

Keragaman Genetik Pamelo Indonesia berdasarkan *Primer Random Amplified Polymorphic DNA*

Agisimanto, D. dan A. Supriyanto

Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika, Jl. Raya Junrejo No. 1 Tlekung, Batu 65301
Naskah diterima tanggal 25 Mei 2005 dan disetujui untuk diterbitkan 8 Pebruari 2006

ABSTRAK. Analisis keragaman genetik diperlukan untuk mengetahui hubungan kekerabatan 18 varietas jeruk pamelo Indonesia. Penelitian bertujuan mengetahui keragaman genetik beberapa varietas pamelo berdasarkan primer RAPD. Daun dari tunas muda berumur 20-25 hari diekstrak untuk mendapatkan *bulk DNA*. Setiap sampel DNA dari setiap varietas diamplifikasi menggunakan 15 primer RAPD dan disepariasi menurut metode elektroforesis. Hasil visualisasi fragmen pita DNA dihitung berdasarkan ada dan tidaknya pita DNA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 2 primer RAPD, yaitu OPN14 dan OPN16 membedakan varietas pamelo yang dianalisis. Tiga kelompok besar pamelo telah terkelompok dan menunjukkan kekerabatan yang dekat serta memperlihatkan kesamaan yang tinggi menurut daerah asal dan karakter buah.

Katakunci: *Citrus maxima*; Primer RAPD; Keragaman genetik.

ABSTRACT. Agisimanto, D. and A. Supriyanto. 2007. Genetic Diversity of Pummelo Based on Primer Random Amplified Polymorphic DNA. Genetic variability is needed to understand relationship among 18 pummelo varieties in Indonesia. The objective of the research was to characterize genetic diversity of some pummelo varieties in Indonesia based on RAPD primer. Leaves from young flush, 20-25 days, were extracted and amplified by 15 RAPD primers. Bands of DNA were scored based on their presence and absence. Two primers of OPN 14 and OPN 16 were selected to visualize band pattern of pummelo varieties. At least, 3 groups of pummelos were clustered that showed closely relationship and highly similarity by place of origin and fruit characteristics.

Keywords: *Citrus maxima*; RAPD Primers; Genetic diversity.

Keragaman genetik merupakan faktor penting dalam melakukan pemuliaan tanaman. Nilai se-

buah plasma nutfah akan meningkat bila plasma nutfah itu dilengkapi dengan data pola keragaman secara morfologi, genotip (karakterisasi), dan responsnya terhadap cekaman biotik dan abiotik (evaluasi) (Virk *et al.* 1995). Pengukuran keragaman merupakan tahapan yang penting dalam membangun hubungan genetik. Tahapan ini juga menjadi proses penting dalam karakterisasi plasma nutfah dan konservasi untuk mengendalikan erosi genetik yang lebih efektif, merancang strategi sampling dan mendasari proses pemuliaan (Herero *et al.* 1996). Data molekuler plasma nutfah berguna untuk perencanaan penanaman dan strategi pertukaran tanaman, menghitung jarak genetik koleksi, mengidentifikasi duplikat akses, memonitor perubahan struktur genetik, dan menemukan gen baru yang bermanfaat. Produk analisis molekuler berguna pula sebagai identitas tanaman. Penggunaan polimorfisme DNA dalam proses identifikasi bibit jeruk adalah penting untuk mempercepat skrining progeni dalam program pemuliaan jeruk.

Berbagai teknik molekuler telah digunakan untuk studi keragaman genetik dan hubungan di antara tanaman. Perkembangan mutakhir dari metode perbanyakan sintesis menggunakan alat PCR dan primer RAPD telah menjadikan teknologi ini sebagai teknologi yang mudah digunakan untuk menemukan keragaman di antara tanaman-tanaman yang dihasilkan dari kultur jaringan atau tanaman hasil biakan lainnya (Brown 1991). *Random amplified polymorphic DNA (RAPD)* adalah penanda DNA yang paling banyak digunakan untuk mengkarakter genetik berbagai tanaman, terdiri dari 10 basa sekuen *arbitrary*, dan mengandung paling sedikit 60% GC. Teknik penanda RAPD, memungkinkan analisis DNA dilakukan dengan cepat, mudah, dan tidak memerlukan informasi awal sekuen.

Pada jeruk, analisis RAPD telah digunakan untuk pemetaan genetik (Cai *et al.* 1994), studi hubungan genetik di antara spesies dan kultivar jeruk (Luro *et al.* 1992, Machado *et al.* 1996), identifikasi genetik jeruk hibrida Mandarin (Eli-

siario *et al.* 1999), identifikasi mutan lemon (Deng *et al.* 1995), chimera (Sugawara dan Oowada 1995) dan identifikasi penanda DNA yang terpaut dengan sifat agronomi penting (Cheng dan Roose 1995, Gmitter *et al.* 1996) identifikasi antargenus jeruk dengan genus kerabatnya (Federici *et al.* 1998), dan studi variasi genetik jenis-jenis jeruk keprok (Mandarin) (Coletta-Filho *et al.* 1998), *grapefruit* dan pamelu (Corazza-Nunes *et al.* 2002).

Penelitian ini bertujuan melihat keragaman beberapa jenis pamelu asal berbagai daerah yang dikoleksi oleh Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika Tlekung, Batu. Data keragaman diperlukan untuk membuktikan status kekerabatan genotip beberapa varietas yang berasal dari lokasi yang sama atau berdekatan.

BAHAN DAN METODE

Material Tanaman

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan dan Virologi Balitjeruk dan Buah Subtropika Batu dan Laboratorium Biologi Molekuler Balitbiogen (BB Biogen) Bogor, pada bulan September dan Oktober 2002.

Sebanyak 18 jenis pamelu di antaranya pohon induk tunggal (PIT) digunakan untuk analisis genotip (Tabel 1). Beberapa tanaman tersebut dikoleksi dari berbagai daerah dan belum memiliki nama populer, sedangkan lainnya dari jenis komersial. Tanaman dipelihara di dalam pot tanam. Untuk memperoleh tunas muda, media tumbuh tanaman dikeringkan selama 10-14 hari. Kemudian tanaman dipupuk dan disiram. Daun muda yang muncul dan berumur 20-25 hari digunakan sebagai bahan untuk mendapatkan DNA.

Ekstraksi, Amplifikasi, dan Deteksi DNA

Ekstraksi DNA pamelu dilakukan menurut metode preparasi mini berdasarkan metode Deng (1996) yang dimodifikasi. Daun jeruk digerus menggunakan nitrogen cair. Tepung daun dimasukkan ke dalam tabung sentrifus kapasitas 2 ml hingga volume 200 μ l. Setiap sampel diekstrak dengan 800 μ l buffer ekstrak (3% CTAB, 1,4M NaCl, 20 mM EDTA dan 100 mM Tris-HCl pH 8,0 dan suhu 60°C) dan 100 μ l 10% sarkosil, dan diinkubasi dalam *waterbath* suhu 65°C selama 30

menit. Pemisahan DNA dilakukan dengan penambahan 700 μ l kloroform dan isoamil alkohol (24:1) pada 300 μ l larutan DNA di dalam tabung sentrifus dan disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit. Presipitasi dilakukan dengan menambahkan etanol absolut ke dalam tabung berisi supernatan. Pelet DNA dikeringkan dan dilarutkan kembali di dalam buffer TE (100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8,0). Uji kualitas dan kuantitas DNA dilakukan pada gel elektroforesis agarose 0,8% berdasarkan metode Sambrook *et al.* (1989).

Amplifikasi sampel DNA jeruk dilakukan pada mesin PCR dengan profil 1 siklus denaturasi suhu 95°C selama 5 menit, diikuti 44 siklus denaturasi suhu 95°C selama 1 menit, *annealing* suhu 45°C selama 1 menit dan ekstensi suhu 72°C selama 2 menit. Siklus PCR diakhiri dengan 1 siklus ekstensi akhir suhu 72°C selama 7 menit. Setiap sampel dicampur dengan 20 μ l pereaksi PCR yang mengandung 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 0,2 mM dNTPs, 2,5 mM MgCl₂, 0,3 μ M Primer dan 1 unit Taq DNA polimerase. Sebanyak 15 primer RAPD, yaitu OPB14, OPE14, OPW5, OPW12, OPB5, OPA17, OPE17, OPE18, OPN14, OPB17, OPN16, OPA16, OPB10, OPN18, dan OPN8 telah diamplifikasi selama survei polimorfisme untuk membedakan varietas jeruk. Dari 15 primer tersebut, primer OPN14 dan OPN16 dipilih untuk membuat dendrogram keragaman jeruk pamelu. Pemisahan fragmen RAPD hasil amplifikasi dilakukan dengan metode elektroforesis pada gel agarose 1,4% di dalam larutan 0,5X TBE selama 4 jam pada tegangan arus listrik 80 volt. Deteksi pita DNA dilakukan dengan merendam gel agarose di dalam larutan etidium bromida (10 mg/L) selama 5 menit dan didokumentasi pada film polaroid dengan kamera UV.

Skoring dan Analisis Data

Pita-pita DNA yang terbentuk dari hasil amplifikasi PCR dianggap sebagai 1 karakter yang mewakili 1 lokus DNA. Semua pita DNA dengan laju migrasi yang sama diasumsikan sebagai lokus yang homolog. Data profil DNA selanjutnya diterjemahkan ke dalam data biner dengan ketentuan nilai nol (0) untuk tidak ada pita DNA dan satu (1) untuk adanya pita DNA pada satu posisi yang sama.

Dendrogram dibangun berdasarkan analisis

data biner program NTSys. Pengelompokan atau klusterisasi data matriks yang dihasilkan disusun menurut UPGMA menggunakan metode SHAN pada program NTSys.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sejumlah primer tunggal random 10-mer digunakan untuk mencirikan sekuen jeruk pamelo yang akan diamplifikasi. Polimorfisme diamati, dideteksi, dan diskor sebagai fragmen-fragmen (pita-pita) DNA yang muncul dan tidak muncul sebagai akibat keragaman sekuen karena mutasi basa-basa nukleotida. Produk amplifikasi diseparasi pada gel agarose dengan pewarnaan etidium bromida dan divisualisasi di bawah cahaya ultra violet. Perbedaan itu disebabkan oleh perbedaan sekuen pada *primer binding site*. Teknik ini cepat, sederhana, efisien, dan hanya memerlukan sedikit DNA (10 ng) per reaksi, namun memiliki kelemahan yang cukup signifikan yaitu daya pengulangan yang rendah.

Hasil amplifikasi dan pengamatan selama survei polimorfisme menunjukkan bahwa 2 primer yaitu OPN14 (5' TCGTGCGGGT 3') dan

OPN16 (5' AAGCGACCTG 3') merata menghasilkan jumlah pita DNA terbanyak (Tabel 1) dibanding primer lainnya. Beberapa primer lainnya juga mampu membedakan varietas-varietas pamelo (gambar tidak direkam), namun jumlah pita DNA yang diamplifikasi lebih rendah, sehingga keragaman yang dapat diamati lebih rendah. Pola pita yang dihasilkan oleh kedua primer (OPN14 dan OPN16) dapat dilihat pada Tabel 2. Gambar pohon kekerabatan jeruk (dendrogram) berdasarkan Tabel 2 dapat dilihat pada Gambar 1 dan 2. Pola keragaman fragmen RAPD bermanfaat untuk menilai kontribusi genetik berbagai *lineage* (kekerabatan) kultivar modern.

Primer OPN16 membagi plasma nutfah jeruk pamelo menjadi 2 kelompok besar dengan koefisien kemiripan 65%. Kelompok pertama memiliki kemiripan 88%, disusun oleh 4 subkluster jeruk pamelo yang berasal dari 4 daerah sentra jeruk, yaitu Magetan (Jatim), Kalimantan Selatan, Jawa Barat, Timor Tengah Selatan, dan NTT. Tiga jeruk pamelo komersial, yaitu Nambangan, Sri Nyonya, dan Cikoneng berada terpisah pada subkluster-subkluster di kelompok ini dengan kemiripan berkisar 90%. Kelompok subkultur kedua terdiri dari PIT Magetan, Buton, Pangkajene

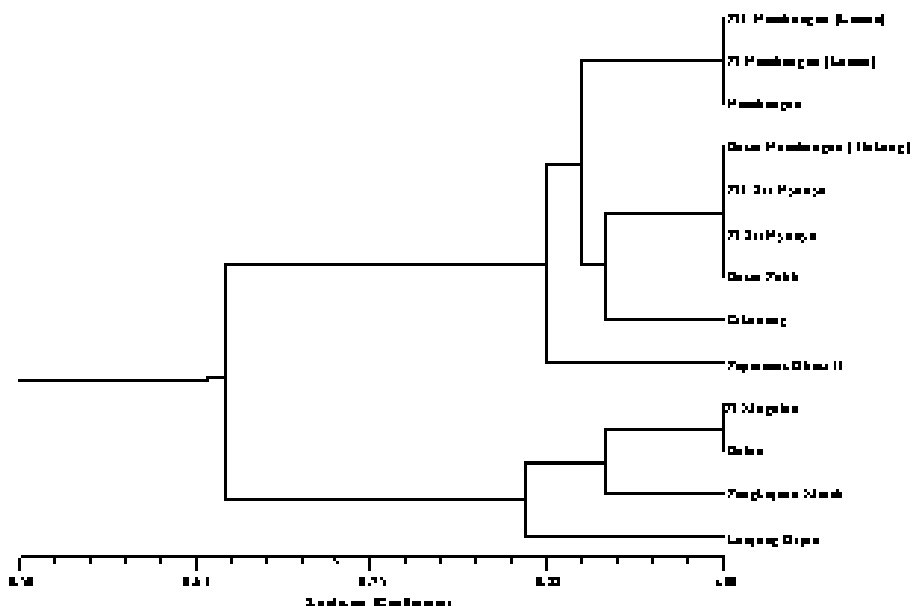
Tabel 1. Daftar varietas pamelo asal daerah dan jumlah pita DNA yang terekplorasi (*Indonesian local pummelo varieties, their origin and the DNA bands numbers*)

Varietas (Asal daerah)	Asal (Provinsi)	OPN 14	OPN 16	Estimasi (Jumlah pita)
71 Nambangan (Lumut)	Magetan, Jatim	7	11	13
71 Nambangan (Lumut)	Magetan, Jatim	7	11	13
0201 Nambangan (Nakong)	Magetan, Jatim	7	10	13
Nambangan	Magetan, Jatim	7	11	13
71 Nyonya	Magetan, Jatim	7	7	13
71 Sri Nyonya	Magetan, Jatim	3	10	13
71 Sri Nyonya	Magetan, Jatim	3	10	13
Cikoneng	Jawa Barat	6	9	11
Pangkajene Merah	Sulawesi Selatan	7	6	11
Buton	Sulawesi Tenggara	7	7	13
0201 Digen	Sumatra, Jatim	3	8	3
Lampung Digen	Sumatra, Jatim	6	7	11
Dela	Magetan, Jatim	7	7	13
70 pamelu Dikau I	113, P II	6	8	6
70 pamelu Dikau II	113, P II	6	11	11
0201 Merah	Sulawesi Selatan	7	8	7
0201 Putih	Sulawesi Selatan	3	10	13
7016 Lumut Baru	Jawa Timur	4	8	4

Tabel 2. Pola pita DNA jeruk pamele Indonesia hasil amplifikasi primer RAPD OPN14 dan OPN16
(Banding patterns of pummelo varieties amplified by OPN14 and OPN 16 of RAPD primers)

Varietas (Varieties)	Primer OPN16	Primer OPN14
PTT Mandailing (Lace)	+	+
PTT Mandailing (Lace)	+	+
Stara Mandailing (Tidung)	+	+
Mandailing	+	+
PT Magelan	-	-
PT Si Melayu	+	+
PT Si Melayu	+	+
Chelang	+	+
Panghayan Mand	-	-
Sulan	-	-
Sulan Hijau	-	-
Layang Hijau	-	-
Dudu	+	+
Papayan Oban I	-	-
Papayan Oban II	+	+
Stara Mand	-	-
Stara Puh	+	+
Puh Langabji	+	+

Keterangan: tanda + adalah skor 1, - adalah skor 0 (Remarks: sign + is scored 1 and - is none)



Gambar 1. Keragaman pamele Indonesia berdasarkan primer RAPD OPN16 (Dendrogram of tested Indonesian pummelo based on OPN16 RAPD primers)

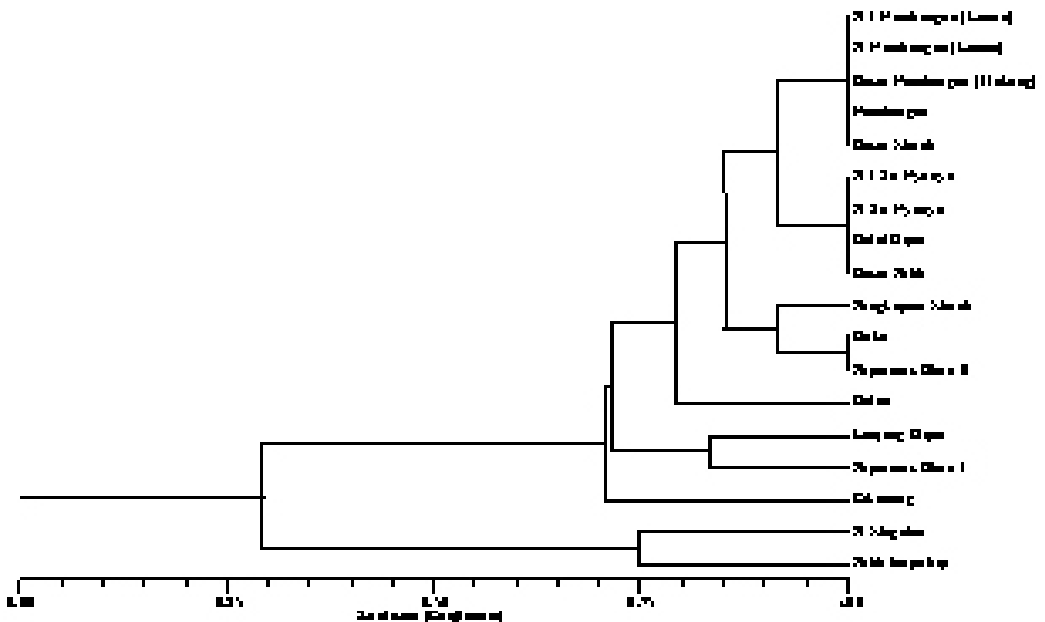
Merah, dan Lonjong Hijau. Klaster besar kedua memisahkan pamelo Magetan dan Pangkajene Merah dengan perbedaan sekitar 10%.

Primer OPN14 mengelompokkan plasma nutfah pamelo menjadi 2 kelompok dengan kemiripan sekitar 30%. Berbagai varietas pamelo dari berbagai lokasi terkelompok di dalam rumpun yang sama. Subklaster pertama adalah kelompok pamelo Nambangan (Magetan, Jatim), subklaster kedua pamelo Sri Nyonya dan ketiga adalah Pangkajene Merah. Ketiga pamelo komersial ini memiliki koefisien kemiripan 90%. Sementara Cikoneng berada di luar subklaster ketiga pamelo di atas dengan perbedaan mencapai 30%. pamelo Magetan membentuk kelompok sendiri bersama pamelo Putih tanpa biji dengan perbedaan keduanya berkisar 25%. Kedua pamelo terakhir ini memiliki buah tanpa biji.

Secara keseluruhan berbagai jenis pamelo dari beberapa lokasi di Indonesia, khususnya Jawa Timur memiliki kemiripan yang tinggi. Tiga pamelo komersial, yaitu pamelo Nambangan, Sri Nyonya, dan Magetan yang berasal dari Magetan memiliki genotip yang berbeda berdasarkan OPN14 dan OPN16. Dari kedua gambar tersebut terlihat bahwa beberapa varietas yang berasal

dari daerah yang sama (Jatim) memiliki kemiripan 100%. Artinya varietas-varietas tersebut secara genetik sama ha-nya berbeda nama karena dikoleksi dari berbagai sentra penanaman. Pemin-dahan mata tunas antar-lokasi dan adaptif biasanya menyebabkan pem-bentukan nama baru. Hal yang sama mungkin ter-jadi pada jenis yang lain. Pamelo komersial yang lain, seperti Cikoneng dan Pangkajene Merah, se-cara genetik juga berbeda dengan varietas komer-sial yang lain. Sebuah hasil yang menarik adalah terkelompoknya pamelo Magetan dengan pamelo Putih tanpa biji dari perbanyakkan dengan primer OPN14. Pengelom-pokan varietas-varietas pamelo dengan primer OPN14 mengesankan pembedaan antara pamelo tanpa biji dan berbiji. Kepastian anggapan tersebut perlu ditindaklanjuti dengan seleksi penanda DNA yang lebih spesifik.

Genetik molekuler memainkan peranan penting pada berbagai aspek konservasi tanaman seperti untuk deteksi, karakterisasi, dan evaluasi keragaman genetik. Karakterisasi yang dulu dilakukan secara langsung dengan pengamatan fenotipik, sekarang dengan kemajuan di bidang biologi molekuler pengamatan dapat dilakukan dengan lebih teliti pada level DNA, yaitu den-



Gambar 2. Keragaman jeruk pamelo Indonesia berdasarkan primer RAPD OPN14 (*Dendrogram of tested Indonesian pummelo based on OPN14 RAPD primers*)

gan bantuan penanda DNA. Bila dibandingkan pengamatan fenotipik, karakterisasi dengan bantuan penanda molekuler menjanjikan akurasi dan efisiensi yang lebih tinggi. Identifikasi dilakukan pada level DNA, tidak dipengaruhi oleh lingkungan dan dapat dilakukan pada tahap awal pertumbuhan tanaman (Hittalmani *et al.* 1995).

Sejumlah metode telah digunakan untuk mengidentifikasi kulitvar-kultivar jeruk (Roose 1988, Deng *et al.* 1995, Kijas *et al.* 1995, Luro *et al.* 1995). Analisis isozim mampu membedakan kulitvar yang dihasilkan dari reproduksi seksual, namun tidak mampu membedakan kultivar yang berubah akibat mutasi (Roose 1988, Herero *et al.* 1996). *Random fragment length polymorphisms* (RFLP) dikenal mempunyai polimorfisme sangat tinggi pada jeruk (Roose 1988), namun karena kejadian mutasi yang menyebabkan munculnya karakter fenotip baru pada sebuah kulitvar mungkin mempengaruhi hanya porsi yang kecil pada genom, mungkin hanya 1 nukleotida. Analisis RFLP yang menggunakan probe DNA secara random diseleksi dari genom, sepertinya tidak mungkin mendeteksi secara efisien. Teknik lain yang lebih efisien adalah RAPD (Santos *et al.* 1994, Rajapakse *et al.* 1995).

Metode perbanyak sintesis berbasis PCR mudah digunakan untuk menemukan keragaman di antara tanaman-tanaman yang dihasilkan dari kultur jaringan atau tanaman hasil biakan lainnya (Brown 1991). Sejumlah penelitian telah dilaporkan potensi penggunaan RAPD untuk karakterisasi tanaman. Sejak RAPD diperkenalkan pada tahun 1990 (Williams *et al.* 1990), penggunaan RAPD dalam analisis genetik tanaman telah meningkat disebabkan karena kemudahan prosedurnya dan kebutuhan DNA dalam jumlah sangat sedikit. Analisis RAPD telah digunakan untuk karakterisasi genotip (Lu *et al.* 1996), pemetaan genetik (Chaparro *et al.* 1994), dan untuk mengidentifikasi penanda DNA yang terpaut dengan gen tertentu (Nair *et al.* 1996). Analisis RFLP juga telah digunakan untuk mengidentifikasi genetik beberapa spesies, seperti Malus (Harada *et al.* 1993) dan Peach (Pooler dan Scorza 1995).

Metode RFLP mampu membedakan varietas jeruk sebagai akibat mutasi klonal seperti kulti-

var-kultivar jeruk manis. Cara RFLP pada studi ini terbukti mampu membedakan varietas-varietas pamelos sebagai konfirmasi genotip dan identifikasi tetua. Kultivar-kultivar jeruk umumnya berkerabat dekat sekali, jelas sekali mereka mempunyai perbedaan akibat mutasi yang menambah sifat hortikultura spesifik. Mutasi ini dapat dipelihara karena jeruk diperbanyak secara vegetatif melalui penyambungan batang atas pada batang bawah. Selain itu banyak kultivar jeruk menghasilkan bibit apomiksis melalui embrio nuselar. Bibit nuselar yang berbeda sifat hortikulturanya atau relatif tahan dengan rendahnya serangan patogen seringkali diseleksi dan dinamakan sebagai kultivar. Oleh karena itu bila menggunakan sifat-sifat atau karakter morfologi, akan sangat sulit membedakan kultivar-kultivar spesies jeruk. Identifikasi kultivar batang atas pada fase nurseri umumnya sulit karena beberapa kultivar hanya dapat dikenal melalui sifat-sifat buah dan pohon jeruk biasanya berbuah setelah berusia 3-4 tahun setelah tanam. Keragaman genetik pada jeruk berhubungan dengan banyaknya jumlah unit taksonomi (spesies dan hibrida), maupun kerapnya mutasi yang mengakibatkan keragaman mata tunas dan penyimpangan cabang (Coletta-Filho *et al.* 1998). Bagaimanapun penggunaan teknik penanda DNA lain, seperti *intersingle sequence repeats* (ISSR) dan *simple sequence repeats* (SSR) atau *amplification fragment length polymorphisms* (AFLP) perlu dipertimbangkan untuk lebih memfokuskan identifikasi genetik jeruk lokal Indonesia.

KESIMPULAN

Analisis RAPD dengan primer OPN14 dan OPN16 menegaskan bahwa varietas pamelos komersial Nambangan, Sri Nyonya, Magetan, Cikoneng, dan Pangkajene Merah berbeda secara genetik. Beberapa varietas pamelos yang berbeda nama ternyata sama secara genetik. Penyebaran bahan perbanyak vegetatif yang adaptif dan mutasi mungkin telah membentuk klon dan nama pamelos baru. Karakterisasi secara morfologi perlu dilakukan untuk meningkatkan akurasi dan mengkonfirmasi karakterisasi genotip.

PUSTAKA

1. Brown, E.J. 1991. Assesment of RAPD Markers to Detect Genetic Diversity in Rice Plants. *Crops Sci.* 31:670-675.
2. Cai, Q., C.L., Guy, and G.A. Moore. 1994. Extension of the Linkage Map in Citrus Using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers and RFLP Mapping of Cold-Acclimation Responsive Loci. *Theor. Appl. Gen.* 89:606-614.
3. Chaparro, J.X., D.J. Werner, D. O'Malley, and R.R. Sederoff. 1994. Targeted Mapping and Linkage Analysis of Morphological, Isozyme, and RAPD Markers in Peach. *Theor. Appl. Gen.* 87:805-815.
4. Cheng F.S. and M.L. Roose. 1995. Origin and In-heritance of Dwarfing by the Citrus Rootstock *Poncirus trifoliata* 'Flying Dragon'. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 120:286-291.
5. Coletta-Filho, H.D., M.A. Machado, M.L.P.N. Targon, M.C.P.Q.D.G. Moreira, and J. Pompeu Jr., 1998. Analysis of the Genetic Diversity Among Mandarins (*Citrus* spp.) Using RAPD Markers. *Euphytica* 102:133-139.
6. Corazza-Nunes, M.J., M.A. Machado, W.M.C. Nunes, M.Cristofani, and M.L.P.N. Targon. 2002. Assessment of Genetic Variability in Grapefruits (*Citrus paradisi* Macf.) and Pummelos (*C. maxima* (Burm.) Merr.) using RAPD and SSR markers. *Euphytica* 126: 169-176.
7. Deng Z.N., A. Gentile, E. Nicolosi, A. Vardi, and E. Tribulato. 1995. Identification of *In Vivo* and *In Vitro* Lemon Mutants by RAPD Markers. *J. Hort. Sci.* 70: 117-125.
8. Elisiaro, P.J., E. M. Justo, and J.M. Leitao. 1999. Identification of Mandarin Hybrids by Isozyme and RAPD Analysis. *Scientia Horticulturae* 81:287-29.
9. Federici, C.T., D.Q. Fang, R.W. Scora, and M.L. Roose. 1998. Phylogenetic Relationships Within the Genus Citrus (Rutaceae) and Related Genera as Revealed by RFLP and RAPD Analysis. *Theor. Appl. Gen.* 96:812-822.
10. Gmitter, F.G., S.Y. Xiao, S. Huang, X.L. Hu, S.M. Garnsey, and Z. Deng. 1996. A Localized Linkage Map of the Citrus Tristeza Virus Resistance Gene Region. *Theor. Appl. Gen.* 92:688-695.
11. Harada, T., Matsukawa, K., Sato, T., Ishikawa, R., Nizeki, M., and Saito, K., 1993. DNA-RAPDs Detect Genetic Variation and Paternity in Malus. *Euphytica* 65:87-91.
12. Herero, R., M.J. Asins, E.A. Carbonel, and L. Navarro. 1996. Genetic Diversity in the Orange Subfamily Aurantioideae. I. Intraspecies and Intra-genus Genetic Variability. *Theor. Appl. Gen.* 92:599-609.
13. Hittalmani, S., M.R. Foolad, T. Mew, R.L. Rodriguez, and N. Huang. 1995. Development of a PCR-Based Marker to Identify Rice Blast Resistance-Gene, *Pi-2(t)*, in a Segregating Population. *Theor. Appl. Gen.* 91:9-14.
14. Kijas, J.M.H., J.C.S. Fowler, and M.R. Thomas. 1995. An Evaluation of Sequence Tagged Microsatellite Site Markers for Genetic Analysis within Citrus and Related Species. *Genome.* 38:349-355.
15. Lu, Z.X., G.L. Reighard, W.V. Baird, A.G. Abbott, and S. Rajapakse. 1996. Identification of Peach Rootstock Cultivars by RAPD Markers. *HortSci.* 31:127-129.
16. Luro F., F. Laigret, J.M. Bove, and P. Ollitrault. 1992. Application of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) to Citrus Genetics and Taxonomy in *Proceeding International Society Citriculture.* pp.225-228.
17. _____, 1995. DNA Amplified Fingerprinting, a Useful Tool for Determination of Genetic Origin and Diversity Analysis in *Citrus.* *HortSci.* 30:1063-1067.
18. Machado, M.A., H.D. Coletta Filho, M.L.P.N. Targon, and J.Pompeu Jr. 1996. Genetic Relationship of Mediterranean Madarins *Citrus deliciosa* Tenore Using RAPD Markers. *Euphytica* 92:321-326.
19. Nair, S., A. Kumar, M.N. Srivastava, and M. Mohan, 1996. PCR-Based DNA Markers Linked to a Gall Midge Resistance Gene, Gm4t, has Potential for Markers-Aided Selection in Rice. *Theor.Appl. Gen.* 92:660-665.
20. Pooler, M.R. and R.Scorza. 1995. Aberrant Transmission of RAPD Markers in Haploids, Doubled Haploids, and F1 Hybrids of Peach: Observations and Speculation on Causes. *Scientia Horticulturae.* 64:233-241.
21. Rajapakse, S, L.E. Beltho, G. He, A.E. Estager, R. Scorza, I. Verde, R.E. Ballard, W.V. Baird, A. Callahan, R. Monet, and A.G. Abbott. 1995. Genetic Linkage Mapping in Peach Using Morphological, RFLP and RAPD Markers. *Theor. Appl. Gen.* 90:503-510.
22. Roose M L. 1988. Isozymes and DNA Restriction Fragment Length Polymorphisms in Citrus Breeding and Systematics in Goren R, Mendel K (eds). *Proceeding 6th International Citrus Congress.* Balaban Publishers, Rehovot, Israel, Vol 1. pp.155-165.
23. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and Teh. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning (A laboratory Manual)* Vol. 2. Spring Harbor Laboratory Press.
24. Santos, JB dos, J. Nienhuis, P. Skroch, J. Tivang, and M.K. Slocum. 1994. Comparison of RAPD and RFLP Genetic Markers in Determining Genetic Similarity Among *Brassica oleracea* L. Genotypes. *Theor. Appl. Gen.* 87:909-915.
25. Sugawara K and A. Oowada 1995. Identification of Citrus Chimeras by RAPD Analysis. *HortSci.* 30:1276-1278.
26. Virk, P.S., H.J. Newbury, M.T. Jackson, and B.V. Ford, B. Lloyd. 1995. The Identification of Duplicate Accessions within a Rice Germplasm Collection using RAPD Analysis. *Theor. Appl. Gen.* 90:1049-1055.
27. Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, and S.V. Tingey. 1990. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. *Nuc. Acids. Res.* 18:6531-6535.