

DETEKSI INTEGRITAS GENOMIK PISANG HASIL IRADIASI *IN VITRO* BERDASARKAN PENANDA MIKROSATELIT

Rita Megia^{*)} dan Nina Ratna Djuita

Departemen Biologi, FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Darmaga, Bogor 16680, Indonesia

^{*)}E-mail: ritamegia@cbn.net.id

Abstrak

Penelitian ini bertujuan mendeteksi integritas genomik pisang hasil iradiasi *in vitro* berdasarkan penanda mikrosatelit. Kajian integritas genomik ini dilakukan pada pisang Mas yang telah diiradiasi dengan sinar gamma 15 Gy. DNA inti diisolasi dari setiap aksesi mengikuti metode Dixie, diamplifikasi dengan Perkin Elmer Gene Ampli PCR 2400 menggunakan sepuluh primer, kemudian dielektroforesis pada gel agarose 1%. Terakhir dilakukan elektroforesis pada gel poliakrilamid secara vertikal, dan pewarnaan silver untuk visualisasi alel yang muncul. Hasilnya menunjukkan bahwa diantara sepuluh primer yang dipakai, delapan diantaranya menghasilkan pita-pita yang jelas, konstan, dan dapat diulang. Jumlah pita bervariasi, dari satu sampai dua, mengikuti tingkatan ploidi pisang Mas berupa diploid AA. Jumlah satu pita menunjukkan alel homozigot, sedangkan jika jumlah pitanya dua, menunjukkan alel heterozigot. Diantara delapan primer yang menunjukkan hasil yang jelas tersebut, enam diantaranya menghasilkan pita-pita yang berbeda diantara tanaman hasil iradiasi, kultur *in vitro*, dan kontrol, sedangkan pada dua primer lainnya menunjukkan alel yang sama untuk semua aksesi yang diuji. Perubahan genomik terlihat pada semua tanaman hasil iradiasi yang nampak mempunyai pita yang berbeda jumlah dan ukurannya dibandingkan dengan tanaman kontrol. Perubahan dapat terjadi pada zigositas alel tertentu, misalnya dari heterozigot ke homozigot atau sebaliknya. Perubahan alel menunjukkan adanya ketidakstabilan genomik yang dapat timbul akibat berbagai peristiwa seperti delesi, insersi, dan amplifikasi nukleotida.

Abstract

Genomic Integrity Detection of *In Vitro* Irradiated Banana Using Microsatellite Marker. The research aims to detect genomic integrity of *in vitro* irradiated banana using microsatellite marker. These studies were done on banana cv. Pisang Mas irradiated by 15 Gy of gamma ray. The DNA was isolated from each accession following Dixie. Amplification of DNA products were done by Perkin Elmer Gene Amp PCR 2400 using ten primers, and then electroforesis in agarose 1%. Finally a vertical polyacrylamide gel electroforesis was run and the products were visualized by silver staining. The result shown that among the primers tested, eight primers produced clear, discrete, and reproducible bands. Number of DNA band exhibited ranging from one to two, following the ploidy level of pisang Mas which is a diploid banana cultivar (AA). One band suggest homozygote allele while two bands showed heterozygote allele. Out of eight primers, six primers produced different allele among irradiated, *in vitro*, and *in vivo* control plant. Meanwhile, for the other two primers the allele were monomorph for all the accessions examined. Genomic modification was observed at all irradiated plants. The modification can happened at zygosity of certain allele that may change from heterozygote to homozygote or *vice versa*. While modification in allele size that underlying genomic instability could be caused by several genetic events such as deletion, insertion, and amplification of nucleotides.

Keywords: banana, genomic integrity, irradiation, microsatellite, primer

1. Pendahuluan

Mutasi memegang peranan yang sangat penting dalam pemuliaan tanaman pisang. Hal ini disebabkan karena pada umumnya pisang budidaya bersifat partenokarpi, tidak berbiji serta mempunyai sterilitas bunga yang

tinggi. Oleh sebab itu, pemuliaan secara konvensional melalui persilangan seksual sangat sulit dilakukan. Tidak mengherankan jika ahli pemulia pisang seperti De Langhe sangat menganjurkan pemakaian iradiasi sebagai alternatif dalam perbaikan genetika tanaman ini.

Induksi mutasi telah menghasilkan mutan-mutan pisang dengan sifat-sifat yang menarik [1]. Meskipun demikian, informasi mendasar yang melandasi perubahan sifat tersebut belum banyak diketahui. Identifikasi genetika mutan pisang umumnya dikerjakan melalui pendekatan sitogenetika, *fluorescence in situ hybridisation* (FISH) atau *flow cytometri* [2]. Pendekatan yang lebih komprehensif melalui pemakaian penanda molekular diharapkan mengungkap lebih mendalam perubahan genom yang terjadi.

Di antara berbagai penanda genetik, mikrosatelit yang berdasarkan *polymerase chain reaction* (PCR) merupakan teknik yang terbukti paling bermanfaat pada analisis genom dengan berbagai problem pada tanaman pisang [3]. Selain itu, mikrosatelit juga mempunyai polimorfisme yang tinggi dan dapat diandalkan [4].

Penggunaan penanda mikrosatelit telah banyak dilakukan oleh beberapa peneliti, misalnya Creste *et al.* [5] yang meneliti tentang karakterisasi genetik kultivar pisang dari Brazil. Oriero *et al.* [6] dapat mendeteksi 100% polimorfisme dari 23 aksesori pisang dan 66,7% polimorfisme dari 17 aksesori plantain di Nigeria. Kaemmer *et al.* [7] berhasil mendeteksi polimorfisme dalam 15 jenis dan kultivar genus *Musa*. Analisis mikrosatelit juga dapat digunakan untuk menyeleksi klon-klon pisang yang memiliki ketahanan terhadap penyakit sigatoka hitam [8], sedangkan oligonukleotida DNA dan amplifikasi sidik jari DNA dapat membedakan klon Lakatan dan Latundan (keduanya asli dari Philipina) yang diiradiasi dan tidak diiradiasi [9].

Di Indonesia, teknik mikrosatelit telah berhasil mendeteksi rata-rata 9,3 alel per lokus pada pisang diploid AA dan triploid AAA [10] mengungkap keanekaragaman dan hubungan kekerabatan berbagai aksesori pisang Indonesia mempergunakan tiga primer khusus [11] serta dapat dipakai untuk klasifikasi dan analisis filogeni kultivar pisang [12].

Penelitian ini bertujuan mendeteksi stabilitas genomik pisang hasil iradiasi dan kultur *in vitro* dengan penanda mikrosatelit. Hasilnya diharapkan dapat memberikan gambaran bagian lokus tertentu yang rentan terhadap iradiasi atau perlakuan kultur jaringan dan melengkapi informasi genetika tanaman pisang hasil iradiasi yang melandasi perubahan sifat mutan.

2. Metode Penelitian

Penelitian meliputi empat tahap utama, yaitu isolasi dan purifikasi DNA inti dari pisang Mas (AA) yang telah diiradiasi dan tidak diiradiasi, amplifikasi mikrosatelit dengan mesin PCR, deteksi kualitas hasil PCR melalui elektroforesis agarose 1% dan deteksi alel dengan poliakrilamid 6%, dan analisis stabilitas genomik pisang yang diiradiasi dan tidak diiradiasi berdasarkan pita yang muncul.

Bahan tanaman yang digunakan adalah pisang Mas (AA) yang terdiri atas aksesori 1–8, berupa tanaman hasil iradiasi dengan sinar gamma 15 Gy, nomor 1-6 masih di polibag, sedangkan nomor 7 dan 8 telah dipindah ke lapang; Va = aksesori hasil kultur *in vitro*, yang telah

Tabel 1. Primer Mikrosatelit Pisang Yang Digunakan

Lokus/ Primer	Primer (5'3')	Ukuran relatif alel (pb)	Tm (°C)	Jumlah siklus
MaCIR108	F: TAAAGGTGGGGTAGCATTAGG R: TTTGATGTCACAATGGTGTTC	220-295	55	35
MaCIR332a	F: TCCCAACCCCTGCAACCACT R: ATGACCTGTGCAACATCCTTT	255-295	53	35
MaCIR327a	F: TCCCATAAAGTGTAAATCCTCAGTT R: CTCCATCCCCCAAGTCATAAAG	330-378	53	35
MaCIR327b	F: AAGTTAGTCAAGATAGTGGCATT R: CTTTTGCACCAAGTTGTTAGGG	388-436	50	40
Ma-1-132	F: GGAAAACGCGAATGTGTG R: AGCCATATACCGAGCACTTG	200-300	55	35
Ma-1-17	F: AGGCGGGGAATCGGTAGA R: GGCGGGGAGACAGATGGAGT	110-154	55	35
Ma-1-27	F: TGAATCCCAAGTTTGGTCAAG R: CAAAACACTGTCCCCATCTC	122-142	55	35
Ma-3-90	F: GCACGAAGAGGCATCAC R: GGCCAAATTTGATGGACT	132-178	55	35
Ma-3-104	F: AGAACGTTTGCTGTGTGGAG R: GCTTCTGTCATCGTTTTGTC	100-200	55	35
Ma-3-139	F: ACTGCTGCTCTCCACCTCAAC R: GTCCCCCAAGAACCATATGATT	30-180	55	35

F = forward primer sequence R = reverse primer sequence

dikonservasi selama 3 tahun; Vb = aksesori hasil kultur *in vitro* yang baru dikultur selama 3 bulan dan K = tanaman kontrol yang berasal dari lapang (*in vivo*). Primer mikrosatelit dan panjang basa sekuens pengapitnya dapat dilihat pada Tabel 1. Tag polymerase yang digunakan berasal dari Roche untuk semua primer yang diuji, kecuali primer MaCIR327b dari Fermentas.

DNA diisolasi dari daun pisang yang masih menggulung mengikuti modifikasi metode Dixit [13] sedangkan PCR mengikuti prosedur Kaemmer *et al.* [7] menggunakan mesin Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400. Kondisi PCR diprogram dengan denaturasi awal pada suhu 95 °C selama 4 menit, denaturasi pada suhu 95 °C selama 30 detik, *annealing* selama 30 detik (suhu bergantung pada primer), *extention* pada suhu 72 °C selama 45 detik diakhiri dengan *final extention* 7 menit. Amplifikasi dilakukan untuk 35 siklus kecuali primer MaCIR327b sebanyak 40 siklus. Elektroforesis vertikal hasil PCR dikerjakan pada gel poliakrilamide 6%. Hasilnya kemudian diwarnai dengan *silver staining* mengikuti metode Creste *et al.* [14].

Pita yang muncul pada gel poliakrilamid pada setiap lokus diasumsikan sebagai alel mikrosatelit. Marka DNA merupakan data alel yang teramati dengan ketentuan ada tidaknya pita DNA berdasarkan ukuran produk PCR pada satu posisi yang sama dari beberapa aksesori yang dibandingkan untuk mendapatkan pola pita yang dapat menunjukkan perbedaan yang khas antara tanaman pisang Mas yang diiradiasi dan tanaman kontrol.

3. Hasil dan Pembahasan

Profil pita mikrosatelit. Hasil elektroforesis pada gel poliakrilamid menunjukkan adanya jumlah pita yang bervariasi antara satu atau dua pita (Gambar 1). Hal ini sesuai dengan ploidi tanaman pisang Mas yang bersifat

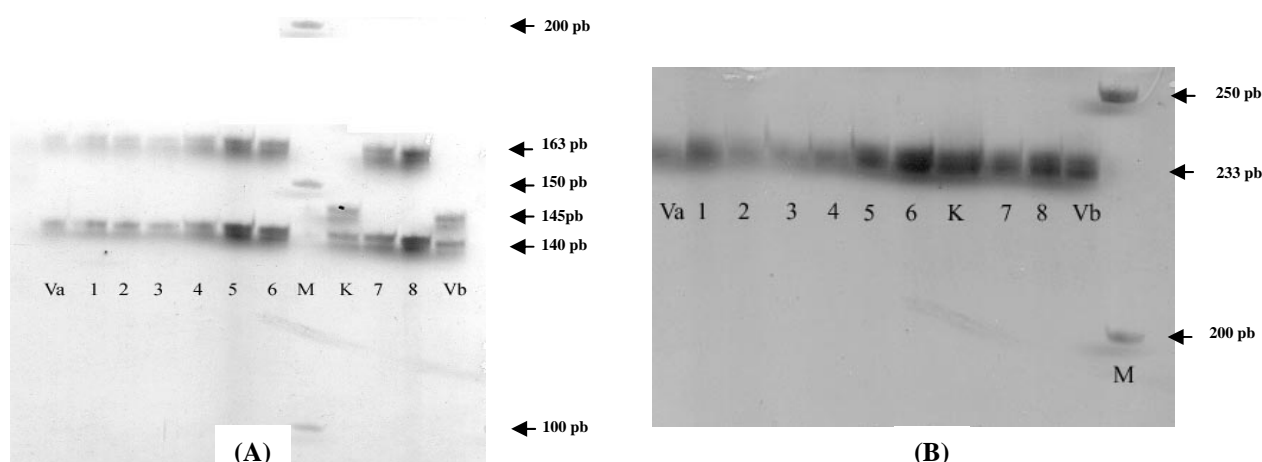
diploid. Jika masing-masing pita dianggap sebagai alel untuk lokus/primer tersebut, maka masing-masing aksesori tanaman yang diperiksa ada yang bersifat homozigot (dengan satu pita) atau heterozigot (mempunyai dua pita) untuk lokus yang diuji.

Dari sepuluh primer spesifik *Musa* yang diuji, delapan diantaranya memberikan hasil berupa pita-pita yang jelas, konstan dan dapat diukur. Dari kedelapan gel poliakrilamid yang menunjukkan hasil yang jelas tersebut, dua diantaranya memberikan gambaran pita yang monomorph (Gambar 2). Pada primer Ma-1-132 semua aksesori tanaman yang diuji memberikan masing-masing satu alel berukuran relatif 233 pb, sedangkan untuk lokus Ma3-104 nampak dua alel pada semua tanaman yang diuji berukuran sekitar 156 pb dan 163 pb.

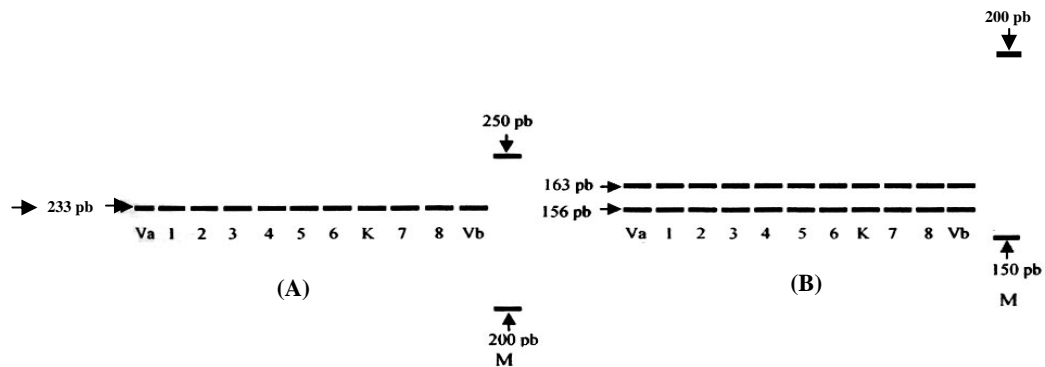
Pada enam elektroforesis akrilamid lainnya (lokus MaCIR108, MaCIR327a, MaCIR332a, Ma-1-27, Ma-3-139 dan Ma-1-17) tampak memberikan hasil berupa pita-pita yang berbeda (Gambar 3) di antara tanaman hasil iradiasi (aksesori 1–8), tanaman kultur *in vitro* lama dan baru (berturut-turut Va dan Vb) dan tanaman kontrol (K).

Perbedaan ukuran pita menunjukkan adanya perubahan genomik. Hal ini terlihat pada semua tanaman hasil iradiasi (aksesori 1–8) dan tanaman hasil kultur *in vitro* yang lama yang berbeda dibandingkan dengan tanaman kontrol dan hasil kultur *in vitro* baru. Perubahan dapat terjadi dari alel yang bersifat homozigot (satu pita) menjadi heterozigot (dua pita) atau sebaliknya dari heterozigot menjadi homozigot untuk lokus tertentu.

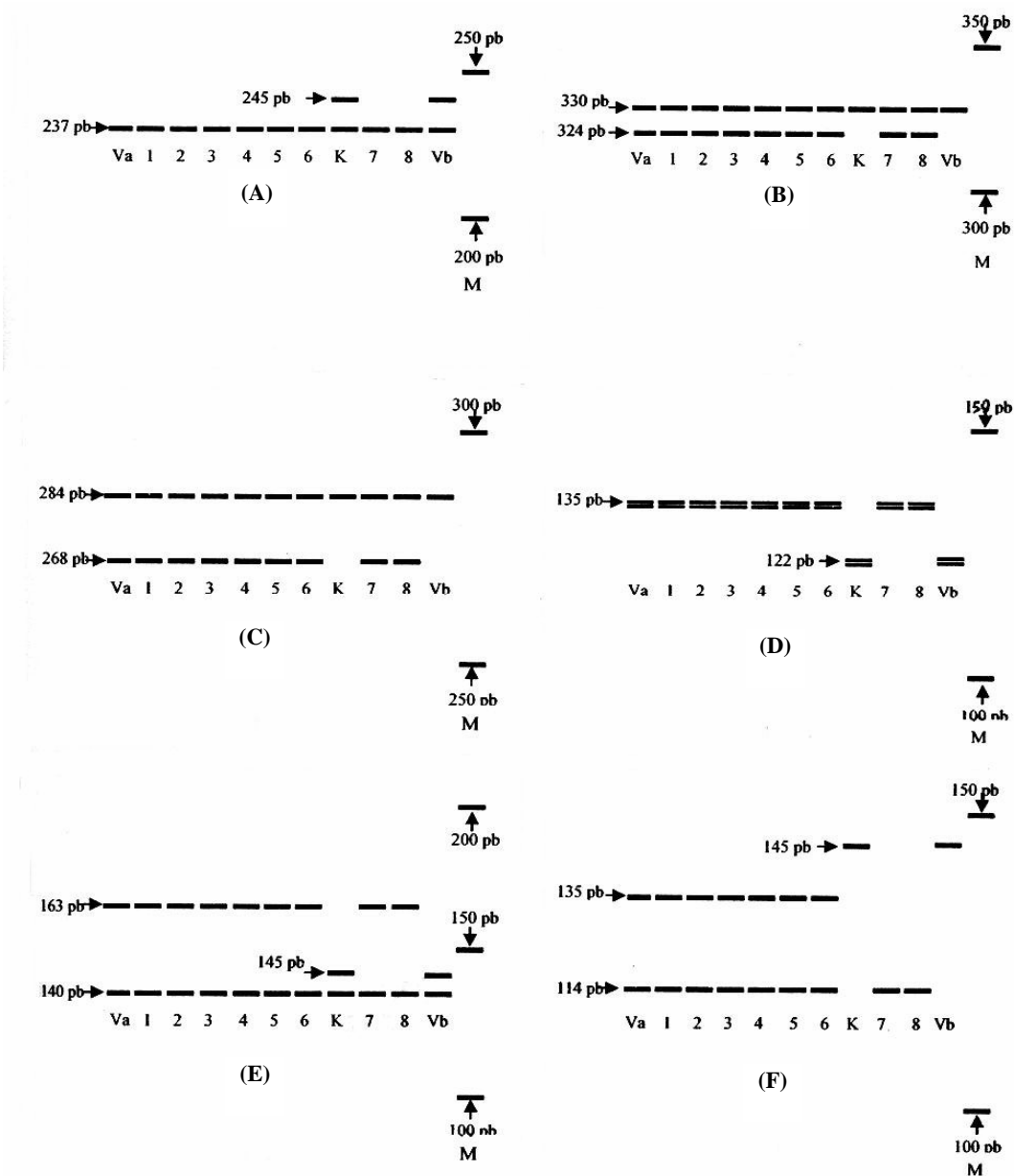
Tanaman Vb mempunyai alel-alel yang selalu identik dengan K. Tidak terdeteksinya perbedaan ukuran pita pada Vb dibandingkan dengan K mungkin disebabkan karena memang tidak ada perubahan genomik mengingat



Gambar 1. Hasil Elektroforesis DNA Pisang dengan Menggunakan Primer (A) Ma-3-139 (B) Ma-1-132 Va = Aksesori Kultur *In vitro* yang telah Dikonservasi Selama Tiga Tahun, 1-6 = Aksesori Hasil Iradiasi Sinar Gamma 15 Gy Masih dalam Polybag, K = Aksesori Kontrol, 7-8 = Aksesori Hasil Iradiasi Sinar Gamma 15 Gy di Lapang, Vb = Aksesori Kultur *In vitro* yang Baru Dikonservasi Selama 3 Bulan, M = Marker



Gambar 2. Sketsa Hasil Elektroforesis DNA Pisang pada Gel Poliakrilamid dari Primer (A) Ma-1-132, (B) Ma-3-104



Gambar 3. Sketsa Hasil Elektroforesis DNA Pisang pada Gel Poliakrilamid dari Primer (A) MaCIR 108, (B) MaCIR327a, (C) MaCIR 332a, (D) Ma-1-27, (E) Ma-3-139, (F) Ma-1-17

tanaman tersebut belum terlalu lama dikultur, atau perubahan DNA yang terjadi tidak merubah panjang alel. Sebaliknya profil pita Va selalu sama dengan alel-alel pada tanaman hasil iradiasi. Hal ini mungkin disebabkan karena tanaman tersebut telah terekspos untuk waktu yang sangat lama terhadap kondisi *in vitro* yang mengandung zat pengatur tumbuh sehingga terjadi perubahan genetik.

Kedua aksesi tersebut (Va dan Vb) menunjukkan bahwa mikrosatelit merupakan penanda yang baik untuk mengetahui adanya variasi somaklonal pada pisang Mas. Hingga saat ini belum ada informasi sejauh mana perubahan genetik akibat kultur jaringan dapat terdeteksi pada tingkat molekular pada spesies ini. Leroy *et al.* [15] berhasil mendeteksi perubahan pada stadium yang sangat dini dari kultur *in vitro* *Brassica oleracea* var. *botrytis* menggunakan modifikasi dari *simple sequence repeat* (SSR) atau *inter-simple sequence repeat* (ISSR).

Ukuran alel yang teramati pada Va selalu identik dengan tanaman hasil iradiasi yang semuanya ini berbeda dibandingkan dengan panjang pita K. Hal ini mengindikasikan terjadinya perubahan genomik pada tanaman hasil iradiasi dan Va, tetapi tidak diketahui apakah perubahan genom tersebut terjadi pada area yang sama. Karp [16] berpendapat bahwa mutasi yang terjadi akibat iradiasi mempunyai daerah yang berbeda dengan yang ditemukan pada variasi somaklonal.

Identifikasi stabilitas genomik Pisang Mas hasil iradiasi. Adapun perbedaan karakteristik genomik tanaman hasil iradiasi dibandingkan dengan tanaman K sebagaimana yang terlihat pada gel akrilamid (Gambar 3) adalah sebagai berikut:

Gambar 3(A), pada lokus MaCIR108, tanaman K bersifat heterozigot dengan dua alel berukuran relatif masing-masing 237 pb dan 245 pb. Sebaliknya pada semua tanaman iradiasi, hanya nampak satu pita berukuran 237 pb. Besar kemungkinan terjadi delesi pada daerah yang memiliki panjang alel 245 pb pada mutan-mutan ini sehingga ukuran alel yang pertama menjadi sama dengan ukuran alel yang kedua. Dengan demikian tanaman yang pada mulanya bersifat heterozigot menjadi homozigot untuk lokus tersebut.

Gambar 3(B), hal yang sebaliknya terjadi pada primer MaCIR 327a. Pada tanaman K terlihat hanya satu pita berukuran relatif 330 pb, sedangkan semua tanaman iradiasi memiliki dua alel yang panjangnya masing-masing 330 pb dan 324 pb. Pita yang berukuran lebih pendek ini diduga merupakan akibat delesi nukleotida dari salah satu pita yang lebih panjang sehingga menghasilkan suatu alel baru yang lebih pendek. Dengan demikian tanaman induk yang tadinya bersifat homozigot untuk lokus MaCIR 327a berubah menjadi heterozigot akibat iradiasi.

Gambar 3(C), hal yang teramati pada hasil elektroforesis menggunakan primer MaCIR 327a terlihat juga pada lokus MaCIR332a. Pada pita akrilamid nampak hanya satu pita dengan panjang relatif 284 pb untuk tanaman K. Perubahan yang terjadi akibat iradiasi, menyebabkan terbentuknya alel baru berukuran 268 pb. Terlihat adanya dua alel dengan ukuran 284 pb dan 268 pb pada aksesi tanaman 1-8.

Gambar 3(D), perubahan genomik yang terdeteksi berupa ukuran alel yang bertambah panjang. Ini dijumpai pada pemakaian primer Ma-1-27. Tanaman K yang merupakan asal/induk tanaman lain bersifat homozigot dan mempunyai alel berukuran relatif 122 pb. Sedang tanaman hasil iradiasi juga memiliki satu alel dengan panjang 135 pb. Pemanjangan ukuran alel ini dapat terjadi disebabkan adanya insersi nukleotida pada daerah tersebut. Perubahan zigosisitas tidak terjadi pada lokus ini karena jumlah alel tetap satu.

Gambar 3(E), pada hasil dengan penggunaan primer Ma-3-139 terjadi perubahan ukuran dari salah satu alel sehingga menjadi lebih panjang pada tanaman iradiasi dibandingkan K. Ukuran relatif pita pada K masing-masing 140 pb dan 145 pb, sedangkan pada tanaman iradiasi 140 pb dan 163 pb. Dengan demikian, tanaman tetap bersifat heterozigot tetapi secara genetik terjadi perubahan dari salah satu alel atau bahkan kedua alel.

Gambar 3(F), perubahan genomik yang terjadi dapat dilihat dari munculnya dua alel baru pada tanaman hasil iradiasi yang ukurannya sama sekali berbeda dengan pita tanaman K. Hal ini terlihat pada penggunaan primer Ma-1-17. Tanaman K memiliki satu pita berukuran relatif 145 pb, sedangkan pada tanaman hasil iradiasi terlihat adanya dua alel yang memiliki ukuran yang lebih pendek dibandingkan dengan K, yakni masing-masing 135 pb dan 114 pb. Dengan demikian, delesi yang terjadi melibatkan jumlah nukleotida yang berbeda pada alel yang tidak sama. Tanaman yang sebelumnya bersifat homozigot menjadi heterozigot untuk lokus tersebut.

Secara umum dapat dikatakan bahwa untuk lokus tertentu (Ma-1-132 dan Ma-3-104) tidak terlihat adanya perbedaan antara tanaman hasil iradiasi dengan tanaman kontrol. Sebaliknya, perbedaan terlihat pada lokus lain, yaitu MaCIR108, MaCIR327a, MaCIR332a, Ma-1-27, Ma-3-139, dan Ma-1-17. Hal ini menunjukkan adanya perbedaan bagian genom tertentu yang rentan terhadap perlakuan iradiasi. Daerah yang diapit oleh keenam primer terakhir merupakan area yang kurang stabil dibandingkan dengan dua daerah yang diapit dua primer pertama.

Dari delapan lokus yang diuji, Ma-1-17 menyebabkan perubahan genomik terbesar. Perubahan yang terjadi tidak hanya melibatkan kedua ukuran alel tetapi juga merubah zigosisitas dari homozigot menjadi heterozigot.

Tampaknya daerah yang diapit oleh primer ini merupakan daerah yang paling tidak stabil sehingga menyebabkan timbulnya banyak perubahan.

Hasil elektroforesis pita-pita yang polimorf pada tanaman hasil iradiasi dibandingkan dengan kontrol menunjukkan bahwa metode mikrosatelit juga dapat dipakai untuk identifikasi tanaman hasil iradiasi pisang Mas seperti terlihat pada pemakaian lokus MaCIR108, MaCIR327a, MaCIR332a, Ma-1-27, Ma-3-139, dan Ma-1-17. Hautea [9] dapat membedakan dua klon Philipina (Lakatan dan Latundan) yang diiradiasi dari yang tidak diiradiasi.

Perbedaan alel hasil iradiasi dibandingkan dengan alel tanaman kontrol terletak pada ukuran pita. Dalam hal ini, perubahan ukuran dapat disebabkan oleh delesi atau insersi nukleotida. Perbedaan ukuran tersebut yang mungkin terjadi di daerah *flanking region* atau *repetitive sequence* dapat diketahui dengan sekuensing. Delesi yang terjadi pada satu alel terlihat pada lokus MaCIR108, MaCIR332a dan MaCIR327a, sedangkan yang melibatkan dua alel ditemukan pada lokus Ma-1-17. Sebaliknya, insersi nukleotida ditemukan pada pemakaian primer Ma-1-27 dan Ma-3-139.

4. Simpulan

Hasil analisis gel poliakrilamid pisang Mas menggunakan teknik mikrosatelit menunjukkan bahwa dibandingkan dengan tanaman kontrol, tanaman hasil iradiasi 15 Gy mengalami perubahan genomik berupa perubahan untuk alel tertentu dari yang bersifat homozigot menjadi heterozigot, atau sebaliknya. Perubahan ini selalu berupa ukuran alel yang lebih pendek pada tanaman iradiasi dibandingkan dengan tanaman kontrol, yang mungkin diakibatkan oleh delesi yang dapat terjadi pada satu atau kedua alel lokus tertentu. Perubahan dari homozigot ke heterozigot yang melibatkan satu alel ditemukan pada lokus MaCIR332a dan MaCIR327a, sedangkan pada lokus Ma-1-17, pemendekan ukuran ini terlihat pada kedua alel. Perubahan dari heterozigot ke homozigot ditemukan pada penggunaan primer MaCIR108. Sebaliknya perubahan yang tidak merubah zigositas selalu berupa panjang alel yang lebih besar pada tanaman iradiasi dibanding pada tanaman kontrol, yang mungkin disebabkan oleh adanya insersi nukleotida. Hal ini terlihat pada penggunaan primer Ma-1-27 (tanaman iradiasi dan K tetap bersifat homozigot untuk alel tersebut) dan primer Ma-3-139 (tanaman iradiasi dan K tetap bersifat heterozigot untuk alel tersebut).

Ucapan Terima Kasih

Data dalam naskah ini merupakan hasil penelitian fundamental yang dibiayai oleh Direktorat Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan Nasional dengan surat

perjanjian No.: 012/SP2H/PP/DP2M/III/2007. Ucapan terima kasih disampaikan kepada Dr. Amin Retnoningsih atas bantuan teknisnya.

Daftar Acuan

- [1] N.S. Roux, In: S.M. Jain, R. Swennen (Eds.), *Mutations Induction in Musa – Review*, Banana Improvement: Cellular, Molecular Biology, and Induced Mutations, Science Publishers Inc., Enfield, 2004, p.23.
- [2] J. Dolezel, M. Valarik, J. Vrana, M.A. Lysak, E. Hribova, J. Bartos, N. Gasmanova, M. Dolezelova, J. Safar, H. Simkova, In: S.M. Jain, R. Swennen (Eds.), *Molecular Cytogenetic and Cytometri of Banana (Musa spp.)*, Banana Improvement: Cellular, Molecular Biology, and Induced Mutations, Science Publishers Inc., Enfield, 2004, p.229.
- [3] G. Kahl, In: S.M. Jain, R. Swennen (Eds.), *The Banana Genome in Focus: A Technical Perspective*, Banana Improvement: Cellular, Molecular Biology, and Induced Mutations, Science Publishers Inc., Enfield, 2004, p.263.
- [4] C. Wong, R. Kiew, J.P. Loh, L.H. Gan, O. Set, S.K. Lee, S. Lum, Y.Y. Gan, *Ann. Bot.* 88 (2001) 1017.
- [5] S. Creste, A.T. Neto, S.O. Silva, A. Figueira, *Euphytica*, 132 (2003) 259.
- [6] C.E. Oriero, O.A. Odunola, Y. Lokko, I. Ingelbrecht, *Afr. J. Biotechnol.* 5/2 (2006) 126.
- [7] D. Kaemmer, R. Afza, K. Weising, G. Kahl, F.J. Novak, *Euphytica* 96 (1997) 49.
- [8] G. Palacios, *Analysis of Genotype of Banana Clones, Resistant ('FHIA-01', 'FHIA-02', 'FHIA-03' and 'Cien Bta-03') and Susceptible ('Williams') to Black Sigatoka, Using Microsatellites Markers*, Abstract 3rd International Symposium on Molecular and Cellular Biology of Bananas, Leuven, Belgium, 2002.
- [9] D.M. Hautea, G.C. Molina, C.H. Balatero, N.B. Coronado, E.B. Perez, M.T.H. Alvarez, A.O. Canama, R.H. Akuba, R.B. Quillooy, R.B. Frankie, C. S. Caspillo, In: S.M. Jain, R. Swennen (Eds.), *Analysis of Induced Mutant of Philippine Bananas with Molecular Markers*, Banana Improvement: Cellular, Molecular Biology, and Induced Mutations, Science Publishers Inc., Enfield, 2004, p.45.
- [10] E.S. Rahayu, A. Retnoningsih, *Keanekaragaman Genetika Aksesori Pisang Diploid AA dan Triploid AAA Berdasarkan Penanda Mikrosatelit*, Laporan Penelitian, Universitas Negeri Semarang, Semarang, 2005.
- [11] A. Retnoningsih, R. Megia, M.A. Rifai, A. Hartana, *Keanekaragaman Genetika Pisang Berdasarkan SSR ('Simple Sequence Repeat')*, Seminar Nasional PTTI, Bogor, Indonesia, 2005.

- [12] A. Retnoningsih, Disertasi, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor, 2009.
- [13] A. Dixit, Plant Mol. Bio. Rep. 16 (1998) 1.
- [14] S. Creste, N.A Tullman, A. Figueria, Plant Mol. Bio. Rep. 19 (2001) 299.
- [15] X.J. Leroy, K. Leon, M. Branchard, EJB Electron. J. Biotechnol. 3/2 (2000) 1.
- [16] A. Karp, Euphytica 85 (1995) 295.