

INDUKSI POLIPLOIDI DENGAN KOLKISIN PADA HIBRID F_1 HASIL PERSILANGAN ANTAR SPESIES PADA TANAMAN PANILI ASAL CIAMIS

[Induction of Polyploidy by Using Colchicine in Interspecific Hybrids on Vanilla Plant of Ciamis]

Fitri Damayanti¹✉ dan Ika Mariska²

¹Fakultas MIPA Universitas Mulawarman Jl. Barong Tongkok 4, Kampus Gunung Kelua, Samarinda

²Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan Jl. Tentara Pelajar No. 4, Bogor 16111

ABSTRACT

Stem root disease caused by *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *Vanillae* (Tucker) Gordon represent one of internal issues of vanilla development (*Vanilla planifolia* Andrews). To obtain resistance clone to the disease, it can exploit resource of wild vanilla (*V. albida* B. L. Syn) through crosses. Hybrids which were interspecific crossed generally were sterile. To overcome sterility problem of the hybrids, chromosome doubling was made by colchicine application. Explants used globular structure of proembryo from F_1 seed result from a cross between wild vanilla of Ciamis as female parent and cultivated vanilla clone of Ciamis as male parent. Concentration level colchicine used were 0.00%, 0.05%, 0.10%, 0.20% and 0.25% with period of treatment of 3 and 6 days. After colchicine treatment embryo cultures were subcultured into new medium that was basal media of Murashige-Skoog enriched with 2.5 mg/l BAP. Result of the experiment showed that colchicine treatment, globular structure were F_1 embryo tending to inhibit early regeneration. The cultures showed variabilities from treatment of colchicin 0.20% during of 6 day and 0.25% for 3 days. Phenotypic performance of the chromosome doubled hybrids showing great variation in color and vigor of the culture. Tetraploid plant ($2n=4x=64$) was obtained from the colchicine treatment of 0.25% for 6 days. Chromosome addition was followed by improvement of cell dimensions and organ magnification.

Key words: polyploidy, *Vanilla planifolia* (Andrews), *Vanilla albida* (B. L. Syn), colchicine.

PENDAHULUAN

Permasalahan utama yang dihadapi dalam usaha tani panili adalah serangan penyakit busuk batang yang disebabkan oleh jamur *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *Vanillae* (Tucker) Gordon (Tombe *et al.*, 1995). Penyakit ini merupakan penyakit penting pada tanaman panili karena serangannya cukup tinggi berkisar antara 20-80%. Penyakit ini mematikan banyak tanaman yang sudah produktif dan merupakan salah satu faktor menurunnya angka ekspor panili. Kerugian yang ditimbulkan oleh penyakit tersebut dapat mencapai Rp 32 milyar per tahunnya (Tombe *et al.*, 1995).

Salah satu usaha untuk mengatasi permasalahan tersebut antara lain penggunaan varietas yang tahan terhadap penyakit dan mempunyai sifat produktivitas dan mutu yang tinggi. Sampai saat ini belum ada varietas budidaya yang tahan penyakit yang disebabkan *F. oxysporum* karena masih sempitnya keragaman genetik yang ada sehingga sulit untuk mendapatkan sifat-sifat baik yang diperlukan (Mariska *et al.*, 1996). Sifat ketahanan terhadap

penyakit tersebut dapat diperoleh dengan memanfaatkan sumber daya kerabat liar yaitu *Vanilla albida* B. L. Syn. Hasil penelitian Nuryani *et al.* (1996) memperlihatkan bahwa panili liar lebih tahan terhadap penyakit *F. oxysporum* dibandingkan panili budidaya.

Beberapa sifat baik dari kerabat liar yang dapat dimanfaatkan antara lain daya adaptasinya yang luas, toleransinya terhadap cekaman lingkungan dan ketahanannya terhadap hama dan penyakit. Untuk memindahkan sifat baik tersebut dapat dilakukan dengan cara persilangan secara konvensional antara panili liar dengan panili budidaya. Menurut King (1965) dan Williams *et al.* (1982) persilangan antar spesies dapat meningkatkan keragaman dan memindahkan sifat genetik yang menarik seperti ketahanan terhadap penyakit dari satu spesies ke spesies lainnya. Melalui persilangan antar spesies tanaman liar dan budidaya telah berhasil didapatkan tanaman yang tahan terhadap penyakit seperti pada tanaman tembakau, tomat, kentang, dan gandum. Dengan demikian persilangan antar spesies diharapkan dapat memperkaya keragaman genetik tanaman panili.

Persilangan antara dua spesies yang hubungan kekerabatannya jauh sering dijumpai masalah sterilitas karena genom yang tidak homolog sehingga gametnya steril. Bila kromosom dari hibrid tersebut digandakan dapat membentuk gamet yang fertil. Williams *et al.* (1982), menyatakan bahwa gamet yang fertil dapat diperoleh melalui penggandaan kromosom dari hibrid dengan menggunakan senyawa kimia dari golongan alkaloid yaitu kolkisin. Sesuai dengan pendapat King (1965), Linsey dan Jones (1989), spesies hibrid yang steril dapat diubah menjadi “*double diploid*” dengan menggunakan kolkisin yang merupakan suatu senyawa kimia yang dapat menggandakan kromosom. Mutagen tersebut dapat menghambat terbentuknya benang-benang gelendong sehingga kromosom tidak tertarik ke kutubnya masing-masing. Setelah terbentuk sel yang jumlah kromosomnya sudah mengganda maka sel-sel tersebut akan melakukan pembelahan mitosis seperti biasa. Poliploidi dapat terjadi dengan cara pemberian zat tersebut dengan konsentrasi tertentu yang diaplikasikan dalam waktu tertentu pada sel-sel yang aktif membelah. Eigisti dan Dustin (1957) mengemukakan bahwa pada tunas, pembelahan yang paling efektif untuk diberi perlakuan kolkisin konsentrasi rendah adalah pada tahap akhir profase. Benang gelendong biasanya muncul tidak lama setelah lenyapnya dinding inti, tetapi dengan pemberian kolkisin, benang gelendong tidak terbentuk. Bila pembelahan sel telah mencapai anafase, kolkisin konsentrasi tinggi dapat menghentikan gerakan kromosom serta memusnahkan benang gelendong.

Untuk mengubah komposisi kromosom, tiap spesies mempunyai tanggapan yang berbeda terhadap konsentrasi dan lamanya perlakuan kolkisin yang diberikan Eigisti dan Dustin (1957). Dengan demikian perlu dilakukan penelitian untuk memperoleh konsentrasi dan lamanya perlakuan kolkisin yang tepat sehingga didapatkan tingkat keberhasilan poliploidi yang tinggi.

BAHATAN METODE

Eksplan yang digunakan adalah proembrio yaitu struktur globular yang berasal dari perkecambahan biji F_1 hasil persilangan antara panili liar (*V. albida*) asal Ciamis ($2n=32$) sebagai tetua betina dengan panili budidaya (*V. planifolia*) klon lokal Ciamis ($2n=32$)

sebagai tetua jantan. Mutagen yang digunakan untuk penggandaan kromosom adalah kolkisin pada beberapa taraf konsentrasi yaitu 0.00%, 0.05%, 0.10%, 0.20%, dan 0.25% dengan lamanya perlakuan kolkisin yaitu 3 dan 6 hari. Metode yang digunakan adalah dengan mencampurkan langsung larutan kolkisin pada media kultur *in vitro* yaitu media dasar Murashige dan Skoog (1962). Penelitian disusun berdasarkan rancangan acak lengkap dengan menggunakan empat eksplan tiap perlakuan dan dilakukan lima ulangan.

Setelah perlakuan kolkisin (3 dan 6 hari) eksplan dipindahkan dalam media padat yaitu media dasar Murashige dan Skoog (1962) yang diperkaya dengan 2.5 mg/l BAP (*Benzil Amino Purin*). Setelah dua bulan kultur embrio tersebut disubkultur yang dilakukan berulang pada media dengan konsentrasi zat pengatur tumbuh diturunkan sampai tanpa zat pengatur tumbuh untuk media subkultur yang terakhir. Kemudian dilakukan pengamatan jumlah kromosom.

Pengamatan jumlah kromosom dilakukan dengan menggunakan metode squash yang diaplikasi dari Darnaedi (1990). Akar dipotong sepanjang 1 cm dari ujung akar, dicuci dengan air bersih dan segera dimasukkan ke dalam larutan 0.002 M 0.8 hidroksiquinolin dan disimpan selama 3-5 jam dalam lemari pendingin. Kemudian akar dipindahkan ke dalam larutan carnoy yang terdiri dari campuran kloroform, asam asetat glasial dan alkohol 95% dengan perbandingan 1:1:2 selama 10 menit. Selanjutnya akar dipindahkan ke dalam larutan HCl 4N selama 10 menit. Kemudian direndam dalam larutan asam asetat 45% selama 10 menit. Pewarnaan preparat dilakukan dengan menggunakan 2% orcein selama 10 menit di atas gelas objek. Setelah pewarnaan gelas penutup diletakkan di atas akar dan dilakukan pemukulan dengan menggunakan ujung pensil secara perlahan dan ditekan. Kemudian dilakukan pengamatan di bawah mikroskop. Setiap individu tanaman dipilih beberapa sel terpilih yaitu sel yang menunjukkan fase metafase, tidak terjadi tumpang tindih antar sel maupun antar kromosom. Pada fase tersebut kromosom tampak menyebar, sehingga memudahkan dalam pengamatan.

Hasil

Pada biakan F_1 klon Ciamis tidak terdapat pengaruh interaksi antara konsentrasi kolkisin dengan

lama perlakuan terhadap parameter pertumbuhan (Tabel 1). Pada umur lima bulan tunas belum terbentuk kecuali pada kontrol. Mulai bulan ke tujuh dari perlakuan kolkisin mulai terbentuk tunas adventif. Dengan periode tersebut sudah terjadi proses pemulihan diri.

Tunas paling banyak dihasilkan dari perlakuan kolkisin 0,25% selama 3 hari yaitu 9,94. Untuk pertumbuhan kearah pemanjangan tunas paling tinggi dihasilkan dari perlakuan kolkisin 0,25% selama 3 hari yaitu 0,45 cm.

Kecepatan laju tahap pertumbuhan biakan (globular, kalus, dan tunas) setelah kultur dapat dilihat pada Tabel 2. Pada umur 5 bulan umumnya pada semua perlakuan terjadi pertumbuhan pada tahap kalus, kecuali pada beberapa perlakuan biakan ada yang membentuk tunas dan masih ada yang berbentuk globular. Pada umur 9 dan 11 bulan persentase biakan yang menjadi tunas mulai bertambah.

Tabel 2. Persentase rata-rata pertumbuhan dari globular menjadi kalus dan tunas pada F₁ klon Ciamis

Lama perlakuan (hari)	Globular (%)					Kalus (%)					Tunas (%)				
						Kolkisin (%)									
	C1	C2	C3	C4	C5	C1	C2	C3	C4	C5	C1	C2	C3	C4	C5
Bulan ke-5															
H 3	75	0	75	50	0	25	100	25	50	100	0	0	0	0	0
H 6	0	25	0	0	0	75	75	100	100	100	25	0	0	0	0
Bulan ke-7															
H 3	75	0	75	50	0	25	100	25	50	50	0	0	0	0	50
H 6	0	25	0	0	0	75	75	100	100	100	25	0	0	0	0
Bulan ke-9															
H 3	50	0	25	50	0	50	100	75	50	50	0	0	0	0	50
H 6	0	25	0	0	0	75	75	100	75	100	25	0	0	25	0
Bulan ke-11															
H 3	50	0	0	25	0	50	100	100	75	50	0	0	0	0	50
H 6	0	25	0	0	0	75	75	100	75	100	25	0	0	25	0
Keterangan: C1= 0.00% C2=0.05% C3=0.10% C4=0.20% C5=0.25% H = hari															

Tabel 1. Pengaruh konsentrasi kolkisin dan lama perlakuan terhadap rata-rata jumlah dan tinggi tunas pada F₁ klon Ciamis

Lama Perlakuan (hari)	Jumlah tunas					Tinggi tunas (cm)				
						Kolkisin (%)				
	0.00	0.05	0.10	0.20	0.25	0.00	0.05	0.10	0.20	0.25
Bulan ke-5										
H 3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00 a	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	a	a	a	a		a	a	a	a	a
H 6	2.75	0.00	0.00	0.00	0.00 a	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	a	a	a	a		a	a	a	a	a
Bulan ke-7										
H 3	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.14
	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
H 6	4.63	0.00	0.00	0.00	0.00	0.16	0.00	0.00	0.00	0.00
	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Bulan ke-9										
H 3	0.00	0.00	0.00	0.00	7.56	0.00	0.00	0.00	0.00	0.24
	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
H 6	8.13	0.00	0.00	3.38	0.00	0.22	0.00	0.00	0.17	0.00
	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Bulan ke -11										
H 3	0.00	0.00	0.00	0.00	9.94	0.00	0.00	0.00	0.00	0.45
	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
H 6	8.75	0.00	0.00	6.75	0.00	0.46	0.00	0.00	0.29	0.00
	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Keterangan : - Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf 5% dengan uji Duncan - H = hari										

Tabel 3. Bentuk-bentuk baru dari penampakan fenotipe yang secara visual berbeda dengan kelompok tunas lainnya pada F₁ klon Ciamis

Kolkisin (%) dan Lama Perlakuan (hari)		Penampakan dari biakan
Kontrol		warna tunas hijau, akar kurus, multiplikasi banyak, lingkaran batang kecil, tunas tinggi
C 0.20	H 6	warna tunas hijau tua, akar gemuk, multiplikasi sedikit, lingkaran batang gemuk/besar, tunas pendek
C 0.25	H 3	warna tunas hijau tua, akar gemuk, multiplikasi banyak, lingkaran batang besar/gemuk, tunas tinggi

Keterangan : C = Kolkisin, H = Lama perlakuan

Tabel 4. Persentase biakan F₁ klon Ciamis dengan tingkat ploidi tertentu

Lama Perlakuan (hari)	Tingkat Ploidi	Persentase Jumlah Biakan (%)				
		Kolkisin (%)				
		0.00	0.05	0.10	0.20	0.25
H 3	2n=32	50	100	100	66.67	-
	2n=3x=48	-	-	-	33.67	75
	2n=4x=64	-	-	-	-	25
	2n=6x=96	-	-	-	-	-
H 6	2n=32	100	75	50	-	-
	2n=3x=48	-	-	50	75	-
	2n=4x=64	-	-	-	-	100
	2n=6x=96	-	-	-	-	-

Dari pengamatan secara visual terlihat adanya bentuk-bentuk baru dari penampakan fenotipe akibat pemberian kolkisin. Bentuk-bentuk baru tersebut dapat dilihat pada Tabel 3. Penampakan biakan yang sangat menonjol berasal dari perlakuan kolkisin 0.20% selama 6 hari dan 0.25% selama 3 hari.

Dari hasil pengamatan jumlah kromosom tetua panili liar dan budidaya pada klon Ciamis berjumlah 2n=32. Sesuai dengan Darlington dan Wylie (1955) bahwa jumlah kromosom somatik *V. planifolia* adalah 32 dengan jumlah kromosom dasar n=16. Hibrid F₁ yang dihasilkan dari persilangan antara betina liar dengan jantan budidaya pada klon Ciamis mempunyai jumlah kromosom somatik 32.

Dari Tabel 4 dapat dilihat bahwa biakan F₁ klon Ciamis dari perlakuan kolkisin 0.25% selama 6 hari menghasilkan tingkat ploidi tetraploid yaitu (2n=4x=64). Untuk perlakuan selama 3 hari dengan konsentrasi kolkisin 0.25% diperoleh tingkat ploidi triploid (2n=3x=48) dan tetraploid (2n=4x=64) dengan perbandingan 3:1. Pada perlakuan kolkisin 0.20%

selama 6 hari diperoleh tingkat ploidi triploid (2n=3x=48) dan heksaploid (2n=6x=96) dengan perbandingan 3:1, untuk lama perlakuan 3 hari diperoleh tingkat ploidi diploid (2n=32) dan triploid (2n=3x=48) dengan perbandingan 2:1. Pada perlakuan kolkisin 0.10% selama 6 hari diperoleh tingkat ploidi diploid (2n=32) dan triploid (2n=3x=48) dengan perbandingan 1:1. Sedangkan pada perlakuan kolkisin 0.05% dan 0.10% selama 3 hari jumlah kromosom tidak berubah sama dengan kontrol yaitu 32.

PEMBAHASAN

Hasil pengamatan parameter pertumbuhan pada struktur globular F₁ hasil persilangan terlihat bahwa proses diferensiasi struktur globular membentuk tunas adventif sangat lambat dan cenderung membentuk kalus. Hal ini diduga telah terjadi depresi pertumbuhan pada tahap awal perlakuan akibat kerusakan fisiologis tanaman yang disebabkan oleh kolkisin sehingga dapat menghambat proses regenerasi. Menurut Husni *et al.* (1995), depresi pertumbuhan dan vigor mengakibatkan

menurunnya jumlah tunas dan terhambatnya laju pertumbuhan tinggi tunas. Pada tahap selanjutnya setelah terjadi pemulihan justru dapat merangsang laju pembentukan tunas dan pemanjangannya meningkat. Hal ini terlihat pada umur 9 dan 11 bulan yang diduga telah terjadi pemulihan jaringan yang rusak akibat pemberian kolkisin.

Hasil penelitian Husni *et al.* (1995) pada panili budidaya tunas paling tinggi dihasilkan dari perlakuan kolkisin 0.05% selama 1 dan 0.10% selama 1 dan 2 hari. Menurut Eigsti dan Dustin (1957), konsentrasi kolkisin bersifat kritis dimana konsentrasi yang beragam menyebabkan pengaruh yang beragam pula. Berbagai konsentrasi kolkisin memberikan pengaruh yang berbeda-beda terhadap parameter-parameter pertumbuhan, antara lain tinggi tunas, jumlah daun, panjang akar, berat basah tunas, berat basah akar, berat kering tunas, berat kering akar, kadar air tunas dan kadar air akar.

Kecepatan laju pertumbuhan biakan dari semua perlakuan umumnya terjadi pada tahap kalus, kecuali pada beberapa perlakuan biakan ada yang membentuk tunas dan masih ada yang berbentuk globular. Masih rendahnya kalus beregenerasi pada perlakuan diduga karena pemberian kolkisin pada awal perlakuan mengakibatkan kerusakan fisiologis tanaman. Pemberian kolkisin dapat menghambat pembentukan benang-benang gelendong yang menghentikan proses mitosis pada stadium metafase sehingga mengakibatkan terjadinya hambatan bagi pertumbuhan sel. Pemberian kolkisin mengakibatkan penundaan pertumbuhan akibat jaringan yang rusak dan memerlukan waktu yang lama untuk tumbuh.

Pada kontrol, kalus yang beregenerasi masih rendah. Hal ini diduga media yang digunakan belum sesuai, sehingga perlu dilakukan percobaan untuk mengetahui media yang cocok. Menurut Husni *et al.* (1995), jaringan yang pada awalnya cenderung membentuk kalus agak sukar melakukan diferensiasi kembali. Hal ini mungkin disebabkan penggunaan zat pengatur tumbuh 2.5 mg/l BAP belum dapat memacu proses diferensiasi jaringan membentuk tunas. Sesuai dengan pendapat Mariska *et al.* (1995) bahwa BAP mempunyai daya aktivitas yang kuat untuk mendorong proses pembelahan sel sehingga bila

dipakai pada kumpulan sel yang embrionik yang juga selalu membelah, maka proses ke arah spesialisasi jaringan membentuk meristemoid akan terhambat.

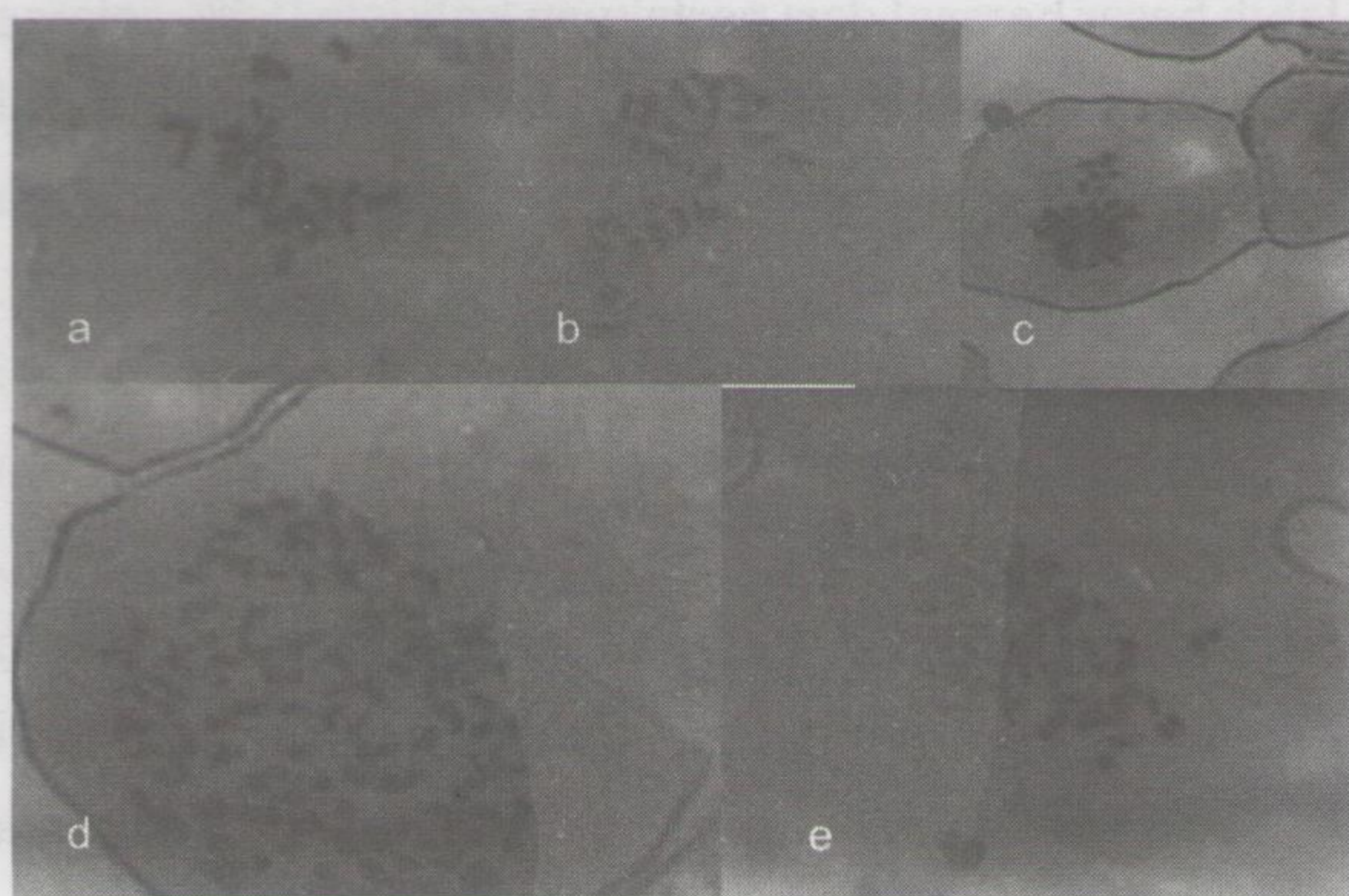
Hasil pengamatan secara visual terlihat adanya bentukan-bentukan baru dari penampakan fenotipe, hal ini diduga telah terjadinya proses poliploidi yang berbeda pada setiap perlakuan. Hasil penelitian Mariska *et al.* (1995) pada tanaman nilam menunjukkan bahwa perlakuan kolkisin meningkatkan ukuran dan ketebalan daun dengan warna yang lebih hijau serta batang yang lebih besar berasal dari perlakuan kolkisin 0,5% selama 1 hari dan 1% selama 1 dan 3 hari. Sedangkan hasil penelitian Hasan *et al.* (1991), perlakuan kolkisin juga dapat meningkatkan jumlah kloroplas dan ukuran sel. Lindsey dan Jones (1989) menyatakan bahwa variasi jumlah ploidi karena kolkisin akan menghasilkan tanaman dengan beragam sifat morfologi, agronomi, fisiologi, dan respon terhadap lingkungan. Perubahan tingkat kromosom walaupun frekuensinya rendah tetapi bila terjadi dapat cepat terlihat dengan adanya perubahan yang nyata pada fenotipenya.

Pengamatan jumlah kromosom menunjukkan perbedaan tingkat ploidi yang diperoleh dari perlakuan kolkisin dengan konsentrasi dan lama perlakuan yang sama. Hal ini diduga disebabkan setiap sel mempunyai tanggapan yang berbeda terhadap konsentrasi dan lamanya perlakuan kolkisin, dimana konsentrasi kolkisin yang digunakan bersifat kritis dan akibat yang muncul beragam.

Pada biakan dengan konsentrasi kolkisin 0.05% dan 0,10%, jumlah kromosom yang dihasilkan tidak berubah yaitu tetap 32. Hal ini diduga bahwa pemberian kolkisin pada konsentrasi tersebut belum dapat mempengaruhi aktivitas jaringan meristem untuk memutuskan benang-benang gelendong. Menurut Welsh (1981), terputusnya benang-benang gelendong akan dihasilkan sel dengan jumlah kromosom ganda dan jika penggunaan kolkisin diperpanjang dari waktu yang telah digunakan maka akan terjadi peningkatan jumlah kromosom.

Dari Gambar 1 dapat dilihat hasil pengamatan jumlah kromosom F₁ klon Ciamis yang menunjukkan adanya penggandaan jumlah kromosom diikuti dengan pembesaran sel-sel pada perlakuan-perlakuan tertentu. Hal ini sesuai dengan pendapat Eigsti dan Dustin

(1957) bahwa kolkisin berpengaruh terhadap bertambah besarnya ukuran sel sehingga menjadikan penampakan bentuk raksasa. Kolkisin sebagai alkaloid, akan mempengaruhi proses pembelahan sel-sel tumor, yang menyebabkan terhentinya mitosis dengan menghambat mekanisme spindel, sehingga setelah kromosom membelah tetap tinggal di tengah-tengah, kemudian kembali ke stadium istirahat dan dihasilkan sel dengan jumlah kromosom berlipat yang memberikan penampakan lebih besar.



Gambar 1. Hasil pengamatan jumlah kromosom F_1 klon Ciamis

- a. Kontrol ($2n=32$)
- b. Kolkisin 0.05% selama 3 hari ($2n=32$)
- c. Kolkisin 0.10% selama 3 hari ($2n=32$)
- d. Kolkisin 0.20% selama 6 hari ($2n=6x=96$)
- e. Kolkisin 0.25% selama 6 hari ($2n=4x=64$)

KESIMPULAN

Perlakuan kolkisin menyebabkan keragaman pada penampakan biakan, terutama pada warna tunas yang lebih hijau tua, tingkat multiplikasi tinggi, tinggi tunas dan lingkaran batang yang besar/gemuk seiring dengan terjadinya perubahan jumlah ploidi.

Hasil penggandaan kromosom pada biakan F_1 menunjukkan jumlah kromosom yang beragam yaitu 32, 48, 64 dan 96. Pemberian kolkisin pada konsentrasi 0.25% selama 6 hari menghasilkan tanaman teraploid dengan jumlah kromosom $2n=4x=64$. Penambahan jumlah kromosom diikuti dengan peningkatan ukuran sel dan pembesaran organ.

DAFTAR PUSTAKA

Crowder LV. 1990. *Genetika Tumbuhan*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. hlm 297.

Darlington CD and Wylie AP. 1955. *Chromosome Atlas of Flowering Plants*. University Press Aberdeen. London. hlm 405.

Darnaedi D. 1990. *Training Teknik Sitologi Angkatan I*. Herbarium Bogoriensis. Balitbang Botani. Puslitbang Biologi LIPI, 1-10.

Eigisti PJ and Dustin PJ. 1957. *Colchicine in Agriculture, Medicine Biology and Chemistry*. The Iowa State Collage Press. Iowa. hlm 275.

Hasan L, Jones RN, Parker JS and Posselt UK. 1991. Colchicine induced heritable variation in cell size and chloroplast number in the leaf cells of inbredrye grasses (*Lolium perenne*, *L. multiflorum*). *Euphytica* 52, 39-45.

Husni A, Sukmadaja D dan Mariska I. 1995. Variasi somaklonal tanaman panili dengan mutagen kimia kolkisin secara *in vitro*. Prosiding Evaluasi dan Hasil Penelitian Tanaman Industri. Puslitbangtan, 8-16.

King RC. 1965. *Genetics*. Oxford University Press. Oxford. hlm 170-171.

Linsey K and Jones MGK. 1989. *Plant Biotechnology in Agriculture*. Open University Press. Milton Keynes. hlm 9.

Mariska I, Seswita D dan Purnamaningsih R. 1995. Peningkatan keragaman genetik tanaman nilam dengan kolkisin. *Prosiding Evaluasi Hasil Pertanian Tanaman Industri Buku I*. Puslitbangtan, 34-39.

Mariska I, Hobir, Husni A, Kosmiatin M dan Rusyadi Y. 1996. Penyelamatan embrio hasil persilangan antara panili budidaya dan panili liar. Balitbio, 1-5 (Unpublished).

Murashige T and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15, 473-497.

Nuryani Y, Tombe M dan Mogi S. 1996. Respon beberapa tipe panili terhadap patogen busuk batang (*Fusarium oxysporum* F. sp. *Vanillae*). *Proc. Seminar on Integrated Control on Main Disease of Industrial Crops*. Puslitbangtan, 123-128.