-3.
17. Doyle, JJ & Doyle, JL 1990, 'Isolation of plant DNA from fresh plant tissue', *Focus*, vol. 12, pp. 13-5.
18. Fadli, A, Chetto, O, Talha, A, Benkirane, R, Morillon, R & Benyahia, H 2014, 'Characterization in greenhouse conditions of two salt tolerant citrumelo (*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) cultivars', *Journal of Life Sciences*, vol. 8, pp. 955-66.
19. Filho, FDAAM, Girardi, EA & Couto, HTZD 2009, 'Swingle' citrumelo propagation by cuttings for citrus nursery tree production or inarching', *Scientia Horticulturae*, vol. 120, pp. 207-12.
20. George, EF, Hall, MA, & De Klerk, G 2008, *Plant propagation by tissue culture*, vol. 1, Dordrecht Springer, 501p.
21. Grabkowska, R, Sitarek, P & Wysokinska, H 2014, 'Influence of thidiazuron (TDZ) pretreatment of shoot tips on shoot multiplication and ex vitro acclimatization of *Harpagophytum procumbens*', *Acta Physiologia Plantarum*, vol. 36, pp. 1661-72.
22. Grandbastien, MA, Lucas, H, Morel, JB, Mhiri, C, Vernhettes, S & Casacuberta, JM 1997, 'The expression of the tobacco tnt1 retrotransposon is linked to plant defense responses', *Genet*, vol. 100, pp. 241-52.

23. Gupta, PK & Varshney, RK 1999, 'Molecular markers for genetic fidelity of during micropropagation and germplasm conservation', *Curr. Sci.*, vol. 76, pp. 1308-10.
24. Gupta, PK & Rustgi, S 2004, 'Molecular markers from the transcribed/expressed region of the genome in higher plants', *Funct. Integr. Genomics*, vol. 4, pp. 139-62.
25. Hirochika, H 1995, 'Regulation of plant retrotransposons and their use for genome analysis', *Gamma Field Symposium*, vol. 34, pp. 77-91.
26. Hirochika, H, Sugimoto, K, Otsuki, Y & Kanda, M 1996, 'Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture', *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, vol. 93, pp. 7783-8.
27. JinPing, X, Li Geng, C, Ming, X, Hai Lin, V & Wei Qi, Y 2009, 'Identification of AFLP fragments linked to seedlessness in Ponkan mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) and conversion to SCAR markers', *Scientia Horticulturae*, vol. 121, pp. 505-10.
28. Kaeppler, SM, Kaeppler, HF, & Rhee, Y 2000, 'Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants', *Plant Molecular Biology*, vol. 43, pp. 179-88.
29. Kalendar, R, Grob, T, Regina, M, Suoniemi, A, & Schulman, A 1999, 'IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques', *Theoretical Applied Genetics*, vol. 98, pp. 704-11.
30. Kumar, A & Bennetzen, JL 1999, 'Plant retrotransposons', *Ann. Rev. Genet.*, vol. 33, pp. 479-32.
31. Molinari, HBC, Bernal, JC, Kobayashi, AK, Pereira, LFP & Vieira, LGE 2004, 'Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of Swingle citrumelo (*Citrus paradisi* Macf. × *Poncirus trifoliata* L. Raf.) using thin epicotyl sections', *Scientia Horticulturae*, vol. 99, pp. 379-85.
32. Nookaraju, A & Agrawal, DC 2012, 'Genetic homogeneity of *in vitro* raised plants of grapevine cv. Crimson seedless revealed by ISSR and microsatellite markers', *South African Journal of Botany*, vol. 78, pp. 302-6.
33. Oh, TJ, Cullis, MA, Kunert, K, Engelborghs, I, Swennen, R & Cullis, CA 2007, 'Genomic changes associated with somaclonal variation in banana (*Musa* spp.)', *Physiol Plant*, vol. 129, pp. 766-74.
34. Rathore, MS, Chikara, J, Mastan, SG, Rahman, H, Anand, KGV & Shekhawat, NS 2011, 'Assessment of genetic stability and instability of tissue culture-propagated plantlets of Aloe vera L. by RAPD and ISSR markers', *Appl. Biochem Biotechnol.*, vol. 165, pp. 1356-65.
35. Ray, T, Dutta, I, Saha, P, Das, S & Roy, SC 2006, 'Genetic stability of three economically important micropropagated banana (*Musa* spp.) cultivars of lower Indo-Gangetic plains, as assessed by RAPD and ISSR markers', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 85, pp. 11-21.
36. Roman, MP, Cambra, M, Juarez, J, Moreno, P, Duran-Vila, N, Tanaka, FAO, Alves, E, Kitajima, EW, Yamamoto, P, Bassanezi, RB, Teixeira, DC, Junior, WCJ, Ayres, AJ, Gimenes-Fernandes, N, Rabenstein, F, Giroto, LF & Bove, JM 2004, 'Sudden death of citrus in Brazil: A graft-transmissible bud union disease', *Plant Diseases*, vol. 88, pp. 453-67.
37. Saha, S, Sengupta, C & Ghosh, P 2014, 'Molecular and phytochemical analyses to assess genetic stability in alginate-encapsulated microshoots of *Ocimum gratissimum* L. following *in vitro* storage', *Nucleus*, vol. 57, pp. 33-43.
38. Scarano, MT, Abbate, L, Ferrante, S, Lucretti, S & Tusa, N 2002, 'ISSR-PCR technique: A useful method for characterizing new allotetraploid somatic hybrids of mandarin', *Plant Cell Report*, vol. 20, pp. 1162-6.
39. Scarano, MT, Abbate, L, Ferrante, S, Lucretti, S & Tusa, N 2002, 'ISSR-PCR technique: A useful method for characterizing new allotetraploid somatic hybrids of mandarin', *Plant Cell Reports*, vol. 20, pp. 1162-6.
40. Schinor, EH, De Azevedo, FA, Filho, FDAM & Mendes, BMJ 2011, 'In vitro organogenesis in some citrus species', *Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP*, vol. 33, no. 2, pp. 526-31.
41. Siragusa, M, Carra, A, Salvia, L, Puglia, AM, De Pasquale, F & Carimi, F 2007, 'Genetic instability in calamondin (*Citrus madurensis* Lour.) plants derived from somatic embryogenesis induced by diphenylurea derivatives', *Plant Cell Report*, vol. 26, pp. 1289-96.
42. Skirvin, RM, McPheeters, KD & Norton, M 1994, 'Sources and frequency of somaclonal variation', *HortScience*, vol. 29, no. 11, pp. 1232-7.
43. Smulders, MJM & de Klerk, GJ 2011, 'Epigenetics in plant tissue culture', *Plant Growth Regulation*, vol. 63, no. 2, pp. 137-46.
44. Smýkal, P, Valledor, L, Rodríguez, R & Griga, M 2007, 'Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term *in vitro* shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.)', *Plant Cell Reports*, vol. 26, pp. 1985-98.
45. Steinmacher, DA, Krohn, NG, Danras, ACM, Stefenon, VM, Clement, CR & Guerra, MP 2007, 'Somatic embryogenesis in peach palm using the thin cell layer technique: Induction, morpho-histological aspects and AFLP analysis of somaclonal variation', *Annals of Botany*, vol. 100, pp. 699-709.
46. Tao, NG, Xu, J, Cheng, YC, Hong, L, Guo, WW, Yi, HL & Deng, XX 2005, 'Isolation and characterization of copia-like retrotransposons from 12 sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) cultivars', *Journal of Integrative Plant Biology*, vol. 47, pp. 1507-15.
47. Tautz, D & Renz, M 1984, 'Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes', *Nucleic Acids Research*, vol. 12, pp. 4127-38.
48. Tazima, ZH, Neves, CSVJ, Yada, IFU & Júnior, RPL 2013, 'Performance of 'Okitsu' Satsuma mandarin on nine rootstocks', *Scientia Agricola*, vol. 70, pp. 422-7.
49. Teixeira-da-Silva, JA 2009, 'Thin cell layers: Power-tool for organogenesis of floricultural crops', In Jain, SM & Ochatt, SJ (eds.), *Protocols for in vitro propagation of ornamental plants, Methods in Molecular Biology*, Humana Press.
50. Teixeira-da-Silva, JA & Dobranszki, J 2013, 'Plant thin cell layers: A 40-year celebration', *Journal Plant Growth Regulator*, vol. 32, pp. 922-43.
51. Venturi, S, Dondini, L, Donini, P & Sansavini, S 2006, 'Retrotransposon characterization and fingerprinting of apple clones by S-SAP markers', *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 112, pp. 440-4.
52. Walker, AR, Lee, E & Robinson, SP 2006, 'Two new grape cultivars, bud sports of *Cabernet sauvignon* bearing pale-coloured berries, are the result of deletion of two regulatory genes of the berry colour locus', *Plant Molecular Biology*, vol. 62, pp. 623-35.

53. Weising, K, Nybom, H, Wolff, K & Kahl, G 2005, 'DNA Finger printing in Plants: Principles', Second edition *Methods and Applications*, vol. 2, pp. 14-9.
54. Zietkiewicz, E, Rafalski, A & Labuda, D 1994, 'Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification', *Genomics*, vol. 20, pp. 176-83.
55. Ziv, M 2005, 'Simple bioreactors for mass propagation of plants', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 81, pp. 277-85.