Jurnal Natur Indonesia 12(1), Oktober 2009: 44-48
ISSN 1410-9379, Keputusan Akreditasi No 65a/DIKTI/Kep./2008

Identifikasi Genetik Mutan *Talinum paniculatum* JACQ. (GAERTN.) Berdasarkan Marka RAPD

Yuyu Suryasari Poerba

Bidang Botani, Pusat Penelitian Biologi LIPI
Jl Raya Bogor Km 46 Cibinong, Bogor 16911

Diterima 07-11-2008 Disetujui 30-07-2009

ABSTRAK

Javasom *Talinum paniculatum* Jacq. (Gaertn.) is one of popular vegetable plants with potential medicinal properties. The plant root is often used as a substitute for ginseng (*Panax* ginseng L.), and the leaves are used as a vegetable and as a substitute for purslane (*Portulaca olaraeae* L.). An effort to improve genetic quality of the plant was made through induced mutation with ethyl methane sulphonate (EMS). A variety of EMS dosages (0, 0.3%, 0.6%, 0.9%, 1.2%, 1.5% dan 1.8%) were applied to javasom seeds to induce mutation for 24 hours at room temperature. Selected five putative mutant genotypes of the third generation after mutagen treatment (M_3) was analyzed using Ramdom amplified polymorphic DNA (RAD) marker. Twenty RAPD primers generated 185 scorable bands with 78.92% of them were polymorphic. Size of the bands varied from 200bp to 2.5kbp. Clustering analysis was performed based on RAPD profiles using the UPGMA method. The range of genetic distance among individual genotypes was from from 0.31 to 0.58, while genetic variance was 0.29 $\pm$ 0.17. The five genotypes were proof to be solid mutants.

keywods: Javasom, *Talinum paniculatum*, induced mutation, EMS, RAPD

PENDAHULUAN

Som jawa [*Talinum paniculatum* Jacq. (Gaertn.)] merupakan salah satu tanaman bahan baku obat dan sayuran yang cukup populer dan potensial untuk dikembangkan. Hampir semua bagian tumbuhan ini dimanfaatkan. Sebagai tumbuhan bahan obat umbinya dimanfaatkan sebagai bahan obat yang berkhasiat sebagai tonikum, sedangkan bagian atas tanaman (terutama daunnya) digunakan sebagai sayuran pengganti purslane (*Portulaca oleracea* L.) (Rivai, 1994). Daun som jawa mengandung saponin yang memiliki efek anti radang dan flavonoid yang memiliki anti bakteri. Tanaman ini seringkali digunakan sebagai sebagai pengganti ginseng (*Panax ginseng*) yang masih diimpor, karena memiliki senyawa yang mirip dengan senyawa yang terkandung dalam ginseng yaitu senyawa golongan terpenoida dan streoida.

Som jawa diintroduksi dari Suriname ke Pulau Jawa (Kebun Raya Bogor) pada tahun 1915. Tanaman ini diduga berasal dari Amerika tropis. Di Indonesia, som jawa yang dimanfaatkan diantaranya *Talinum triangulare* dan *T. paniculatum*, yang dapat dibedakan dari perbungaannya (sudut perbungaan segitiga pada *T. triangulare*, sedangkan menggalah pada *T paniculatum.*). Som jawa diperbanyak secara generatif dengan biji dan vegetatif dengan stek batang. Sistem penyerbukan alami tanaman ini pada umumnya menyerbuk silang, akan tetapi tanaman ini mampu menyerbuk sendiri dengan mekanisma pelengkungan stigma (Rachman, 2002).

Mutasi induksi telah dilakukan pada som jawa dan menghasilkan varian yang beragam (Poerba, 2004), namum demikian varian-varian tersebut belum identifikasi secara molekuler. Keragaman genetik yang terjadi akibat mutasi dapat dideteksi pada tingkat molekuler dengan menggunakan teknik 'DNA fingerprinting' seperti Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (Barcaccia *et al.*, 1994; Ishak, 1998). RAPD merupakan metoda yang berdasarkan Polymerase Chain Reaction (PCR) dengan amplifikasi DNA yang menggunakan 'arbitrary primer' selama reaksi PCR. Produk PCR berupa sejumlah fragmen-fragmen DNA dengan ukuran yang berbeda secara konvensional dipisahan dengan elektroforesis gel agarosa yang diwarnai dengan etidium bromida. Metode ini sangat sederhana dan cepat. Dengan teknik ini dapat dibedakan ukuran fragmen DNA dengan mudah dan cepat, bahkan hanya dengan jumlah jaringan yang sedikit (Wolff, 1996). Williams *et al.,* (1993) memperkenalkan penggunaan primer 10-mer (dekamer) yang mempunyai kegunaan umum pada teknik RAPD.

*Telp: (021)8765063
Email: yyspoerba@yahoo.com

Dengan satu 'arbitrary primer' fragment diamplifikasi dan biasanya polimorfisme yang tinggi diperoleh, tanpa mengetahui sebelumnya sekuens DNA yang diamplifikasi (Wolff, 1996).

Penelitian pemuliaan dan perbaikan genetik tanaman ini telah menghasilkan 'putative mutant' yang memiliki berat akar yang lebih tinggi dibandingkan kontrolnya (Poerba, 2004). Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi genotipe hasil mutasi tersebut berdasarkan marka RAPD.

BAHAN DAN METODE

Bahan yang digunakan adalah lima genotipe 'putative' mutan *T. paniculatum* yang merupakan hasil mutasi induksi dengan menggunakan EMS (Poerba, 2004) dan satu genotipe kontrolnya.

Ekstraksi DNA enam genotipe *T. paniculatum* dilakukan berdasarkan metoda CTAB (Delaporta *et al.*, 1983) yang dimodifikasi. Sebanyak 0.5 gram daun yang dikeringkan dengan silica gel digerus dengan menggunakan mortar dan pestle porselen. Setelah halus serbuk daun dimasukkan kedalam microtube/ tabung 2.0 mL dan ditambah dengan 700µL bufer ekstraksi yang telah dipanaskan 65^{0}C yang mengandung 2% CTAB, 2% PVP, 20mM EDTA, 100mM Tris-HCl pH 7.5, dan 1.4M HCl dan 0.2% mercaptoethanol. Tabung kemudian dikocok dengan menggunakan vortex sampai larutan tercampur. Selanjutnya diinkubasi dalam waterbath pada suhu 65^{0}C selama 60 menit. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 28^{0}C. Supernantant kemudian diambil dan dimasukkan ke dalam tabung yang baru dan ditambah dengan 700µL larutan kloroform:isoamil alkohol (24 : 1), dan dikocok. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 28^{0}C. Langkah ini diulang sekali kali, supernatant selanjutnya ditambah 700µL larutan kloroform:isoamil alkohol (24 : 1) dan 20µL larutan 5 M natrium asetat dan dikocok kuat. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 28^{0}C. Supernantant kemudian diambil 700µL dan ditambah ¾ volume isopropanol yang dingin, dan dikocok perlahan. Kemudian tabung berisi larutan DNA disimpan pada suhu-20^{0}C selama 30 menit. Selanjutnya tabung dikocok perlahan dengan membolak-balikkan tabung sehingga terlihat benang-benang DNA dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 3 menit pada suhu 28^{0}C. Selanjutnya supernanat dibuang dan pelet DNA dicuci dengan etanol absolut dan dikeringkan dalam vacum selama 30 menit. Pada tahap ini DNA dapat disimpan dalam suhu-20^{0}C atau dilarutkan dengan dengan 100µL bufer TE. Purifikasi DNA dilakukan dengan penambahan menambahkan 1 µL RNase A (100 mg/mL). Kualitas DNA dapat dilihat dengan elektroforesis pada gel agarosa (2%) menggunakan pewarna ethidium bromida dan dengan marka Lambda DNA/*Eco*R1 + Hind III.

Optimasi PCR dilakukan untuk mendapatkan kondisi PCR yang optimal. Beberapa variabel seperti konsentrasi primer, konsentrasi DNA template, konsentrasi Taq DNA Polymerase, dan suhu annealing yang digunakan untuk PCR dipelajari dan dicoba untuk mendapatkan produk PCR yang optimal. Amplifikasi DNA dilakukan berdasarkan metode Williams *et al.,* (1990) yang dimodifikasi dengan menggunakan 'arbitrary primer' yang disusun oleh 10 oligo nucleotide (10-oligomer). Berdasarkan hasil optimasi PCR diatas, untuk selanjutnya PCR dilakukan pada total volume 15 µL pada setiap tabung PCR 200 µL. Primer yang digunakan sebanyak 20 'arbitrary' primer Kit A dari Operon Technology Ltd. (Tabel 1). Masing-masing tabung PCR berisi 0.2 nM dNTPs; 1.5 µl bufer reaksi; 2mM $MgCl_2$; 25 ng DNA sample; 5 pmole primer tunggal; dan 1 unit Taq DNA polymerase (Promega).

Reaksi PCR dengan menggunakan Thermocylcer (Perkin Elmer 480) selama 45 siklus. Pemanasan pertama pada suhu 94^{0}C selama 5 menit, kemudian diikuti oleh 45 siklus yang terdiri atas denaturasi 1 menit pada suhu 94^{0}C, annealing 1 menit pada suhu 36^{0}C, dan 2 menit ektensi pada suhu 72^{0}C. Setelah 45 siklus selesai, kemudian diikuti 4 menit pada suhu 72^{0}C dan pendinginan pada suhu 4^{0}C selama 30 menit. Hasil amplifikasi difraksinasi secara elektroforesis dengan menggunakan Mupid Mini Cell pada gel agarosa 2.0% dalam bufer TEA (Tris-EDTA) selama 50 menit pada 50 V. Kemudian direndam dalam larutan ethidium bromida dengan konsentrasi akhir 1µL /100 mL selama 10 menit. Hasil pemisahan fragmen DNA dideteksi dengan menggunakan UV transluminator, kemudian difoto dengan menggunakan kamera polaroid. Sebagai standar digunakan 100 bp DNA ladder (Promega) untuk menetapkan ukuran pita hasil amplifikasi DNA.

Karena RAPD merupakan marka yang dominan, maka setiap pita RAPD dianggap sebagai satu lokus putatif bialel (single biallelic locus) (Williams

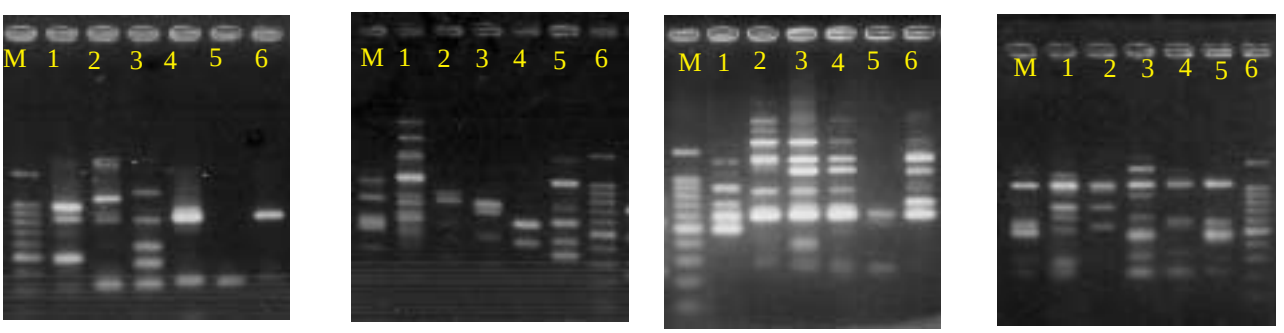
et al., 1990). Hanya lokus yang menunjukkan pita yang jelas yang digunakan untuk skoring: ada (1) dan kosong (0). Matriks binari fenotipe RAPD ini kemudian disusun untuk digunakan pada berbegai analisis gentik. Identitas genetik dan jarak genetik dihitung dari semua kombinasi *pairwise* dari semua sampel (Nei, 1978). Philogram dibuat berdasarkan jarak genetik (Nei, 1978) dengan metoda UPGMA (Unweighted Pairgroup Method using Arithmetic verage), modifikasi dari prosedur NEIGHBOR dari PHYLIP Version 3.5.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil amplifikasi total genom DNA dengan dengan menggunakan 20 primer pada 6 genotipe *T. paniculatum* menghasilkan produk PCR yang dapat dibaca dan diskor, sehingga hasilnya dapat dianalisa (Gambar 1). Sekuens dari kedua primer ini dan jumlah marka RAPD yang dihasilkan tertera pada Tabel 1.

Pola pita DNA hasil elektroforesis menunjukkan bahwa setiap jenis primer menghasilkan pola pita DNA yang berbeda pada setiap sampel. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa diperoleh 185 fragmen DNA yang berukuran dari 200 bp hingga 2.5 kb. Dari 187 fragmen DNA, 146 (78.92%) merupakan fragmen polimorfik. Primer OPA - 04, -06, -07, -12, -14 menghasilkan pita DNA polimorfik 100%. Rata-rata setiap primer menghasilkan pita polimorfik sebanyak 7.4. Jumlah maksimum pita polimorfik 13 terdapat pada primer OPA-04 dan OPA-16 (Tabel 1). Keragaman genetik (Nei, 1978) untuk seluruh sampel yang diteliti sebesar 0.29 ± 0.17.

Jarak genetik (Nei, 1978) antar individu terlihat pada Tabel 2. Jarak genetik terbesar (0.5771) diperoleh



Gambar 1. Hasil PCR genotipe mutan *Talinum paniculatum* Jacq (Gaertn.) dengan berbagai primer. Keterangan: M = 100 bp DNA Ladder (Promega), 1=Kontrol, 2= M20.9-5, 3= M21.2-7, 4= M21.5-2; 5=M21.5-8, 6=M21.8=4.

Tabel 1. Primer yang digunakan dan jumlah pita DNA hasil amplifikasi pada enam genotipe. *Talinum paniculatum* Jacq (Gaertn)

Kode Primer	Urutan Basa	Jml total pita	Jumlah pita monomorfik	Jumlah pita polimorpfik
OPA-01	5'-CAGGCCCTTC -3'	11	2	9
OPA-02	5'-TGCCGAGCTG -3'	10	3	7
OPA-03	5'-AGTCAGCCAC -3'	9	7	2
OPA-04	5'-AATCGGGCTG-3'	13	0	13
OPA-05	5'-AGGGGTCTTG -3'	1	1	0
OPA-06	5'-GGTCCCTGAC -3'	8	0	8
OPA-07	5'-GAAACGGGTG-3'	12	0	12
OPA-08	5'-GTGACGTAGG -3'	12	1	11
OPA-09	5'-GGGTAACGCC -3'	4	2	2
OPA-10	5'-GTGATCGCAG–3'	12	3	9
OPA-11	5'-CAATCGCCGT -3'	5	1	4
OPA-12	5'-TCGGCGATAG -3'	7	0	7
OPA-13	5'-CAGCACCCAC -3'	11	4	7
OPA-14	5'-TCTGTGCTGG -3'	8	0	8
OPA-15	5'-TTCCGAACCC -3'	8	1	7
OPA-16	5'-AGCCAGCGAA-3'	14	1	13
OPA-17	5'-GACCGCTTGT -3'	11	1	10
OPA-18	5'-AGGTGACCGT -3'	9	7	2
OPA-19	5'-CAAACGTCGG -3'	12	1	11
OPA-20	5'-GTTGCGATCC -3'	8	4	4
	Jumlah	185	39	146 (78.92%)

*) Keterangan: 1 = Kontrol, 2 = M37542, 3= M33176, 4 = M35286, 5 = 35211, 6= M37545

Pola pita DNA hasil elektroforesis menunjukkan bahwa setiap jenis primer menghasilkan

Tabel 2. Matrik identitas genetik dan jarak genetik genotipe *Talinum paniculatum*

Individu	Kontrol	M37542	M33176	M35286	35211	M37545
Kontrol	****	0.6524	0.6952	0.6898	0.5668	0.6898
M37542	0.4271	****	0.7326	0.7059	0.5615	0.6310
M33176	0.3636	0.3111	****	0.7166	0.5615	0.5989
M35286	0.3713	0.3483	0.3333	****	0.6203	0.6898
35211	0.5677	0.5771	0.5771	0.4775	****	0.6310
M37545	0.3713	0.4604	0.5126	0.3713	0.4604	****

*) Identitas genetik (bagian atas diagonal) dan jarak genetik (Nei, 1978)

antara individu 2 dan 5, serta 4 dan 5, sedangkan terkecil terdapat antara individu 2 dan 3 (0.3111, Tabel 2).

Philogram UPGMA (Gambar 2) menunjukkan hubungan genetik diantara individu berdasarkan matrik jarak genetik (Nei, 1978). Individu 1 dan 6 mengelompok menjadi satu kelompok, demikian juga dengan individu 2 dan 3 serta 4, yang menunjukkan kesamaan properti genetik antar individu tersebut. Individu 5 merupakan genotipe yang terjauh terhadap genotipe lainnya yang menunjukkan genotipe ini yang paling berbeda diantara genotipe-genotipe lainnya.

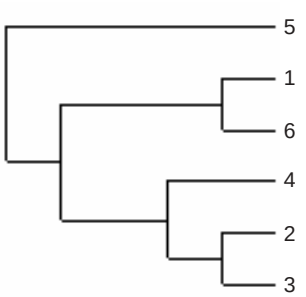
Salah satu keuntungan induksi mutagenesis yaitu dapat menghasilkan alel-alel mutant yang berbeda dengan berbagai modifikasi sifat/karakter tanaman (Chopra, 2005). Diantara mutagen kimia, *alkylating agents*, EMS merupakan mutagen kimia yang paling berpotensi (Chopra, 2005). EMS tergolong sebagai agen mutasi karena kemampuannya mengalkilasi gugus oksigen dan nitrogen reaktif pada basa purin dan pirimidin yang dapat menyebabkan perubahan pada struktur basa-basa tersebut yang berakibat terbentuknya rekombinasi pita DNA (Dodson and Masker, 1986). Adanya rekombinasi pada pita baru DNA tersebut menyebabkan perubahan pada struktur genetik organisme.

EMS juga menunjukkan pengaruh yang signifikan dalam perubahan gen yang terletak dekat dengan *centromere* dibandingkan di daerah yang jauh dari sentomer. Demikian juga, mutasi klorofil seringkali terjadi pada mutasi yang diinduksi EMS dibandingkan dengan mutagen secara fisik. Hal ini menunjukkan perbedaan komposisi kimia dekat sentromer, yang membuat daerah dekat sentromer ini lebih sensitif terhadap mutagen kimia. Penjelasan yan lain adalah, gene dekat sentromer sedikit sekali terlibat dalam rekombinasi, olehkarenanya mutasi pada gen-gen tersebut tidak tereliminasi melalui seleksi (Chopra, 2005).

Dalam *assay* RAPD, fragment DNA yang diamplifikasi sangat tergantung atas sekuens primer dan atas sekuens pada genom (Tingey *et al.,* 1994). Primer yang hanya berbeda satu nukleotida menghasilkan profil RAPD yang berbeda pula. Olehkarenanya, teknik RAPD ini dapat mendeteksi perubahan satu basa dalam DNA genom jika digunakan cukup primer. Dalam penelitian ini, primer RAPD yang polimorfik sangat efektif digunakan untuk seleksi genotipe mutant *Talinum paniculatum.* Seleksi yang dibantu marka molekuler ini membantu efisiensi seleksi dengan memungkinkannya dilakukan seleksi pada tahap awal, dan mengurangi ukuran populasi tanaman yang akan diseleksi. Lebih jauh lagi, pengetahuan teknologi sifat marka molekuler akan meningkatkan ketepatan dalam seleksi mutant yang diharapkan (Khawale *et al.,* 2007).

Pengaruh mutagen EMS terhadap mutagenesis *T. paniculatum* sangat signifikan dengan uji analisis RAPD. 19 dari 20 primer (Tabel 1) dapat mengidentifikasi solid mutant. Primer RAPD ini menhasilkan 146 marka RAPD (Tabel 1) yang ukurannya bervariasi dari 200 bp hingga 2.5kb. Hasil ini menunjukkan bahwa genotipe hasil induksi ini merupakan solid mutan, sehingga dapat dilanjutkan untuk tahapan seleksi berikutnya.

Jarak genetik yang bervariasi antara 0.5615 hingga 0.7326 (Tabel 2) menunjukkan bahwa genotipe *T. paniculatum* yang diuji memiliki keragaman genetik yang cukup tinggi. Hal ini juga diperkuat dengan nilai



Keterangan: 1 = Kontrol, 2 = M37542, 3= M33176, 4 = M35286, 5 = 35211, 6= M37545

Gambar 2. Philogram 6 genotipe *Talinum paniculatum* hasil mutasi

keragaman genetik (h, Nei, 1978) sebesar 0.29 ± 0.17. Hubungan genetik diantara individu yang diuji menunjukkan adanya pemisahan ke dalam kelompok. Individu 1 dan 6 yang mengelompok menjadi satu kelompok menunjukkan bahwa mutan no 6 dan no 1 (kontrol) memiliki banyak kemiripan. Sedangkan mo 5 merupakan genotipe mutan yang paling berbeda. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa teknik RAPD Dengan demikian, teknik RAPD dapat digunakan untuk mendeteksi perubahan konstitusi genetik akibat mutasi pada DNA genom sehingga informasi hasil analisis ini dapat memberikan sumbangan yang berarti dalam identifikasi genotipe hasil mutasi pada ginseng jawa.

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa genotipe ginseng jawa hasil mutasi dengan teknik RAPD menunjukkan adanya polimorfisme antara genotipe hasil mutasi dengan kontrolnya. Dengan menggunakan 20 primer RAPD dihasilkan 185 fragmen DNA yang berukuran dari 200 bp hingga 2.5 kb. Dari 187 fragmen DNA, 146 (78.92%) merupakan fragmen polimorfik. Keragaman genetik (Nei, 1978) untuk seluruh sampel yang diteliti sebesar 0.29 ± 0.17. Jarak genetic (Nei, 1978) antar individu nerkisar dari 0.31 hingga 0.58. Hasil ini menunjukkan bahwa semua genotipe hasil induksi yang diuji merupakan solid mutan. Dengan demikian, teknik RAPD dapat digunakan untuk mendeteksi perubahan konstitusi genetik akibat mutasi pada DNA genom sehingga informasi hasil analisis ini dapat memberikan sumbangan yang berarti dalam identifikasi genotipe hasil mutasi pada ginseng jawa.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Pusat Penelitian Biologi-LIPI yang telah mendanai penelitian ini melalui Sub Kegiatan Perbaikan Genetik Tanaman Obat.Terimakasih juga disampaikan kepada Saudari Lila yang telah membantu dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Barcaccia, G., Tavoletti, S., Pezotti, M., Falcecinelli, M., & Veronesi, F. 1994. Fingerprinting of alfalfa meiotic mutants using RAPD markers. Euphytica **80**:19-25.

Chopra, V.L. 2005. Mutagenesis: Investigating the process and processing the outcome for crop improvement. Current Science **89**: 353-359.

Delaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B. 1983. A plant DNA minipreparation. Version II. Plant Mol. Biol. Rep. **4**: 19-21.

Dodson, L.A. & Masker, W.E. 1986. Survival and Mutagenesis of Bacteriophage T7 Damaged by Methylmethanesulfonate and Ethylmethanesulfonate. Mutation Research **162**: 137-144.

Ishak. 1998. Identifikasi keragaman DNA genom mutan padi Atomita-2 dan tetuanyamenggunakan RAPD marker. Zuriat **9**: 91-99.

Khawale, R.N., Yerramili, V., & Singh, S.K. 2007. Molecular marker-assisted selection of *in vitro* chemical mutagen-induced grapevine mutants. Current Science **92**: 1056-1060.

Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics **89**: 583-590.

Poerba, Y.S. 2004. Penampilan genotipe *Talinum paniculatum* Jacq. (Gaertn.) pada generasi M_2. Berita Biologi **7**: 127-135.

Rachman, E. 2002. Pelengkungan stigma, suatu mekanisme penyerbukan otonomi *Talinum triangulare*. Kumpulan Abstrak Seminar Nasional Persada IX. PERSADA & FMIPA IPB. Bogor, 19 Maret 2002.

Rivai, M.A. 1994. *Talinum triangulare* (Jacq.) Willd. Di dalam: Siemonsma, J.S. & Piluek, K.(eds.). *Prosea 8: Vegetables*. Leiden: Backhuys Publishers.

Tingey, S.V., Rafalski, J.A., & Hanafey, M.K. 1994. Genetic analysis with RAPD markers. Di dalam: Puigdomenech, P. & *Coruzzi, G (eds)*. Plant Molecular Biology. Belin: Springer-Verlag.

Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J, Rafalsky, J.A., & Tingev, S.V. 1990. DNA plolymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acid Res. **18**: 6531-6535.

Williams, J.G.K., Hanafey, M.K., Rafalsky, J.A., & Tingev, S.V. 1993. Genetic analysis using random amplified polimorphic DNA markers. Meth. Enzymol **218**: 704-740.

Wolff, K. 1996. RAPD analysis of sporting and chimerism in chrysanthenum. Euphytica **89**: 159-164.

Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J, Rafalsky, J.A., & Tingev, S.V. 1990. DNA plolymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acid Res. **18**: 6531-6535.

Williams, J.G.K., Hanafey, M.K., Rafalsky, J.A., & Tingev, S.V. 1993. Genetic analysis using random amplified polimorphic DNA markers. Meth. Enzymol. **218**: 704-740.

Wolff, K. 1996. RAPD analysis of sporting and chimerism in chrysanthenum. Euphytica **89**: 159-164.