

PENGUJIAN PENANDA RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHISM DNA UNTUK MENGETAHUI KESTABILAN GENETIK KLON JATI (*Tectona grandis*)
*Random amplified polymorphism DNA marker test to assess genetic stability of teak (*Tectona grandis*) clones*

L.L.G. Nurtjahjaningsih¹, Toni Herawan¹, Reza Permatasari Rachma², dan Anto Rimbawanto¹

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan
Jl. Palagan Tentara Pelajar, Km.15, Purwobinangun, Pakem, Sleman, Yogyakarta, Indonesia
email: iluh_nc@yahoo.com

²Mahasiswa Fakultas Sains dan Teknobiologi, Universitas Atmajaya
Jalan Marsda Adisucipto, Yogyakarta, Indonesia

Tanggal diterima: 2 Agustus 2018, Tanggal direvisi: 9 Agustus 2018, Disetujui terbit: 4 Desember 2018

ABSTRACT

This study aimed to test RAPD markers to assess genetic stability of teak clones. Two experimental steps were carried out. First, nine RAPD markers were screened to verify the level of polymorphic loci; second, the polymorphic loci were applied to test genetic stability of clones. To test polymorphism levels of the primers, DNA was isolated from eight leaf samples that were collected from a seed orchard located at Watusipat, Gunung Kidul. To verify genetic stability of clones, DNA was isolated from leaf samples of 24 ramets of 3 clones after second sub-culturing. Results showed that amplification of 5 out of 9 RAPD primers were be consisten and produced 12 polymorphic loci. The number of polymorphic alleles per locus ranged between 1 and 3; the allele sizes were between 400 and 1050 base pairs (bps). The percentage of polymorphic loci was 100%; it meant that overall loci have high polymorphism level. Based on these loci showed that the 24 ramets are clones; there was no somaclonal variation or high genetic stability. However, these loci need to be validated using more stable DNA markers.

Keywords: *Tissue culture, primers screening, polymorphic loci, somaclonal variation*

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menguji penanda RAPD pada kestabilan genetik klon jati. Pengujian ini melalui dua tahap penelitian yaitu memilih penanda RAPD yang mengamplifikasikan lokus polimorfik pada sampel bukan klon, kemudian target lokus polimorfik tersebut diujikan pada sampel klon hasil kultur jaringan. Sampel DNA bukan klon berasal dari kebun benih jati di Watusipat, Gunung Kidul. Sampel DNA klon berasal dari 24 ramet, dari 3 klon setelah 2 kali sub kultur. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 5 dari 9 penanda RAPD pada sampel bukan klon, bersifat konsisten dan menghasilkan 12 lokus polimorfik. Jumlah alel polimorfik per lokus berkisar antara 1 sampai dengan 3; ukuran alel berkisar antara 400 sampai 1050 pasangan basa (bp). Persentase lokus polimorfik bernilai 100% menunjukkan bahwa seluruh lokus mempunyai nilai polymorphism tinggi. Berdasarkan 12 lokus tersebut, 24 ramet menunjukkan genotipe yang sama pada masing-masing klonnya. Namun demikian, target lokus tersebut masih harus divalidasi menggunakan penanda DNA yang sifatnya lebih stabil.

Kata kunci: *kultur jaringan, pemilihan primer, lokus polimorfik, variasi somaklonal*

I. PENDAHULUAN

Teknik kultur jaringan merupakan salah satu teknik perbanyakan vegetatif dan menghasilkan bibit dalam jumlah banyak (massal). Namun demikian, bibit yang dihasilkan dengan teknik ini sering mengalami ketidak-stabilan genetik atau munculnya variasi somaklonal (Cao, Sui, Cai, Yang, & Deng, 2016). Variasi somaklonal dapat terjadi di tingkat kromosom sehingga bersifat genetik dan

diturunkan (Cao et al., 2016; Sarmah, Sutradhar, & Singh, 2017). Variasi somaklonal berdampak pada sifat fenotipik yang tidak diinginkan, penurunan perolehan genetik tanaman hasil pemuliaan (Bairu, Aremu, & Staden, 2011), ketidak-cocokan fenologi bunga jantan dan betina, tidak menghasilkan biji, penggandaan jumlah kromosom atau mengalami siklus reproduksi yang panjang (Bairu et al., 2011). Selain itu, variasi somaklonal dapat terjadi setiap saat pada tahapan kultur jaringan,

sehingga pengecekan variasi harus selalu dilakukan untuk menghindari hasil yang tidak diinginkan (Akdemir, Suzerer, Tilkat, Onay, & Ciftci, 2016).

Penanda RAPD merupakan salah satu penanda DNA yang cukup efektif, mudah dan ekonomis untuk tujuan melihat variasi somaklonal (Pathak, Dwivedi, Laddha, Begun, & Joshi, 2013). Berdasarkan penanda ini deteksi variasi somaklonal dilakukan baik pada tanaman horticultural maupun tanaman berkayu; seperti jenis mahoni Afrika (*Khaya senegalensis*) (Darwesh et al., 2017), *Pisum sativum*, *Saccharum* L. (Ghose et al., 2016), *Solanum tuberosum* (Ali et al., 2017), *Picea abies*, *Populus deltoids*, *Prunus persica*, *Pyrus pyraster* (Bairu et al., 2011), *Chrysanthemum* (Lema-Ruminska & Anna Mellem, 2017). Penggunaan penanda RAPD mampu membedakan klon, kultivar, keberadaan mutasi gen dan jumlah kromosom pada *Allium sativum* (Al-Zahim, Ford-Lloyd, & Newbury, 1999) dan varietas tebu tahan garam (Ghose et al., 2016), varietas tebu tahan garam dan kekeringan (Gadakh, Patel, & Singh, 2017).

Indikasi variasi somaklonal pada jati secara fenotipik diamati terhadap diameter, ukuran daun dan tinggi calon bibit hasil kultur jaringan (*plantlet*) (Toni Herawan, data tidak dipublikasikan). Berdasarkan pengamatan tersebut, maka penelitian ini bertujuan untuk menguji kestabilan genetik klon jati hasil kultur jaringan menggunakan penanda RAPD. Ketersediaan penanda DNA tersebut diharapkan dapat digunakan untuk tujuan praktis di lapangan seperti mengidentifikasi klon secara cepat.

II. BAHAN DAN METODE

A. Bahan

Untuk menyeleksi penanda RAPD yang bersifat konsisten dan polimorfik sehingga bisa menjadi acuan ukuran alel (bp), *template* DNA diekstraksi dari contoh daun 8 individu pohon asal kebun benih jati yang terletak di Watusipat,

Gunung Kidul. Untuk menguji stabilitas genetik klon jati, DNA diekstraksi dari contoh daun 24 ramets yang berasal dari 3 klon dan sudah mengalami sub kultur masing-masing sebanyak 2, 3 dan 4 kali. Klon tersebut ditumbuhkan menggunakan media MS (Murashige and Skoog, 1962) dengan penambahan hormon pertumbuhan pada konsentrasi 0,50 mgL⁻¹ BA dan Kinetin 0,15 mgL⁻¹. Materi genetik yang digunakan sebagai eksplan pada saat ditanam di media kultur adalah tunas aksiler dari grafting. Perbanyakkan klon secara kultur jaringan tersebut dilakukan di laboratorium kultur jaringan, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan, Yogyakarta.

B. Metode penelitian

1. Ekstraksi DNA dan analisis RAPD

Sampel daun kering dari kebun benih dan sampel basah dari kultur jaringan, masing-masing ditimbang seberat 50 dan 100 mg. Metode ekstraksi DNA, baik sampel dari kebun benih maupun kultur jaringan, menggunakan metode CTAB (Shiraishi & Watanabe, 1995).

Untuk mendapatkan penanda RAPD yang bersifat polimorfik, seleksi penanda RAPD dilakukan terhadap 9 penanda RAPD yaitu OPB-10, OPC-06, OPC-08, OPC-11, OPC-15, dan OPH-08, OPI-03, OPI-06, OPI-09 (Operon Technologies, USA, Tabel 1; (Widyatmoko, Rimbawanto, & Chasani, 2013)). Penanda RAPD polimorfik yang diperoleh digunakan untuk menguji kestabilan genetik klon hasil kultur jaringan.

Larutan PCR terdiri dari 5 ng/μL DNA, 10 pmol primer RAPD, 5x KAPATaq Extra Buffer (tanpa Mg²⁺), 0,3mM dNTP, 1,75mM MgCl₂, 1,25 U/50μL KAPATaq Extra Hot-start DNA Polymerase (KAPABIOSYSTEMS). Sesuai protokol KAPABIOSYSTEMS, kondisi mesin (Widyatmoko et al., 2013) *thermal cyclor* (*Applied Biosystem*) diatur dalam 3 tahap; tahap pertama yaitu tahap denaturasi pada suhu 95°C selama 5 menit; tahap kedua yaitu tahap *annealing* dilakukan dalam 45 siklus pada suhu

denaturasi 94°C 30 detik, suhu annealing 37°C 30 detik, dan pemanjangan 72°C 1,5 menit; tahap ketiga yaitu tahap pemanjangan terakhir pada suhu 72°C 7 menit. Hasil PCR dijalankan menggunakan alat elektroforesis (OWL) yang dialiri listrik 120 voltage pada 1,2% gel agarose khusus elektroforesis. Hasil elektroforesis dilihat menggunakan alat visualisasi yang dilengkapi dengan kamera dan lampu UV (Biorad). Pengamatan terhadap fragment DNA jati menggunakan penanda RAPD dilakukan menggunakan software geldoc (Biorad).

2. Interpretasi data

Pengumpulan data dilakukan terhadap penanda RAPD yang mempunyai lokus polimorfik yang diujikan pada sampel DNA dari kebun benih. Parameter keragaman genetik per lokus yaitu keragaman genetik (H_E), jumlah alel efektif (N_e) dan persentase lokus polimorfik dihitung menggunakan program komputer GenAlex version 6.4 (Peakall & Smouse, 2006).

Setelah mengetahui lokus-lokus polimorfik, lokus tersebut digunakan untuk menguji sampel DNA klon hasil kultur jaringan. Lokus polimorfik tersebut akan bersifat monomorfik apabila diujikan pada sampel DNA klon kultur jaringan. Kestabilan klon diamati dengan cara membandingkan lokus-lokus polimorfik yang diamati pada sampel dari kebun benih dan sampel klon kultur jaringan.

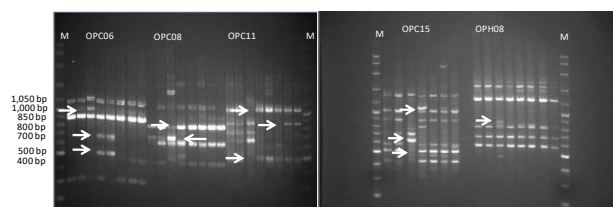
III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

Pemilihan penanda RAPD jati yang digunakan pada penelitian ini, sudah pernah

diujikan oleh Widyatmoko, et al. (2013). Hasil verifikasi yang dilakukan pada penelitian ini menunjukkan bahwa amplifikasi 5 dari 9 penanda RAPD bersifat konsisten dan polimorfik (Tabel 1). Jumlah lokus polimorfik per primer berkisar antara 1 sampai dengan 3. Ukuran lokus polimorfik berkisar antara 400 bp sampai dengan 1050 bp. Total lokus polimorfik sebanyak 12. Tabel 2 menunjukkan bahwa keragaman genetik (H_e) per lokus berkisar antara 0,248 (lokus; OPC6/500 bp) sampai dengan 0,506 (lokus; OPC6/1000 bp; OPC11/850 bp; OPC15/500 bp). Jumlah alel efektif bervariasi dari rendah ($N_e=1,159$) sampai dengan tinggi ($N_e=1,904$). Persentase lokus polimorfik sebesar 100%. Berdasarkan karakter masing-masing lokus tersebut di atas, selanjutnya lokus tersebut dijadikan acuan ukuran lokus untuk menguji 24 ramet hasil kultur jaringan.

Ramet hasil kultur jaringan menunjukkan kesamaan genetik pada lokus polimorfik. Gambar 1 menunjukkan lokus polimorfik pada sampel dari kebun benih dengan materi genetik bukan klon, sedangkan Gambar 2 menunjukkan lokus polimorfik tersebut menjadi bersifat monomorfik pada sampel klon hasil kultur jaringan. Semua ramet menunjukkan pita-pita amplifikasi yang sama pada setiap klonnya. Hal ini menunjukkan bahwa tanaman hasil kultur jaringan tersebut mempunyai kesamaan genetik atau tidak menunjukkan variasi genetik.



Keterangan: OPC06, OPC08, OPC11, OPC15, OPH08: nama penanda RAPD, M: penanda ukuran DNA, bp: satuan ukuran lokus, panah: posisi lokus polimorfik

Gambar 1. Profil 12 lokus polimorfik dari lima penanda RAPD menggunakan 8 individu jati asal kebun benih

Tabel 1. Urutan nukleotida dan karakteristik amplifikasi primer RAPD yang digunakan dalam proses pemilihan penanda polimorfik pada jati

Nama primer	Urutan nukleotida 5'-3'	Karakter lokus	Jumlah lokus polimorfik	Ukuran lokus polimorfik (bp)
OPB10	CTGCTGGGAC	Amplifikasi tidak konsisten	-	-
OPC06	GAACGGACTC	Amplifikasi konsisten dan polimorfik	3	500, 700, 1000
OPC08	TGGACCGGTG	Amplifikasi konsisten dan polimorfik	2	700, 800
OPC11	AAAGCTGCGG	Amplifikasi konsisten dan polimorfik	3	400, 850, 1050
OPC15	GACGGATCAG	Amplifikasi konsisten dan polimorfik	3	500, 650, 1050
OPH08	GAAACACCCC	Amplifikasi konsisten dan polimorfik	1	800
OPI03	CAGAAGCCCA	Amplifikasi tidak konsisten	-	-
OPI06	AAGCGGCAG	Amplifikasi tidak konsisten	-	-
OPI09	TGGAGAGCAG	Amplifikasi tidak konsisten	-	-
	Jumlah primer/ lokus polimorfik	5	12	

Tabel 2. Parameter keragaman genetic berdasarkan 12 lokus polimorfik RAPD menggunakan 8 individu jati asal kebun benih

Penanda RAPD	Ukuran lokus (base pair)	N	Ne	He
OPC06	500	8	1,302	0,248
	700	8	1,302	0,248
	1000	8	1,904	0,506
OPC08	700	8	1,495	0,353
	800	8	1,842	0,488
OPC11	400	8	1,842	0,488
	850	8	1,904	0,506
	1050	8	1,842	0,488
OPC15	500	8	1,888	0,506
	650	8	1,159	0,148
	1050	8	1,585	0,397
OPH08	800	8	1,842	0,488

Keterangan: N: jumlah sampel, Ne: jumlah alel efektif, He: nilai keragaman genetik harapan

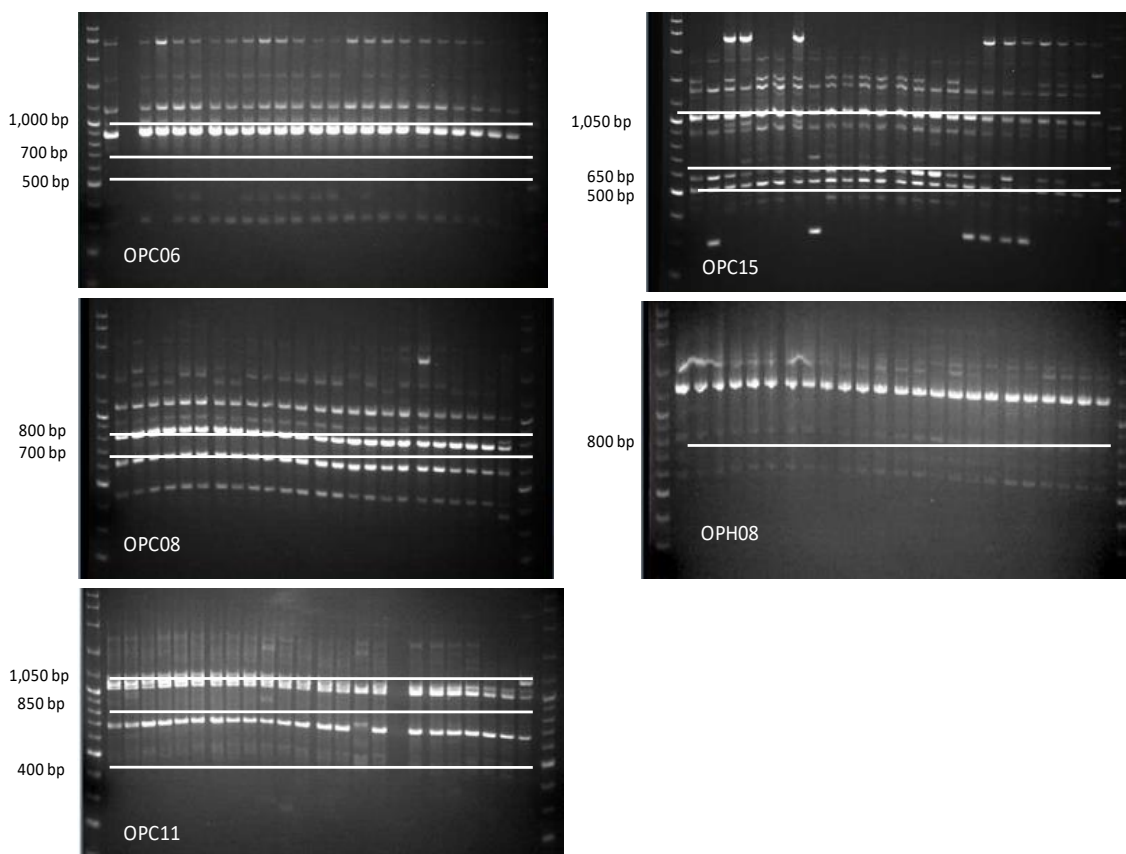
B. Pembahasan

Variasi somaklonal tidak terjadi pada sample klon jati hasil kultur jaringan yang diujikan. Banyak faktor yang menyebabkan tidak ditemukannya variasi somaklonal pada tanaman hasil kultur jaringan, seperti sumber eksplan, perlakuan zat pengatur tumbuh, lamanya kultur dan sensitivitas penanda DNA yang digunakan (Sarmiento, Martins, & Oliveira, 2005; Agbidinoukoun et al., 2017; Sarmah, Sutradhar, & Singh, 2017). Sumber eksplan dari jaringan yang masih aktif membelah seperti kambium kemungkinan dapat mengurangi terjadinya variasi. Sebaliknya jaringan yang sudah mengalami diferensiasi seperti akar dan daun, jaringan chimera dan kalus dapat memicu


terjadinya variasi (Leva, Petruccelli, & Rinaldi, 2012). Kultur tunas aksiler tanpa perlakuan *cryopreservation* pada umumnya tidak memicu terjadinya variasi somaklonal (Krishna et al., 2016). Hasil penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian sebelumnya bahwa kultur tunas aksiler tidak menyebabkan terjadinya variasi somaklonal. Penambahan hormon sitokinin seperti BA dapat merangsang terjadinya morfogenesis melalui perusakan siklus sel. Perlakuan BA pada konsentrasi tinggi ($15-30 \text{ mgL}^{-1}$) menyebabkan variasi somaklonal pada pisang dan padi dengan cara meningkatkan jumlah kromosom (Bairu et al., 2011). Namun demikian, studi lain juga melaporkan bahwa penggunaan BA tidak menyebabkan munculnya

variasi somaklonal, atau menyebabkan variasi somaklonal dalam nilai yang kecil (< 6%; Bhalang et al., 2018). Hingga saat ini, pengaruh hormon BA terhadap variasi somaklonal masih diperdebatkan. Pada penelitian ini menggunakan hormon kombinasi antara BA pada konsentrasi 0,5 mgL⁻¹ dan Kinetin pada konsentrasi 0,15

mgL⁻¹ tidak mengakibatkan munculnya variasi somaklonal. Konsentrasi BA yang digunakan pada penelitian sangat kecil (0,5 mgL⁻¹) apabila dibandingkan dengan konsentrasi pada pisang dan padi (15-30 mgL⁻¹) sehingga tidak berpengaruh pada terbentuknya variasi somaklonal pada jati.



Keterangan :

 : posisi lokus monomorfik pada sampel klon

Gambar 2. Target lokus polimorfik pada Gambar 1 menampakkan lokus monomorfik pada 24 ramet hasil kultur jaringan

Frekuensi sub kultur dianggap sebagai salah satu penyebab munculnya variasi somaklonal. Variasi somaklonal meningkat dengan semakin banyaknya frekuensi sub kultur (Akdemir et al., 2016); Roostika, Khumaida, & Ardie, 2015; Agbidinokoun et al., 2017). Variasi terjadi setelah sub kultur ke-4 (Bairu et al., 2011) atau setelah sub-kultur ke 8 pada kultur pisang (Krishna et al., 2016). Kultur jati yang digunakan pada penelitian ini merupakan hasil sub kultur ke-2, ke-3 dan ke-4, apabila

dibandingkan dengan laporan sebelumnya, frekuensi sub kultur jati tersebut masih kecil. Selain itu, kecepatan multiplikasi juga menyebabkan variasi somaklonal; semakin mudah dimultiplikasi maka semakin mudah mengalami variasi somaklonal (Bairu et al., 2011). Karakter multiplikasi jati pada penelitian ini menunjukkan laju multiplikasi yang rendah, satu tunas aksiler hanya menghasilkan 2-5 tunas baru (Toni Herawan, data tidak dipublikasikan). Frekuensi multiplikasi yang rendah pada jati

dapat menjadi salah satu penyebab tidak munculnya variasi somaklonal.

Jumlah primer RAPD yang digunakan untuk menguji variasi somaklonal klon hasil kultur jaringan berkisar antara 2 (Chinmayee, Aadeshkumar, & Monica, 2012; Hattab, El-Kaaby, & Saadon Abdulhadi Al-Ajeel, 2017), puluhan (Roostika et al., 2015) hingga ratusan primer (Sarmiento et al., 2005). Selain itu, jumlah sampel yang digunakan tidak terlalu banyak, berkisar antara 1 sampai 4 sampel klon (Darwesh et al., 2017; Roostika et al., 2015; Khoddamzadeh et al., 2010; Agbidinokoun, Missihoun, Akonde, Sagbadja, Agbangla, & Ahanhanzo, 2017). Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa pada region tertentu dalam untai DNA mempunyai titik (*hot spot*) instabilitas sehingga akan dengan mudah mendeteksi variasi somaklonal meskipun menggunakan primer dan sampel dengan jumlah terbatas (Linacero, Alves, & Vazquez, 2000; Hattab et al., 2017). Sebaliknya, beberapa penelitian melaporkan bahwa variasi somaklonal tidak ditemukan meskipun menggunakan ratusan primer RAPD. Variasi somaklonal tidak ditemukan karena terjadi kestabilan genetik pada target fragment DNA (Agbidinokoun et al., 2017). Usaha untuk menambah jumlah primer RAPD dilakukan untuk memvalidasi terjadinya kestabilan genetik (Sarmiento et al., 2005).

Penanda RAPD sering diaplikasikan untuk mengidentifikasi variasi somaklonal (Roostika et al., 2015; Gadakh et al., 2017), meskipun amplifikasi penanda RAPD sering tidak konsisten karena sekuen primer berukuran pendek (10 bp) dan menempel secara acak pada untai DNA. (Sarmiento et al., 2005; Agbidinokoun, Missihoun, Akonde, Sagbadja, Agbangla, & Ahanhanzo, 2017). Untuk meminimalis kelemahan ini, hal yang perlu dilakukan adalah harus mengacu pada protokol yang baku dan metode pemilihan lokus yang tepat (Bairu et al., 2011). Metode yang sering digunakan untuk mendeteksi variasi somaklonal menggunakan penanda RAPD adalah

membandingkan pohon induk di lapangan sebagai tanaman kontrol dengan klonnya (Roostika et al., 2015, Ghose et al., 2016) atau membandingkan antar ramet dalam klon yang sama (Govinden-Soulange, Somanah, Ranghoo-Sanmukhiya, Boodia, & Rajkomar, 2010). Pada penelitian ini, untuk menentukan lokus RAPD yang dapat membedakan klon dan bukan klon ditempuh melalui dua kali proses screening primer yaitu screening lokus polimorfik dengan amplifikasi konsisten pada sampel bukan klon, kemudian lokus polimorfik tersebut diaplikasikan pada sampel klon hasil kultur jaringan. Lokus polimorfik tersebut teramplifikasi monomorfik pada sampel klon hasil kultur jaringan. Meskipun amplifikasi penanda RAPD bersifat tidak konsisten, namun setidaknya, proses screening ini dapat memberi acuan ukuran lokus. Namun demikian, oleh karena amplifikasi penanda RAPD bersifat tidak konsisten maka ada baiknya kestabilan genetik pada klon jati hasil kultur jaringan divalidasi menggunakan penanda DNA lainnya.

Penanda RAPD mampu mendeteksi perubahan urutan basa pada untai DNA. Oleh karena itu, pencarian penanda RAPD bermanfaat untuk mengidentifikasi individu klon secara cepat pada produksi bibit dalam jumlah banyak / massal apabila terjadi perubahan urutan basa karena proses mutasi atau kesalahan pada pelabelan.

IV. KESIMPULAN

Berdasarkan penanda RAPD yang digunakan, variasi somaklonal tidak ditemukan pada klon jati hasil kultur jaringan. Untuk memvalidasi kestabilan genetik pada klon jati ini masih perlu menambahkan jumlah penanda RAPD atau menggunakan penanda DNA lainnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Saudari Wahyunisari yang telah membantu kegiatan penelitian analisis RAPD di

laboratorium Genetika Molekuler. Penulis juga berterimakasih kepada Saudara Endin Izudin yang telah membantu penyiapan materi genetik berupa klon jati yang digunakan pada penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Agbidinokoun, A., Missihoun, A. A., Akonde, P., Sagbadja, A. H., Agbangla, C., & Ahanhanzo, C. (2017). Assessment for the incidence of number of subcultures on genotype stability for in Vitro plantlets of yam (*Dioscorea* spp.) using RAPD markers. *International Journal of Current Research in Biosciences and Plant Biology*, 4(4), 32–38.
- Akdemir, H., Suzerer, V., Tilkat, E., Onay, A., & Ciftci, Y. O. (2016). Detection of variation in long-term micropropagation mature pistachio via DNA-based molecular markers. *Appl Biochem Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2168-7>
- Al-Zahim, M. A., Ford-Lloyd, B. V., & Newbury, H. J. (1999). Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis. *Plant Cell Reports*, 18, 473–477.
- Ali, A. A., El-Denary, M. E., El-Gendy, A., Galal, O. A., Ahmad, M. E., & Tahany R. El-Sayed. (2017). Detection of somaclonal variations in tomato using RAPD markers. *Egypt. J. Genet. Cytol*, 46, 89–99.
- Bairu, M. W., Aremu, A. O., & Staden, J. Van. (2011). Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regul*, 63, 147–173.
- Bhalang, D., Prabhuling, G., Hipparagi, K., Raghavendra, S., Prakash, D. P., & A.G. Babu. (2018). Analysis of the genetic stability of banana tissue culture propagated plantlets cv. Ney Poovan (AB) using morphological and molecular markers. *Int. J. Curr. Microbiolgy and Applied Sciences*, 7(1), 1007–1018.
- Cao, Z., Sui, S., Cai, X., Yang, Q., & Deng, Z. (2016). Somaclonal variation in Red *Flash caladium*: morphological, cytological and molecular characterization. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 126, 269–279.
- Chinmayee, S. P., Aadeshkumar, S. S., & Monica, R. S. (2012). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) detection of somaclonal variants in commercially micropropagated banana (*Musa* spp. cultivar grand naine). *American Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2(4), 235–240.
- Darwesh, M. A., Naser, A. A., Habba, E. E. A., Taha, L. S., Garb, A. M. ., & El-Assaly, R. M. B. (2017). In vitro propagation protocol for improving African mahogany (*Khaya senegalensis*) endangered tree. *Journal of Biological Sciences*, 17(5).
- Gadakh, S. S., Patel, D. U., & Singh, D. (2017). Use of RAPD markers to characterize salt and drought line of sugarcane. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.*, 4(5), 50–57.
- Ghose, A. K., Hasan, M. K., Mahmud, K., Islam, N., Rahman, M. A., Shadid, S. B., & Hossain, M. A. (2016). Assessment of somaclonal variation among sugarcane varieties for salt tolerance through RAPD markers. *Fundamental and Applied Agriculture*, 1(3), 136–140.
- Govinden-Soulangé, J., Somanah, D., Ranghoo-Sanmukhiya, M., Boodia, N., & Rajkomar, B. (2010). Detection of somaclonal variation in micropropagated *Hibiscus sabdariffa* L. using RAPD markers. *University of Maurittus Research Journal*, 16, 435–447.
- Hattab, Z. N. Al, El-Kaaby, E. A., & Saadon Abdulhadi Al-Ajeel. (2017). Molecular analysis of somaclonal variations in chili pepper (*Capsicum annum* L). *Bioscience Research*, 14(4), 831–838.
- Khoddamzadeh, A. A., Sinniah, U. ., Kadir, M. A., Kadzimin, S. ., Mahmood, M., & S, S. (2010). Detection of somaclonal variation by random amplified polymorphic DNA analysis during micropropagation of *Phalaenopsis bellina* (Rechb.f.) Christenson. *African Journal of Biotechnology*, 9(40), 6632–6639.
- Krishna, H., Alizadeh, M., Singh, D., Singh, U., Chauhan, N., Eftekhari, M., & Sadh, R. K. (2016). Somaclonal variation and their applications in horticultural crops improvement. *3 Biotech*, 6, 6–54.
- Lema-Ruminska, J., & Anna Mellem. (2017). Genetic diversity of *Chrysanthemum* plants derived via somatic embryogenesis using RAPD markers. *Aca Sci. Pol. Hortorum Cultus*, 16(6), 149–156.
- Leva, A. R., Petruccelli, R., & Rinaldi, L. M. R. (2012). Somaclonal variation in tissue culture: a case study with olive. In *Recent advances in plant in vitro culture* (pp. 123–150).
- Linacero, R., Alves, E. F., & Vazquez, A. M. (2000). Hot spots of DNA instability revealed through the study of somaclonal variation in rye. *Theor Appl Genet*, 100, 506–511.

- Pathak, A., Dwivedi, M., Laddha, N. C., Begun, R., & Joshi, A. (2013). Detection of somaclonal variants using RAPD marker in *Bacopa monnieri* and *Tylophora indica*. *Journal of Agricultural Technology*, 9(5), 1253–1260.
- Peakall, R., & Smouse, P. E. (2006). GenAlex 6: Genetic analysis in excel, Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6, 288–295.
- 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.
- Sarmah, D., Sutradhar, M., & Singh, B. K. (2017). Somaclonal variation and its application in ornamentals plants. *Int.J.Pure App.Biosci*, 5(2), 396–406.
- Sarmiento, D., Martins, M., & Oliveira, M. M. (2005). Evaluation of somaclonal variation in almond using RAPD and ISSR markers. In M. M. Oliveira & V. Cordeiro (Eds.), *XIII GREMPA Meeting on Almond and Pistachios* (pp. 391–395).
- Shiraishi, S., & Watanabe, A. (1995). Identification of chloroplast genome between *Pinus densiflora* Sieb et Zucc and *P. thumbergii* Parl based on the polymorphism in rbcL gene. *Journal of Japanese Forestry Society*, 77, 429–436.
- Widyatmoko, A., Rimbawanto, A., & Chasani, A. R. (2013). Hubungan kekerabatan antar populasi jati (*Tectona grandis*, Linn.F.) berdasarkan penanda RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*). *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*, 7(3), 151–166.