

PROLIFERASI TUNAS STROBERI SECARA *IN VITRO* MENGUNAKAN EKSPLAN BATANG PLANLET HASIL KULTUR MERISTEM

IN VITRO SHOOT PROLIFERATION OF STRAWBERRY USING STEM PLANTLET EXPLANT DERIVED FROM MERISTEM CULTURE

Ahmad Syahrian Siregar

Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika
Jln. Raya Tlekung No.1 Junrejo, Batu, Jawa Timur
Pos-el: rian_unpad@yahoo.com

ABSTRACT

The fruit of strawberry contain phenolic compounds of vitamin C, B1, and B2 which is beneficial for health. The successful of strawberry micropropagation depending on the ability of explants to produce large number of plantlets in short time. In order to increase the number of plantlets by organogenesis the use of plantlet stems as explants need to be optimized. The aim of this research was to investigate the potential of stem plantlet explants on the shoot proliferation of strawberry using 8 medium treatments. Research was conducted in the Plant Breeding Laboratory at Citrus Research Centre and Subtropical Fruit Indonesia, started from February to September 2011. The results showed that explant from stem of plantlet from meristem culture of strawberry could be used as initial material to proliferate strawberry plantlet. High number of plantlet (5.73) was produced on MS medium containing combination of plant growth regulator BAP and NAA at concentration of 0.5 mg/l and 0.025 mg/, respectively.

Keywords: proliferation, strawberry stem plantlet, 6-Benzylaminopurine, 1- Naphthaleneacetic acid, meristem culture.

ABSTRAK

Stroberi (*Fragaria x ananassa*) merupakan tanaman buah yang banyak mengandung senyawa fenolik dan vitamin C, B1, B2, yang bermanfaat bagi kesehatan. Keberhasilan perbanyakan tanaman secara kultur *in vitro* stroberi bergantung pada kemampuan regenerasi eksplan dalam menghasilkan planlet dalam jumlah banyak. Untuk meningkatkan jumlah planlet secara organogenesis, penggunaan eksplan batang planlet stroberi *in vitro* sebagai bahan inisiasi awal perlu dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan proliferasi batang planlet stroberi sebagai bahan eksplan untuk perbanyakan tunas. Batang planlet stroberi yang berasal dari kultur meristem ditanam pada media MS dengan delapan jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh sebagai perlakuan. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Pemuliaan Tanaman, Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika, pada bulan Februari–September 2011. Hasil penelitian menunjukkan bahwa eksplan batang planlet stroberi dari kultur meristem dapat dijadikan sebagai bahan untuk perbanyakan. Media yang paling banyak menghasilkan planlet dan mempunyai vigor tinggi adalah media MS yang mengandung kombinasi BAP dan NAA dengan konsentrasi 0,5 dan 0,025 mg/l dengan jumlah planlet sebanyak 5,73.

Kata kunci: proliferasi, batang planlet stroberi, 6-Benzylaminopurine, 1- Naphthaleneacetic acid, kultur meristem.

PENDAHULUAN

Stroberi (*Fragaria x ananassa*) merupakan tanaman buah dataran tinggi yang banyak digemari selain buah hortikultura lainnya seperti jeruk dan apel. Buah stroberi banyak mengandung senyawa fenolik dan vitamin C, B1, dan B2, yang bermanfaat bagi kesehatan.¹ Stroberi dapat ditumbuhkan pada rentang geografis yang luas dari daerah arktika hingga daerah tropis,² sehingga termasuk tanaman buah yang dapat ditumbuhkembangkan di Indonesia. Pada pertengahan tahun 1990-an, tanaman ini mulai dikenal dan dibudidayakan oleh petani Indonesia, khususnya oleh petani di Rancabali, Ciwidey, Kabupaten Bandung, Jawa Barat. Setelah itu tanaman stroberi mulai dikembangkan pula di beberapa daerah lain di antaranya di Jawa Tengah, yaitu di sentra pertanian Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Batu (Jawa Timur), dan Bedugul (Bali). Seiring dengan pertumbuhan dan perkembangan luas pertanaman stroberi di Indonesia, dibutuhkan jumlah bibit stroberi yang cukup untuk memenuhi kebutuhan pasar.

Tanaman stroberi rentan terhadap penyakit virus yaitu *Strawberry mottle virus* (SMoV), *Strawberry Mild Yellow Edge Virus* (SMYEV), *Strawberry Crinkle Virus* (SCV), dan *Strawberry Ven Binding Virus* (SVBV) yang menjadi penyebab utama penurunan hasil panen. Penyediaan benih stroberi selama ini dilakukan secara konvensional dengan menggunakan stolon. Kelemahannya adalah tanaman yang diperoleh dari hasil perbanyakan relatif lebih sedikit jumlahnya dan belum terjamin bebas penyakit terutama karena infeksi oleh virus secara sistemik, yang ditularkan dari tanaman induk, sehingga kualitas benih hasil dari stolon mengalami penurunan setelah tiga periode penanaman.³ Untuk memenuhi kebutuhan benih stroberi yang bebas penyakit sekaligus menghindari penyebaran patogen, aplikasi teknik kultur jaringan telah dilakukan.

Proliferasi tunas stroberi *in vitro* dengan menggunakan meristem sebagai bahan inisiasi telah banyak dilakukan oleh peneliti di berbagai negara yang tujuannya adalah menghasilkan tanaman stroberi bebas dari patogen bawaan.^{4,5} Meristem merupakan bagian tanaman yang sel-selnya sangat aktif dan cepat membelah sehingga virus yang laju replikasinya lebih lambat tidak dapat mencapai meristem.¹⁹ Media dasar yang

umum digunakan untuk kultur meristem adalah media Murashige dan Skoog (MS)⁶ yang biasanya ditambah dengan beberapa kombinasi zat pengatur tumbuh (ZPT). Beberapa kombinasi penggunaan zat pengatur tumbuh yang biasa diaplikasikan pada stroberi di antaranya 1-6-Benzylaminopurine (BAP) dengan Naphthaleneacetic acid (NAA).^{7,8,9}

Apabila perbandingan antara konsentrasi sitokinin dan auksin tidak berimbang, setiap varietas tanaman mempunyai kebutuhan yang berbeda, hasil yang diperolehnya pun akan tidak sesuai dengan harapan dalam hal proses untuk mendapatkan planlet secara langsung.¹⁰ Eksplan yang diberi perlakuan konsentrasi sitokinin yang lebih besar daripada auksin maka tunas akan terinduksi, dan sebaliknya apabila konsentrasi auksin lebih tinggi, akan menginduksi pertumbuhan akar ataupun kalus.^{11,12} Apabila konsentrasi sitokinin dan auksin berimbang, akan mendapatkan planlet dari eksplan secara cepat.¹³

Bagian-bagian tanaman (eksplan) yang dapat digunakan untuk proliferasi tunas berdasarkan hasil penelitian Sorvari *et al.*,¹⁴ Lopez-Aranda *et al.*,¹⁵ dan Husaini *et al.*¹⁶ adalah daun serta tangkai daun oleh Green *et al.*¹⁷ dan Kausal *et al.*¹⁸ Akan tetapi, batang planlet sebagai bahan eksplan masih belum banyak dimanfaatkan untuk proliferasi kultur *in vitro* meristem dalam upaya meningkatkan jumlah planlet.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan media proliferasi tunas yang optimal dalam menghasilkan jumlah planlet menggunakan kombinasi zat pengatur tumbuh BAP dan NAA dengan eksplan batang planlet stroberi hasil dari kultur meristem stroberi.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan di laboratorium kultur jaringan, Laboratorium Terpadu, Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika (Balitjestro), Tlekung, pada bulan Februari–September 2011. Meristem stroberi yang digunakan berasal dari stolon tanaman dewasa kultivar lokal, festival, yang berasal dari Ciwidey Jawa Barat yang telah ditanam di kebun plasma nutfah Balitjestro. Ujung stolon yang telah dipotong direndam dalam air mengalir selama 30 menit kemudian direndam dalam larutan fungisida (Benlate) sebanyak 1 g/l

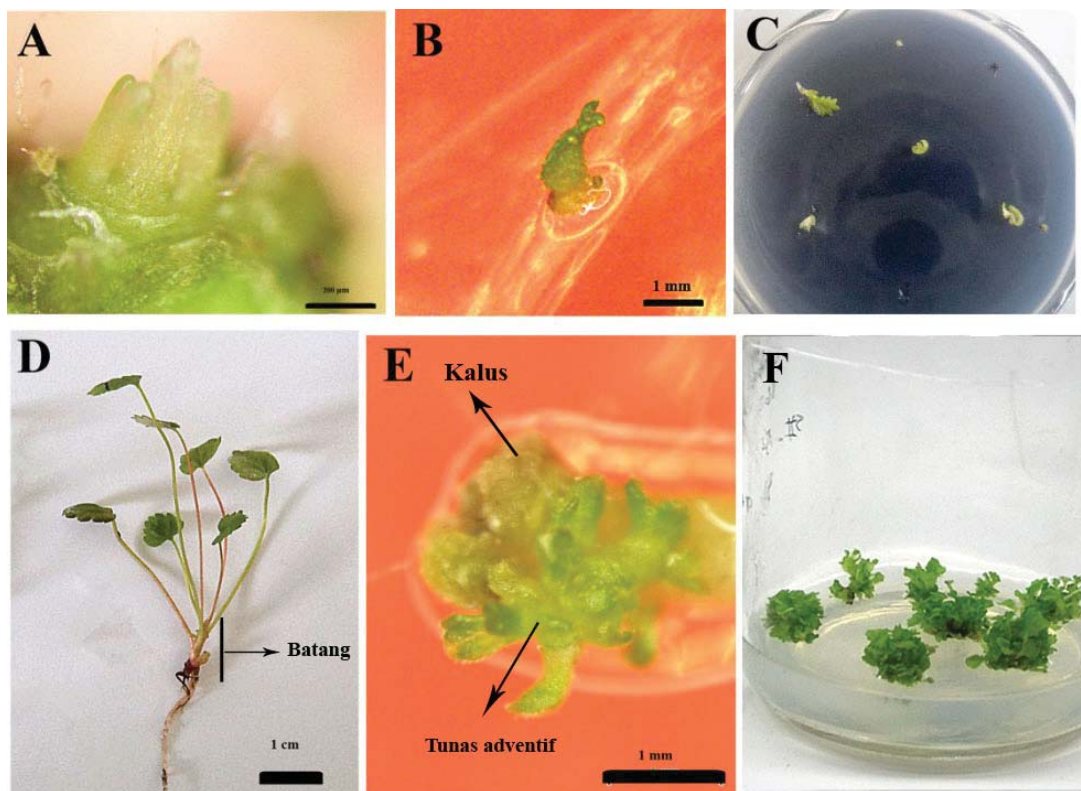
selama satu jam. Setelah itu, stolon disterilisasi dengan larutan sodium hipoklorit sebanyak 10% dan 5% berturut turut selama 5 dan 15 menit, dilanjutkan dengan perlakuan perendaman antibiotik (Rifamfisin) 10 mg/l selama satu jam. Setelah itu eksplan dibilas dengan menggunakan akuades steril sebanyak tiga kali. Tiap-tiap langkah tersebut dilaksanakan di dalam *laminar air flow cabinet*, kemudian meristem yang terdiri atas apikal dome dengan dua daun primordia diambil dari ujung stolon dengan menggunakan scalpel di bawah stereo mikroskop. Meristem kemudian ditanam pada media MS tanpa ZPT (MS0) dengan penambahan 1 g/l arang aktif.

Selanjutnya meristem dibesarkan pada media dasar MS0 selama empat bulan sampai tinggi batang planlet stroberi mencapai ukuran 1 cm. Batang planlet kemudian dijadikan sebagai bahan untuk proliferasi tunas. Daun, akar, dan petiol dibuang kemudian batang tersebut dipotong sepanjang 0,2 cm dan ditanam pada media per-

lakuan yaitu MS yang ditambahkan BAP (1,0 dan 0,5 mg/l) dan NAA (0,1, 0,05, dan 0,025 mg/l). Untuk tiap media perlakuan ditanam 8 batang eksplan dengan tiga ulangan. Pengamatan jumlah tunas adventif yang muncul serta pertumbuhan kalus yang terjadi dilakukan pada umur enam minggu setelah tanam. Untuk pertumbuhan kalus dilakukan scoring, yaitu tumbuh 1 cm (++), tumbuh 0,2–0,8 cm (+) dan tidak tumbuh kalus (-).

Setelah itu eksplan batang planlet yang berasal dari tiap-tiap media perlakuan ditanam pada media dasar MS0 untuk dibesarkan. Setelah planlet berumur 16 minggu dilakukan pengukuran terhadap diameter batang, jumlah daun, jumlah planlet, tinggi tanaman, jumlah akar, dan panjang akar. Data yang diperoleh dirata-ratakan untuk diuji beda nyata dengan menggunakan Duncan's Multiple Range Test (DMRT) menggunakan program perangkat lunak SAS.

HASIL DAN PEMBAHASAN



Gambar 1 (A) Meristem ujung stolon stroberi; (B,C) Meristem ujung stroberi yang ditumbuhkan pada media MS0 ditambah arang aktif 1 g/l tiga minggu setelah tanam; (D) Planlet stroberi hasil kultur meristem yang digunakan sebagai sumber eksplan batang 16 minggu setelah tanam; (E) Eksplan yang mengalami pertumbuhan tunas adventif dan kalus; (F) Tunas adventif yang tumbuh pada eksplan batang enam minggu setelah tanam pada media MS + BAP 0,5 mg/l dan NAA 0,025 mg/l.

Meristem ujung stroberi yang ditanam pada media MS0 yang ditambahkan arang aktif 1 g/l dapat tumbuh dengan baik (Gambar 1A, B, dan C). Menurut George *et al.*,²⁰ penambahan arang aktif pada media pertumbuhan dapat menyerap senyawa fenolik yang dikeluarkan dari eksplan meristem sehingga gejala *browning* dapat dihindari, kemudian meristem dapat tumbuh secara normal. Meristem yang tumbuh tersebut dapat menjadi planlet dengan ukuran batang mencapai 1 cm setelah ditanam pada media MS0 selama 4 bulan seperti terlihat pada Gambar 1D yang kemudian dijadikan sebagai sumber eksplan untuk diambil bagian batangnya. Tahap awal inisiasi eksplan batang planlet stroberi untuk setiap media perlakuan semuanya menunjukkan adanya perkembangan, tetapi pola perkembangannya berbeda. Pada beberapa perlakuan terdapat kalus yang disertai juga dengan pertumbuhan tunas adventif (Gambar 1E) tetapi pada media perlakuan lainnya hanya menghasilkan tunas adventif (Gambar F). Dari hasil penelitian yang dilakukan oleh Haddahi *et al.*,¹³ penggunaan zat pengatur tumbuh BAP dan NAA pada media proliferasi dapat menyebabkan eksplan mengalami pertumbuhan tunas dan disertai oleh pertumbuhan kalus.

Tabel 1 menunjukkan bahwa jumlah tunas adventif yang paling banyak diperoleh pada media perlakuan BAP konsentrasi 1,0 mg/l dan NAA 0,025 mg/l serta BAP 1,0 mg/l. Pertumbuhan kalus teramati pada media perlakuan BAP 1—0,5 mg/l dan NAA 0,1—0,05 mg/l. Berdasarkan pengamatan pada eksplan batang planlet yang

mengalami perkembangan, perlakuan ZPT NAA dengan konsentrasi yang lebih tinggi dari 0,025 mg/l dapat menyebabkan terjadinya pertumbuhan kalus. Menurut Mohajer *et al.*,²³ eksplan stroberi yang dikulturkan pada zat pengatur tumbuh NAA dengan konsentrasi yang tinggi dapat menyebabkan terjadinya pertumbuhan kalus.

Selanjutnya eksplan batang planlet stroberi yang telah diinduksi di setiap media perlakuan ditanam pada media dasar MS0 untuk dibiakkan. Tabel 2 menunjukkan bahwa jumlah planlet terbanyak dihasilkan oleh media yang berasal dari perlakuan BAP 0,5 mg/l dan NAA 0,025 mg/l yang tidak berbeda nyata dari jumlah planlet yang berasal dari media perlakuan BAP 0,5 mg/l. Diameter batang paling besar didapat pada planlet yang berasal dari media perlakuan BAP 0,5 mg/l dan NAA 0,025 mg/l. Tinggi tanaman tertinggi didapat dari planlet yang berasal dari media perlakuan BAP 0,5 mg/l dan NAA 0,025 mg/l. Jumlah daun terbanyak didapat dari planlet yang berasal dari media perlakuan BAP 0,5 mg/l dan NAA 0,025 mg/l dengan konsentrasi dan yang tidak berbeda nyata dari jumlah daun planlet yang berasal dari media perlakuan BAP dan NAA dengan konsentrasi 1,0 mg/l dan 0,025 mg/l serta BAP dengan konsentrasi 0,5 mg/l. Jumlah akar terbanyak didapat dari planlet yang berasal dari media perlakuan BAP 0,5 mg/l dan NAA 0,025 mg/l. Panjang akar berbeda nyata pada eksplan yang berasal dari media perlakuan BAP 0,5 mg/l dan NAA 0,025 mg/l.

Tabel 1. Jumlah tunas adventif dan pembentukan kalus eksplan batang planlet stroberi pada media perlakuan inisiasi awal 6 minggu setelah tanam.

No.	ZPT		Jumlah Tunas Adventif	Kalus
	BAP (mg/l)	NAA (mg/l)		
1	1,0	0,1	2,93 e	++
2	1,0	0,05	4,53 c	+
3	1,0	0,025	8,93 a	-
4	0,5	0,1	1,67 f	++
5	0,5	0,05	3,73 d	+
6	0,5	0,025	6,20 b	-
7	1,0	0	9,53 a	-
8	0,5	0	5,93 b	-

Keterangan: Huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata pada uji DMRT dengan taraf 0,05.

Eksplan yang berasal dari media perlakuan BAP 0,5 mg/l dan NAA 0,025 mg/l menunjukkan hasil yang berbeda nyata dengan perlakuan lainnya untuk semua parameter pengamatan. Jumlah planlet yang dihasilkan lebih banyak dan mempunyai vigor yang lebih baik yang ditandai dengan jumlah perakaran yang banyak, diameter planlet yang lebih besar, dan tinggi tanaman yang tumbuh lebih cepat. Hal tersebut disebabkan akar dapat terinduksi dengan baik oleh zat pengatur tumbuh NAA dengan konsentrasi yang lebih rendah (0,025 mg/l). Dengan NAA yang dapat terinvestasikan dengan baik di dalam sel maka pada tahap perkembangan selanjutnya tidak diperlukan penambahan NAA dengan konsentrasi tinggi ataupun tanpa NAA. Planlet dapat terekspresikan menjadi akar ketika ditanam pada media tanpa ZPT. Dengan pertumbuhan akar yang cepat, penyerapan nutrisi pada media dapat terjadi secara optimal sehingga mendukung pertumbuhan optimal planlet.²⁰

Tabel 2 menunjukkan bahwa jumlah planlet yang berasal dari perlakuan BAP 0,5 mg/l lebih banyak daripada BAP 1 mg/l. Hal ini menunjukkan bahwa ketika tunas adventif yang terbentuk tidak terlalu banyak, penyerapan nutrisi oleh tunas-tunas adventif lebih efektif sehingga tunas-tunas adventif tersebut tumbuh dengan lebih cepat karena persaingan dalam penyerapan nutrisi pada media lebih rendah apabila dibandingkan dengan tunas-tunas adventif yang rapat.²⁰

Jumlah planlet yang dihasilkan pada perlakuan dengan kombinasi BAP 1—0,5 mg/l dan NAA 0,1—0,5 mg/l lebih rendah dibandingkan dengan BAP 1—0,5 mg/l BAP dan NAA 0,025 mg/l (tidak mengalami pertumbuhan kalus). Pertumbuhan planlet yang cepat dapat terjadi karena pada tahap inisiasi awal eksplan batang planlet stroberi tidak mengalami pertumbuhan kalus, sehingga tunas-tunas adventif yang terbentuk dapat tumbuh secara optimal dan berkembang menjadi planlet dengan baik. Pertumbuhan kalus dapat menghalangi penyerapan nutrisi pada media sehingga tunas-tunas adventif tidak dapat berkembang secara optimal.²⁰

Ko *et al.*²¹ menggunakan eksplan sepal, petiol, dan daun stroberi mendapatkan jumlah planlet optimal sekitar empat tanaman untuk tiap eksplan lebih sedikit jika dibandingkan dengan eksplan hasil penelitian ini. Dengan demikian, eksplan batang stroberi lebih berpotensi membentuk tunas majemuk dibandingkan dengan sepal, petiol, dan helai daun.

Debnath²² menggunakan eksplan ujung batang mendapatkan jumlah planlet optimal sekitar 14, lebih banyak dibandingkan dengan eksplan batang hasil penelitian ini. Akan tetapi, jumlah ujung batang yang didapatkan untuk tiap planlet terbatas, yaitu hanya satu untuk tiap planlet sedangkan eksplan batang planlet pada penelitian ini berjumlah lebih banyak yaitu lebih

Tabel 2 Respons pertumbuhan batang planlet stroberi pada media dasar MS0 yang berumur 16 minggu setelah tanam.

No.	Asal Media dengan ZPT		Jumlah Planlet	Diameter Batang (mm)	Tinggi Tanaman (cm)	Jumlah Daun	Jumlah Akar	Panjang Akar (cm)
	BAP (mg/l)	NAA (mg/l)						
1*	1,0	0,1	1,47 e	0,45 e	1,85 f	2,00 e	1,23 e	2,80 c
2*	1,0	0,05	2,73 d	0,64 d	2,65 c	2,87 d	2,03 d	4,13 b
3	1,0	0,025	4,80 bc	0,95 c	3,32 c	5,60 b	2,87 c	5,13 a
4*	0,5	0,1	1,27 e	0,64 d	2,23 e	1,80 e	1,43 e	2,87 c
5*	0,5	0,05	3,20 d	0,93 c	3,77 b	4,07c	2,79 c	3,60 b
6	0,5	0,025	5,73 a	1,42 a	4,67 a	6,40 a	3,71 a	5,47 a
7	1,0	0	4,47 c	1,00 c	3,36 c	2,93 d	2,93 c	3,87 b
8	0,5	0	5,27 ab	1,18 b	4,03 b	3,20 d	3,49 b	4,87 a

Keterangan: Huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata pada uji DMRT dengan taraf 0,05. * Tunas yang mengandung kalus

dari empat eksplan per batang. Dengan demikian, penelitian ini berpotensi menghasilkan jumlah planlet sebanyak 22 planlet.

KESIMPULAN

Proliferasi tunas menggunakan eksplan batang planlet stroberi dipengaruhi oleh pengaturan kombinasi zat pengatur tumbuh BAP dan NAA, kombinasi yang terbaik adalah konsentrasi BAP 0,5 mg/l dan NAA 0,025 mg/l. Keberhasilan tunas adventif dalam membentuk planlet pada media MS tanpa zat pengatur tumbuh dipengaruhi oleh asal media inisiasi tunas majemuk.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Tri Muji Ermayanti (LIPI), Dita Agisimanto, Farida Yulianti, dan Yunimar atas bantuan saran dan bimbingan, serta tidak lupa kepada teknisi Laboratorium Pemuliaan Tanaman dan Somatik Embriogenesis Balitjestro yang telah sangat membantu dalam penyelesaian penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- ¹Hannum, S.M. 2004. Potential impact of strawberries on human health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44: 1–17.
- ²Hancock, J. F. 1999. *Strawberries*, Wallingford, UK: CABI
- ³Zebrowska, J.I. 2004. Micropropagation in the strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) inbred lines. *Food, Ag. & Environ.* 2: 253–255.
- ⁴Boxus, P. 1974. The production of strawberry plants by in vitro micropropagation. *J. Hortic. Sci.* 49: 209–210.
- ⁵Smith, S.H., R.E. Hilton, and S.R. McCall. 1968. Meristem culture for the production of virus-free strawberries. *Strawberry News Bulletin XIV*, 14 February 1968.
- ⁶Murashige, T and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473–497.
- ⁷Boxus, P. 1999. Micropropagation of strawberry via axillary shoot proliferation. In: plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology. Part III. Plant Propagation In Vitro Hall R.D. (Ed.) Humana Press Inc., Totowa NJ, 111: 103–114.
- ⁸Litwinczuk W. 2004. Field performance of “senga senga” strawberry plants (*Fragaria x ananassa* Duch.) Obtained by runners and in vitro through auxiliary and adventitious shoots. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Horticulture* 7(1).
- ⁹Bozena, B. 2001. Morphological and physiological characteristics of micropropagation strawberry plants rooted in vitro or ex vitro. *Scientia Horticulture* 89: 195–206.
- ¹⁰Kabirnatay S., Ghasemi Y., Nematzadeh G., Asgharzadeh R., Shahin K.B., and Yazdani M. 2012. Effect of explant type and growth regulators on in vitro micropropagation of *Begonia rex*. *Intl Rech Jour of Appl Bsic Scnes* 3(4): 896–901.
- ¹¹Molla M.M.H., Nasiruddin K.M., Al-Amin M., Khanam D., and Salam M.A. 2011. *Effect of Growth Regulators on Direct Regeneration of Potato*. Singapore: IPCBEE 12 IACSIT Press.
- ¹²Winkelmann T. and Serek M. 2005. Genotypic differences in callus formation and regeneration of somatic embryos in *Cyclamen persicum* Mill. *Euphytica* 144: 109–117.
- ¹³Haddadi F. and Aziz M.A. 2010. Micropropagation of Strawberry cv. Camarosa: Prolific Shoot Regeneration from In Vitro Shoot Tips Using Thidiazuron with N6-benzylamino-purine. *Hortscience* 45(3): 453–456.
- ¹⁴Sorvari, S., S. Ulvinen, T. Hietaranta, and H. Hiirsalmi. 1993. Preculture medium promotes direct shoot regeneration from micropropagated strawberry leaf disks. *HortScience* 28: 55–57.
- ¹⁵Lopez-Aranda, J.M., F. Pliego-Alfaro, I. Lopez-Navidad, and M. Barcelo-Munoz. 1994. Micropropagation of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.), effect of mineral salts, benzyladenine levels and number of subcultures on the in vitro and field behaviour of the obtained microplants and the fruiting capacity of their progeny. *J.Hortic.Sci.* 69: 625–637.
- ¹⁶Husaini, A.M. and M.Z. Abdin. 2007. Interactive effect of light, temperature and TDZ on the regeneration potential of leaf discs of *fragaria x ananassa* Duch. In vitro Ccell. *Dev.Biol.- Plant* 43: 576–584.
- ¹⁷Green, A.E., T.M. Davis, A. Dale, and J.J. Luby. 1990. Regeneration of *Fragaria vesca* plants from leaf tissue. Proceedings of the 3rd North American Strawberry Conference, Feb. 14-16 Houston, Texas, pp: 124–125.
- ¹⁸Kaushal, K., A.K. Nath, P. Kundal, and D.R. Sharma. 2004. Studies on somaclonal variation in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) cultivars. *Acta Hortic.*, 662: 129–133.
- ¹⁹Miller, P.W. and R.O. Belkengren. 1963. Elimination of yellow edge, crinkle and veinbanding

viruses and certain other virus complexes from strawberries by excision and culturing of apical meristem. *Plant Dis. Rep.* 47: 298–300.

²⁰ Geoge, E.F., M..A. Hall and G.J. De Klerk 2008. *Plant propagation by tissue culture* 3rd Edition, Vol. 1: The back ground. Springer.

²¹ Ko, C.Y, A.M. Al-Abdulkarim, S.M. Al-Jowid, and A. Al-BAiz. 2009. An effective disinfection protocol for plant regeneration from shoot tip cultures of strawberry. *Afr.J.Biotechnol.* 8(11): 2.611–2.615.

²² Debnath, S.C. 2005. Strawberry sepal: Another explant for thiadizuron-induced adventitious shoot regeneration. *In Vitro Cell.Dev. Biol-Plant* 41: 671–676.

²³ Mohajer, S., Taha R. M., Khorasani A., and Yaacob J.S. 2012. Induction of different types of callus and somatic embryogenesis in various explants of Sainfoin (*Onobrychis sativa*). *AJCS* 6(8): 1.305–1.313.

