

ANALISIS KROMOSOM TANAMAN JATI (*Tectona grandis* Lf) DENGAN METODE PEWARNAAN

Analysis of Teak (Tectona grandis Lf) Chromosome by Staining Method

Arum Sekar Wulandari dan Tofan Randy Wijaya

Departemen Silviculture, Fakultas Kehutanan IPB
Kampus IPB Darmaga, Bogor-16680
rr_arum@yahoo.com

ABSTRACT

Counting the number of chromosomes can be conducted by analysis of chromosomes with chromosome staining. The purpose of this research is to find the right method for staining chromosomes of teak, time of the mitotic phase of teak, and the duration of the mitotic phase of teak. Overall, to get good results, chromosomal analysis is done through four stages in the sequence was (1) the early phase of treatment, (2) stage of fixation, (3) stages of maceration and (4) stage of coloration. In this study, there were seven methods of making preparations applied to the root tip mitosis, chromosomes are stained onion root (method A), modification of maceration (method B), modification without fixation and maceration (method C), modifications time to cut teak root (D method), modification of maceration without fixation (method E), the modification of pre-treatment without fixation and maceration (M method), and storage of the root tip before pre-treatments (method G). Chromosome staining onion roots used as a basic for the staining method is easy to get the correct teak's chromosomes. From this study, analysis of teak's chromosome is known that D chromosome staining method is appropriate because the methods and stages of mitotic chromosomes can be seen, but the number of chromosomes can not be calculated because the size of chromosomes were very small. the best time to cut the teak root at 9:00 to 10:00 am, and the duration of the mitotic phase of teak is ± 1 hour.

Key words : chromosome, chromosome staining method, mitotic, *Tectona grandis*

PENDAHULUAN

Tanaman jati saat ini sudah banyak dibudidayakan, terutama dengan teknik kultur jaringan (Kumari dan Singh 2012). Kultur jaringan tidak hanya teknik untuk memperbanyak tanaman saja, tetapi juga untuk mendapatkan jenis tanaman yang berbeda dengan induknya (Yashoda *et al.* 2005). Dengan teknik poliploid (penggandaan kromosom) (Pereira *et al.* 2014) bisa didapatkan tanaman jati yang ukurannya lebih besar.

Kromosom adalah benang-benang yang terdapat pada inti sel yang berfungsi membawa DNA yang bersifat bawaan dan berisi tentang sebagian besar informasi untuk aktivitas regulasi sel (Francis 2007). Kromosom akan tampak jelas pada sel yang aktif membelah (Zamariola *et al.* 2014). Jumlah kromosom di dalam inti sel dari berbagai organisme berbeda-beda (Chung *et al.* 2012, Draghia *et al.* 2013, Kuo 2013).

Saat ini teknik penggandaan kromosom sudah mulai digunakan pada tanaman jati. Namun hasil seleksinya hanya berdasarkan penampilan fenotipnya saja, masih jarang yang meneliti mengenai perubahan genotip (Narayanan *et al.* 2007). Keberhasilan teknik penggandaan kromosom tanaman jati dapat dibuktikan dengan menghitung jumlah kromosom pada awal dan akhir proses penggandaan kromosom (Bedini *et al.* 2012). Penghitungan jumlah kromosom dapat dilakukan dengan cara analisis kromosom dengan metode

pewarnaan (Kubik *et al.* 2003, She *et al.* 2005, Suman dan Kaur 2013).

Tujuan penelitian ini ialah mencari (1) metode yang tepat untuk pewarnaan kromosom tanaman jati, (2) waktu terjadinya tahap mitosis tanaman jati, dan (3) lamanya tahap mitosis tanaman jati. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah informasi mengenai metode-metode pewarnaan kromosom tanaman kehutanan dan menjadi sumber informasi dalam teknik penggandaan kromosom khususnya untuk tanaman jati.

BAHAN DAN METODE

Persiapan larutan

Larutan 8-hidroksi-quinolin 0.002 M dibuat dengan cara melarutkan 0.3 gram 8-hidroksi-quinolin dalam 1 liter aquades pada suhu 70°C. Kemudian diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* selama 1 jam sampai terlihat warna kekuningan. Larutan disimpan dalam wadah tertutup di dalam lemari es.

Larutan kolkisin 0.1% dibuat dengan cara melarutkan kolkisin 1 gram dalam 1 L aquades. Larutan kemudian disimpan dalam botol pada suhu ruangan.

Aceto orcein 2% dibuat dengan cara melarutkan 1 gram orcein dalam 50 mL asam asetat glasial 45% pada suhu 90°C. Kemudian diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* selama 10 menit. Setelah agak dingin dilakukan filtrasi. Larutan disimpan dalam botol gelap pada suhu ruangan.

Persiapan akar tanaman jati

Ujung akar bibit jati berumur 4 minggu diambil mulai dari pukul 06.00 WIB pagi sampai dengan 05.00 WIB pagi keesokan harinya dengan selang waktu pengambilan setiap 1 jam. Akar dimasukkan ke dalam botol yang berisi larutan 8-hidroksi quinolin 0.002 M dan disimpan dalam lemari pendingin selama 1 jam. Ujung akar yang lain dimasukkan ke dalam botol yang berisi larutan kolkisin 0.1% dan disimpan pada suhu ruangan selama 1 jam (Gunarso 1989).

Metode A

Akar yang telah direndam dalam larutan 8-hidroksi quinolin 0.002 M dan kolkisin 0.1% dicuci dengan air dan direndam dalam asam asetat 45% selama 10 menit. Akar diangkat dan dicuci kembali dengan air. Akar dipanaskan dalam larutan HCl 1N: asam asetat 45% = 3:1 selama 2 menit, kemudian diletakkan dalam cawan petri yang telah ditetesi dengan larutan pewarna orcein. Akar didiamkan selama ± 1 jam setelah itu ujung akar diletakkan di atas *object glass* lalu dipotong dengan ukuran ± 1 mm menggunakan silet, kemudian ditetaskan larutan pewarna orcein lalu ditutup dengan *cover glass*. *Object glass* dilewatkan pada api pembakar bunsen, lalu diketuk dengan pensil dan ditekan dengan ibu jari. Preparat siap diamati di bawah mikroskop.

Metode B

Metode B sama dengan metode A, dengan modifikasi pada tahap maserasi, yaitu waktu pemanasan dalam larutan HCl 1N: asam asetat 45% = 3:1 selama 5 menit, 10 menit, 15 menit, dan 20 menit dengan tujuan untuk melunakkan jaringan akar.

Metode C

Metode C dilakukan tanpa perlakuan fiksasi (perendaman dalam larutan 8-hidroksi quinolin 0.002 M) dan maserasi (perendaman dalam larutan HCl 1 N dan asam asetat 45%). Menurut Gunarso (1989) teknik pewarnaan kromosom menggunakan pewarna orcein dengan sampel ujung akar tanaman dilakukan tanpa

harus perlakuan fiksasi, akan tetapi diperlukan tahap pra-perlakuan. Metode ini dimulai dari membersihkan sampel akar, setelah itu bagian ujung akar dipotong sepanjang 0.5–1 cm. Tahap pra-perlakuan: ujung akar dimasukkan dalam botol berisi kolkisin 0.1%, kemudian disimpan selama 1 jam pada suhu ruangan. Akar dicuci dengan air, kemudian direndam dalam larutan pewarna orcein selama 20 menit pada suhu ± 60 °C. Ujung akar kemudian dipotong sepanjang ± 1 mm, diletakkan pada *object glass*, di atasnya ditambahkan dua tetes *aceto orcein* 2%. Preparat ditutup dengan *cover glass*, setelah itu dilewatkan pada api pembakar bunsen. Preparat selanjutnya diketuk dengan pensil dan ditekan dengan ibu jari. Preparat siap diamati di bawah mikroskop.

Hasil pengamatan metode C, penggunaan larutan kolkisin 0.1% memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan penggunaan larutan 8-hidroksi quinolin 0.002 M sehingga untuk metode D sampai dengan G pada tahap pra-perlakuan hanya digunakan larutan kolkisin 0.1%.

Metode D

Metode D sama dengan metode C, dengan modifikasi waktu pengambilan akar, yaitu pada pukul 09.10, 09.20, 09.30, 09.40, dan 09.50 WIB.

Metode E

Metode E sama dengan metode C, dengan modifikasi pada tahap maserasi, yaitu pemanasan dalam larutan HCl 1N: asam asetat glasial 45% = 3:1 selama 2 menit.

Metode F

Metode F sama dengan metode C, dengan modifikasi pada tahap pra-perlakuan, yaitu perendaman dengan larutan kolkisin selama 3, 6, 12, dan 24 jam.

Metode G

Metode G sama dengan metode C, dengan modifikasi sebelum tahap pra-perlakuan yaitu ujung akar disimpan dalam lemari pendingin selama 1 hari.

Tabel 1 Hasil pengamatan kromosom jati dengan metode A, B, dan C

Metode	Waktu pengambilan akar	Hasil	Keterangan
A	Tiap jam selama 24 jam	Kromosom tidak terlihat Sel tidak pecah	Pra-perlakuan dengan 8-hidroksi quinolin 0.002 M atau kolkisin 0.1% memberikan hasil yang sama
B	Tiap jam selama 24 jam	Kromosom tidak terlihat Sel pecah Tahap maserasi yang tepat ialah dengan perendaman HCl : asam asetat glasial 45% = 3:1 selama 10 menit	Pra-perlakuan dengan 8-hidroksi quinolin 0.002 M atau kolkisin 0.1% memberikan hasil yang sama
C	< Pukul 09.00 WIB	Kromosom tidak terlihat	Sel berwarna merah
	Pukul 09.00 WIB	Kromosom terlihat	Kromosom masih berada dalam tahap profase

Pengamatan kromosom

Setelah mendapatkan preparat morfologi akar dengan kromosom yang baik pada mikroskop, dilakukan pemotretan. Pemotretan dilakukan dengan menggunakan kamera digital dengan perbesaran seratus kali. Setiap objek yang diamati dilakukan pemotretan dua kali. Pemotretan pertama, yaitu fokus pada kamera. Pemotretan kedua, yaitu fokus pada lensa okuler. Hasil pemotretan ini memberikan gambaran kromosom yang lebih jelas. Kromosom diamati secara deskriptif. Pengamatan kromosom dibantu dengan software *Adobe Photoshop*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Metode A

Hasil yang diperoleh dengan menggunakan metode A ialah kromosom tidak terlihat dan terwarnai dengan baik. Hal ini terjadi pada tahap pra-perlakuan dengan 8-hidroksi-quinolin 0.002 M maupun dengan kolkisin 0.1% (Tabel 1). Dari hasil pengamatan, diketahui bahwa sel akar jati lebih kecil dibandingkan dengan sel akar bawang (metode kontrol). Dengan sel yang lebih besar dan jumlah kromosom diploid ($2n = 16$) (Foschi *et al.* 2013) yang lebih sedikit, maka dapat diduga bahwa kromosom bawang merah ukurannya lebih besar dibandingkan dengan kromosom jati. Hal inilah yang diduga menjadi penyebab kromosom tanaman jati tidak

terlihat dengan menggunakan metode pewarnaan kromosom bawang merah (metode A).

Metode B

Hasil yang diperoleh dengan menggunakan metode B ialah tahap maserasi yang baik dengan perendaman selama 10 menit karena sel akar pecah dan menyebar sangat baik, tetapi kromosom masih belum terlihat (Tabel 1). Hal ini mungkin disebabkan oleh (1) lamanya perendaman dalam larutan pra-perlakuan, (2) terlalu cepatnya proses fiksasi, (3) tahap maserasi yang terlalu lama, (4) tahap pewarnaan yang terlalu cepat, dan (5) kurang tepatnya konsentrasi bahan kimia yang digunakan.

Metode C

Hasil yang diperoleh dengan menggunakan metode C ialah kromosom terlihat, namun masih sulit dilakukan penghitungan jumlah kromosom karena kromosom sangat kecil dan masih berada pada tahap profase (Tabel 1). Waktu pengambilan sampel terbaik yang diperoleh untuk pengambilan sampel akar jati ialah pukul 09.00 WIB karena pada waktu ini kromosom dapat terlihat. Pada sel-sel organisme multiseluler, proses pembelahan sel memiliki tahap-tahap tertentu yang disebut siklus sel (Francis 2007). Berdasarkan informasi tersebut dapat diketahui bahwa tahap mitosis untuk tanaman jati dimulai sekitar jam 9 pagi dan lamanya tahap mitosis tanaman jati sekitar 1 jam.

Tabel 2 Hasil pengamatan kromosom jati dengan metode D, E, dan G

Metode	Waktu pengambilan akar	Hasil	Keterangan
	Pukul 09.10 WIB	Kromosom terlihat	Sel berwarna merah Kromosom yang terlihat sangat kecil dan masih berada dalam tahap profase
	Pukul 09.20 WIB	Kromosom terlihat	Sel berwarna merah Kromosom yang terlihat sangat kecil dan masih berada dalam tahap profase
D	Pukul 09.30 WIB	Kromosom terlihat	Sel berwarna merah Kromosom yang terlihat sangat kecil dan masih berada dalam tahap profase
	Pukul 09.40 WIB	Kromosom terlihat	Sel berwarna merah Kromosom yang terlihat sangat kecil dan masih berada dalam tahap profase dan tampak buram
	Pukul 09.50 WIB	Kromosom terlihat dan tampak buram	Sel berwarna merah Kromosom yang terlihat sangat kecil dan masih berada dalam tahap profase dan tampak buram
E	Pukul 09.00–10.00 WIB	Kromosom tidak terlihat	Sel berwarna merah muda Ada bercak menyerupai kromosom di tengah-tengah sel Diduga kromosom rusak pada saat tahap maserasi
G	Pukul 09.00 WIB	Kromosom tidak terlihat Sel berwarna merah muda	Sel tidak berada pada kondisi yang sama seperti waktu pengambilan akar.

Tabel 3 Hasil pengamatan kromosom jati dengan metode F

Metode	Waktu pengambilan akar	Lama perendaman dalam kolkisin 0.1%	Hasil	Keterangan
F	09.00 WIB	3 jam	Kromosom terlihat	Sel berwarna merah muda Kromosom yang terlihat sangat kecil dan masih berada dalam tahap profase
	09.00 WIB	6 jam	Kromosom tidak terlihat	Sel berwarna merah muda Ada bercak menyerupai kromosom di tengah-tengah sel Diduga kromosom rusak
	09.00 WIB	12 jam	Kromosom tidak terlihat	Sel berwarna merah muda Ada bercak menyerupai kromosom di tengah-tengah sel Diduga kromosom rusak
	09.00 WIB	24 jam	Kromosom tidak terlihat	Sel berwarna merah muda Ada bercak menyerupai kromosom di tengah-tengah sel Diduga kromosom rusak

Metode D

Hasil yang diperoleh dengan menggunakan metode ini sama seperti metode C, yaitu tidak ditemukannya kromosom yang berada pada tahap metafase (Tabel 2). Hal ini disebabkan tidak tepatnya waktu pemotongan akar jati yang digunakan untuk membuat slide preparat kromosom. Menurut Zheng *et al.* (2014) tahap metafase hanya terjadi dalam waktu yang singkat (1–2 menit).

Metode E

Sel-sel pada metode E terlihat lebih jernih dibandingkan dengan sel-sel pada metode C karena pengaruh dari tahap maserasi (Tabel 2). Tahap maserasi adalah tahap melunakkan jaringan akar sehingga sel menjadi lebih mudah lepas, dan sitoplasma lebih jernih dari komponen-komponen sel yang tidak dikehendaki. Pelaksanaan tahap maserasi yang kurang tepat dapat mengakibatkan terjadinya kerusakan sel (Chirino *et al.* 2014) dan penundaan waktu mitosis (Gudowska-Nowak *et al.* 2005).

Metode F

Kromosom yang terlihat pada metode F masih berada dalam tahap profase (Tabel 3). Hal ini diduga disebabkan oleh (1) waktu pengambilan akar yang kurang tepat, dan (2) lama perendaman akar dalam kolkisin 0.01% yang kurang optimal. Pada beberapa jenis tanaman, waktu pengambilan akar yang tepat sangat diperlukan untuk memperoleh kondisi kromosom berada pada tahap metafase, karena sedikitnya waktu yang dibutuhkan sel untuk melakukan tahap metafase. Contohnya pada tanaman *Halodule* sp. (Kuo 2013).

Belum ada standar untuk tingkat konsentrasi kolkisin yang digunakan, dan lamanya waktu perendaman. Pada umumnya kolkisin akan bekerja dengan efektif pada konsentrasi rendah, yaitu pada kisaran konsentrasi 0.001%–1.00%, dengan lama perendaman 3–24 jam (Suryo 1995). Draghia *et al.* (2013) menggunakan kolkisin dengan konsentrasi 0.5% selama 30 menit untuk preparasi kromosom *Allium* spp. dan *Silene* spp, sedangkan Foschi *et al.* (2013) menggunakan kolkisin dengan konsentrasi 625–1250 μ M selama 24–48 jam untuk preparasi kromosom

Allium cepa L. Pereira *et al.* (2014) menggunakan kolkisin dengan konsentrasi 0.1–0.5% dengan lama perendaman 1.5–24 jam untuk preparasi kromosom *Lolium multiflorum* Lam.

Metode G

Hasil yang diperoleh dengan menggunakan metode G sama dengan metode B. Sel berwarna merah muda dan tidak terlihat ada bercak kromosom (Tabel 2). Hal ini diduga disebabkan perendaman akar dalam kolkisin selama 1 hari yang dilakukan dalam lemari pendingin (suhu ± 4 °C), menyebabkan kolkisin tidak dapat bekerja dengan baik untuk melunakkan jaringan akar. Perendaman yang dilakukan di dalam lemari pendingin biasanya dilakukan untuk tahap maserasi yang menggunakan larutan HCl 1N dan asam asetat 45% (Draghia *et al.* 2013); sedangkan yang menggunakan kolkisin, perendaman dilakukan pada suhu ruangan (Foschi *et al.* 2013).

Kromosom Jati

Upaya perakitan bibit unggul dapat dilakukan melalui kegiatan pemuliaan pohon. Faktor penentu keberhasilan program perakitan bibit unggul, salah satunya adalah tersedianya keragaman genetik. Teknik yang biasanya digunakan untuk menghasilkan keragaman genetik ialah poliploidisasi (Foschi *et al.* 2013), dan mutasi (Mao *et al.* 2005). Beberapa metode dapat digunakan untuk menganalisis keragaman genetik yang dihasilkan, salah satunya dengan analisis berdasarkan susunan kromosom (Bedini *et al.* 2012). Temuan-temuan baru di bidang sitogenetika dapat berguna untuk mendukung program pemuliaan tanaman, baik secara tidak langsung yaitu berupa peningkatan pengetahuan susunan genetik suatu jenis tanaman (Cai dan Zhang 2014, Pranci *et al.* 2014) maupun secara langsung yang berupa penerapan teknik sitogenetika untuk perbaikan sifat tanaman (Orhan *et al.* 2010, Peruzzi 2012).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari keenam metode pewarnaan yang digunakan, hanya metode C yang menghasilkan gambaran kromosom yang terlihat jelas, walaupun jumlah kromosom tanaman jati yang

dihasilkan belum dapat dihitung karena berukuran sangat kecil. Jumlah kromosom ($2n$) setiap makhluk hidup berbeda-beda, tidak bergantung pada ukuran genom (Chung *et al.* 2012). Tanaman jati mempunyai jumlah kromosom yaitu $2n = 36$ (Fofana *et al.* 2008). Perubahan jumlah kromosom organisme biasanya dihasilkan dari mutasi genom. Jumlahnya bisa bertambah, melalui proses poliploidi, yang merupakan fenomena penting dalam evolusi vaskular tanaman (Bedini *et al.* 2012). Jumlah kromosom juga dapat berkurang karena terjadinya beberapa kali translokasi (da Silva *et al.* 2005). Kromosom juga dapat rusak karena radiasi yang dapat menyebabkan tertundanya proses mitosis (Gudowska-Nowak *et al.* 2005).

Kromosom yang dihasilkan pada penelitian ini masih berada pada tahap profase. Profase merupakan tahap paling lama dalam mitosis. Pada proses awal, kromosom mulai tampak lebih pendek dan menebal. Selanjutnya, pada sel tumbuhan, benang-benang spindle (mikrotubul) terbentuk tanpa terikat pada sentriol (Mao *et al.* 2005). Mikrotubul ini berkontribusi dalam menentukan posisi poros profase bipolar, dan orientasinya (Ambrose dan Cyr 2008). Pada tahap profase akhir, masing-masing kromosom terlihat terdiri dari dua kromatid yang terikat pada sentromer. Selanjutnya, nukleolus hilang dan membran nukleus hancur. Pada tahap ini kromosom terletak bebas di dalam sitoplasma (Zamariola *et al.* 2014).

KESIMPULAN

Metode pewarnaan kromosom tanaman jati yang tepat ialah metode C karena dengan metode ini kromosom dapat dilihat tetapi jumlah kromosom tanaman jati masih belum bisa dihitung karena kromosom masih berada pada tahap profase. Waktu pengambilan sampel terbaik yang diperoleh untuk pengambilan sampel akar jati ialah pada pukul 09.00 WIB, dan lamanya tahap mitosis tanaman jati \pm 1jam.

DAFTAR PUSTAKA

- Ambrose JC, Cyra R. 2008. Mitotic spindle organization by the preprophase band mitotic spindle organization by the preprophase. *Molecular Plant* 1(6): 950–960.
- Bedini G, Garbari F, Peruzzi L. 2012. Does chromosome number count? Mapping karyological knowledge on Italian flora in a phylogenetic framework. *Plant Syst Evol* (2012) 298:739–750. DOI 10.1007/s00606-011-0585-1.
- Cai J, Zhang G. 2014. The novel methods of development of the maintainer and cytoplasmic male sterile lines with different cytoplasm based on chromosome single-segment substitution lines in rice. *Turk J Agric For.* 38:441-446. doi:10.3906/tar-1308-75.
- Chirino MG, Rossi LF, Bressa MJ, Luaces JP Merani MS. 2014. Dipteran chromosomes: a simple method for obtaining high quality chromosomal preparations. *Current Science* 107:1792-1794.
- Chung K, Hipp AL, Roalson EH. 2012. Chromosome number evolves independently of genome size in a clade with non localized centromeres (*Carex*: Cyperaceae). *Evolution* 66(9):2708-2722. doi:10.1111/j.1558.5646.2012.01624.x.
- da Silva CRM, González-Elizondo MS, Vanzela ALL. 2005. Reduction of chromosome number in *Eleocharis-subarticulata* (Cyperaceae) by multiple translocations. *Botanical Journal of the Linnean Society* 149:457–464.
- Draghia L, Chelariu EL, Sîrbu C, Brânză M, Sandu Miculschi C. 2013. Analysis of chromosome number in some *Allium* and *Silene* wild species with ornamental use. *Not Bot Horti Agrobo* 41 (1):294-300.
- Fofana IJ, Lidah YJ, Diarrassouba N, N'guetta SPA, Sangare A, Verhaegen D. 2008. Genetic structure and conservation of Teak (*Tectona grandis*) plantations in Côte d'Ivoire, revealed by site specific recombinase (SSR). *Tropical Conservation Science* 1(3):279-292.
- Foschi ML, Martínez LE, Ponce MT, Galmarini CR, Bohanec B. 2013. Effect of colchicine and amiprofos-methyl on the production of *in vitro* doubled haploid onion plants and correlation assessment between ploidy level and stomatal size. *Rev FCA UNCUIYO* 45(2):155-164.
- Francis D. 2007. The plant cell cycle-15 years on. *New Phytologist* 174:261–278. doi 10.1111/j.1469-8137.2007.02038.x.
- Gudowska-Nowak E, Kleczkowski A, Nasonova E, Scholz M, Ritter S. 2005. Correlation between mitotic delay and aberration burden, and their role for the analysis of chromosomal damage. *Int J Radiat Biol.* 81(1): 23-32.
- Gunarso W. 1989. *Mikroteknik*. Bogor: Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Ilmu Hayat Institut Pertanian Bogor.
- Mao G, Chan J, Calder G, Doonan JH, Lloyd CW. 2005. Modulated targeting of GFP-AtMAP65-1 to central spindle microtubules during division. *The Plant Journal* 43:469–478. doi: 10.1111/j. 1365-313X.2005.02464.x.
- Narayanan C, Wali SA, Shukla N, Kumar R, Mandal AK, Ansari SA. 2007. RAPD and ISSR markers for molecular characterization of teak (*Tectona grandis*) plus trees. *Journal of Tropical Forest Science* 19(4):218–225.
- Orhan I, Demirci B, Omar I, Siddiqui H, Kaya E, Choudhary MI. 2010. Essential oil compositions and antioxidant properties of the roots of twelve Anatolian *Paeonia* taxa with special reference to chromosome counts. *Pharmaceutical Biology* 48(1):10–16.
- Kubik TJ, Hawkins GP, Stringam GR. 2003. A modified mordant technique for staining plant chromosomes. *Genome* 46:527-528. doi: 10.1139/G03-021.
- Kumari S, Singh N. 2012. Multiplication of desert teak *Tecomella undulata* under in vitro conditions. *J Trop Med Plants* 13(2):137-143.

- Kuo J. 2013. Chromosome numbers of the Australian Cymodoceaceae. *Plant Syst Evol.* 299:1443–1448.
- Prancl J, Kaplan Z, Travnicek P, Jarolimova V. 2014. Genome size as a key to evolutionary complex aquatic plants: polyploidy and hybridization in *Callitriche* (Plantaginaceae). *Plos One* 9(9):1-16.
- Pereira RC, Ferreira MTM, Davide LC, Pasqual M, Mittelmann A, Techio VH. 2014. Chromosome duplication in *Lolium multiflorum* Lam. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 14:251-255.
- Peruzzi L, Góralski G, Joachimiak AJ, Bedini G. 2012. Does actually mean chromosome number increase with latitude in vascular plants? An answer from the comparison of Italian, Slovak and Polish floras. *CompCytogen* 6(4): 371–377. doi: 10.3897/CompCytogen. v6i4.3955.
- She CW, Liu JY, Song YC. 2005. CPD staining: an effective technique for detection of NORs and other GC-rich chromosomal regions in plants. *Bio-technic Histochemistry* 81(1): 13-21. doi:10.1080/10520290600661414.
- Suman V, Kaur H. 2013. First report on C-banding, fluorochrome staining and NOR location in holocentric chromosomes of *Elasmolomus (Aphanus) sor-didus* Fabricius, 1787 (Heteroptera, Rhyparochromidae). *ZooKeys* 319: 283–291. doi: 10.3897/zookeys.319.4265.
- Suryo. 1995. *Sitogenetika*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Yasodha R, Sumathi R, Gurumurthi K. 2005. Improved micropropagation methods for teak. *Journal of Tropical Forest Science* 17(1):63-75.
- Zamariola L, Tiang CL, De_Storme N, Pawlowski W, Geelen D. 2014. Chromosome segregation in plant meiosis. *Plant Science* 5:1-20.
- Zheng J, Sun C, Zhang S, Hou X. 2014. Karyotype of mitotic metaphase and meiotic diakinesis in non-heading Chi-nese cabbage. *Plant Syst Evol.* 300:295–302. DOI 10.1007/s00606-013-0882-y.