

Konservasi *In Vitro* Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum*) Melalui Pertumbuhan Minimal Menggunakan Manitol

Fitri Damayanti^{1,a)}, Ika Mariska²⁾

¹Prodi Pendidikan Biologi/FMIPA, Universitas Indraprasta, Jakarta

²Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Perkebunan (Puslitbangbun), Bogor

^{a)} fitridamayantineng@gmail.com

Abstrak. Konservasi *in vitro* dapat dilakukan dengan menggunakan metode pertumbuhan minimal terenkapsulasi menggunakan Na-alginat. Penyimpanan tanaman tebu secara *in vitro* penting dilakukan karena biakan tebu *in vitro* tidak bertahan lama dalam kultur dan perlu tindakan subkultur setiap tiga minggu. Hal ini dapat menimbulkan risiko terjadinya keragaman somaklonal. Penerapan konservasi *in vitro* melalui teknik pertumbuhan minimal diharapkan mampu menyimpan biakan dalam jangka menengah (bulanan hingga tahunan). Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan konsentrasi manitol terbaik untuk konservasi *in vitro* biakan tebu. Bahan tanaman yang digunakan adalah apeks tebu kultivar PS 864 dan BL. Pertumbuhan minimal dilakukan dengan penambahan manitol dengan konsentrasi 0, 1, 3, dan 5%. Enkapsulasi dilakukan menggunakan 3% Na-alginat. Hasil penelitian menunjukkan bahwa biakan tebu kultivar PS 864 dapat disimpan sampai tujuh bulan dengan daya regenerasi pasca penyimpanan mencapai 60%. Sedangkan biakan tebu kultivar BL dapat disimpan tidak lebih dari tiga bulan dengan daya regenerasi pasca penyimpanan yang sangat rendah yaitu di bawah 40%.

Kata kunci: enkapsulasi, manitol, Na-alginat, tebu

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Tindakan konservasi sangat diperlukan pada plasma nutfah sebagai upaya untuk menjamin ketersediaan material genetik bagi upaya pengembangannya. Konservasi *in vitro* adalah salah satu teknologi yang dapat diterapkan pada tanaman yang diperbanyak secara vegetatif atau tanaman yang bersifat rekalsitran. Teknik konservasi ini memiliki beberapa kelebihan bila dibandingkan dengan teknik konservasi lain, antara lain: 1) dapat menghemat tenaga kerja, biaya dan waktu, 2) tidak membutuhkan area yang luas, 3) biakan mudah diperbanyak kembali, 4) memudahkandalam pertukaran, dan 5) terhindar dari masalah hilangnya genotipe karena masalah cekaman biotik (hama dan penyakit) dan abiotik (kebanjiran, kekeringan, dan keracunan). Oleh karena itu, tindakan konservasi sangat diperlukan dengan menerapkan teknologi yang mampu menjamin keberadaan koleksi plasma nutfah salah satunya adalah teknik konservasi *in vitro*.

Strategi teknik konservasi *in vitro* adalah tindakan penyimpanan kultur dalam kondisi suboptimal. Tujuan konservasi dilakukan dengan menghambat pertumbuhan biakan dengan masa simpan yang dapat diperpanjang (bulanan hingga tahunan) tanpa terjadi perubahan genetik. Selain itu, tindakan konservasi *in vitro* dapat mengurangi frekuensi tindakan pembaharuan kultur atau subkultur. Upaya konservasi *in vitro* dapat dilakukan dengan menggunakan organ dari tunas atau apeks (Damayanti *dkk.*, 2010; Sakhanokho *et al.*, 2013; Elangomathavan *et al.*, 2017), protokorm (Mohanty *et al.*, 2012), kalus (Damayanti *et al.*, 2015; Damayanti *dkk.*, 2016), atau meristem (Bhuiyan *et al.*, 2016)

Salah satu teknik konservasi *in vitro* yang dapat diterapkan adalah melalui teknik pertumbuhan minimal. Metode pertumbuhan minimal dapat dilakukan dengan penambahan zat regulator osmotik (manitol, sorbitol, atau sukrosa) dan senyawa retardan (cycocel, paclobutrazol, atau ancymidol) dalam media kultur. Teknik konservasi *in vitro* dengan pertumbuhan minimal dapat diaplikasikan dengan teknik enkapsulasi menggunakan Na-alginat. Konservasi *in vitro* biakan tebu terenkapsulasi

sangat penting dilakukan karena biakan tebu *in vitro* tidak bertahan lama dalam kultur. Biakan tebu *in vitro* perlu dilakukan subkultur setiap tiga minggu, hal ini menimbulkan resiko terjadinya variasi somaklonal (Eeuwens *et al.*, 2002). Selain itu, tindakan subkultur dengan frekuensi tinggi tidak efisien waktu, tenaga kerja, dan biaya, serta berisiko terjadi kontaminasi. Konservasi *in vitro* biakan tebu terenkapsulasi diharapkan dapat berfungsi untuk pembentukan benih sintetik, pertukaran plasma nutfah dalam bentuk planlet *in vitro* dan penyimpanan biakan dalam jangka pendek sampai jangka panjang (Reddy *et al.*, 2012; Mohanty *et al.*, 2012; Sakhanokho *et al.*, 2013; Muthiah *et al.*, 2013; Benelli, 2016; Elangomathavan *et al.*, 2017). Teknik konservasi *in vitro* dengan metode pertumbuhan minimal terenkapsulasi berhasil diterapkan untuk beberapa jenis tanaman, seperti: Begonia (Sakhanokho *et al.*, 2013), *Cymbidium bicolor* (Mahendran, 2014), *Helianthus annuus* (Moradi *et al.*, 2016), tebu (Damayanti *et al.*, 2015, 2016); *Clitoria ternatea* (Mahmad *et al.*, 2016), *Acorus calamus* (Quraishi *et al.*, 2017), dan *Cleistanthus collinus* (Elangomathavan *et al.*, 2017).

Saat ini, teknik konservasi *in vitro* melalui pertumbuhan minimal yang diaplikasi dengan teknik enkapsulasi pada tanaman tebu belum banyak dilaporkan. Prosedur teknik konservasi *in vitro* dengan pertumbuhan minimal terenkapsulasi yang berhasil diterapkan pada kultivar tertentu tidak serta merta dapat langsung diterapkan pada kultivar yang lain sehingga perlu penelitian untuk memperoleh teknik penyimpanan yang efektif dan efisien. Oleh karena itu, perlu dilakukan modifikasi dari teknik yang sudah ada untuk mendapatkan teknik enkapsulasi dan penyimpanan biakan tebu yang efektif dan efisien, sehingga biakan tebu dapat disimpan dalam waktu yang lama.

Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan konsentrasi manitol terbaik untuk konservasi *in vitro* biakan tebu terenkapsulasi.

METODE

Penelitian telah dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Kelompok Peneliti Biologi Sel dan Jaringan (BSJ), Balai Besar Bioteknologi dan Rekayasa Genetik (BB-Biogen), Bogor dan Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan (Puslitbangun), Bogor. Bahan tanaman yang digunakan adalah apeks tebu dari kultivar PS 864 dan BL.

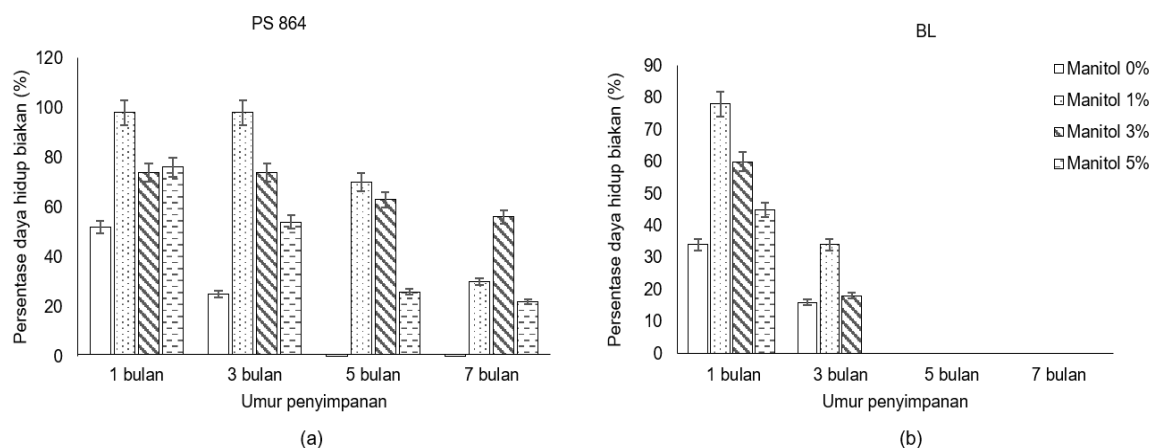
Apeks tebu kultivar PS 864 dan BL dienkapsulasi dengan 3% Na-alginat yang mengandung media MS (Murashige and Skoog, 1962) dan penambahan manitol. Enkapsulasi dilakukan dengan 3% Na-alginat menggunakan metode tetes. Kapsul yang terbentuk diperkeras dengan merendam dalam larutan 100 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ hingga terbentuk gel atau kapsul yang solid. Kapsul-kapsul yang terbentuk direndam dalam akuades steril. Inkubasi dilakukan pada suhu 25 ± 2 °C, fotoperiodisitas 16 jam terang dengan intensitas cahaya 1200 lux. Setelah penyimpanan, biakan yang masih hidup dan berwarna hijau disubkultur pada media MS padat yang diperkaya dengan 0.3 mg BAP/L dan 0.5 mg IBA/L.

Rancangan penelitian adalah rancangan lingkungan acak lengkap dengan 2 faktorial. Faktor pertama adalah kultivar tebu, yaitu PS 864 dan BL. Faktor kedua adalah konsentrasi manitol, yaitu 0, 1, 3, dan 5% yang dicampur ke dalam media enkapsulasi. Setiap perlakuan terdiri dari 4 ulangan. Setiap ulangan terdiri atas 10 propagula. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan *STAR Nebula* IRR 2013. Perbedaan antar rerata dibandingkan dengan uji selang berganda Duncan pada tingkat kepercayaan 0.01. Respon yang diamati adalah umur penyimpanan 1, 3, 5, dan 7 bulan. Parameter pengamatan adalah persentase daya hidup (propagula yang tetap berwarna hijau), persentase biakan yang menembus kapsul, dan persentase daya regenerasi pada media pemulihan pasca penyimpanan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

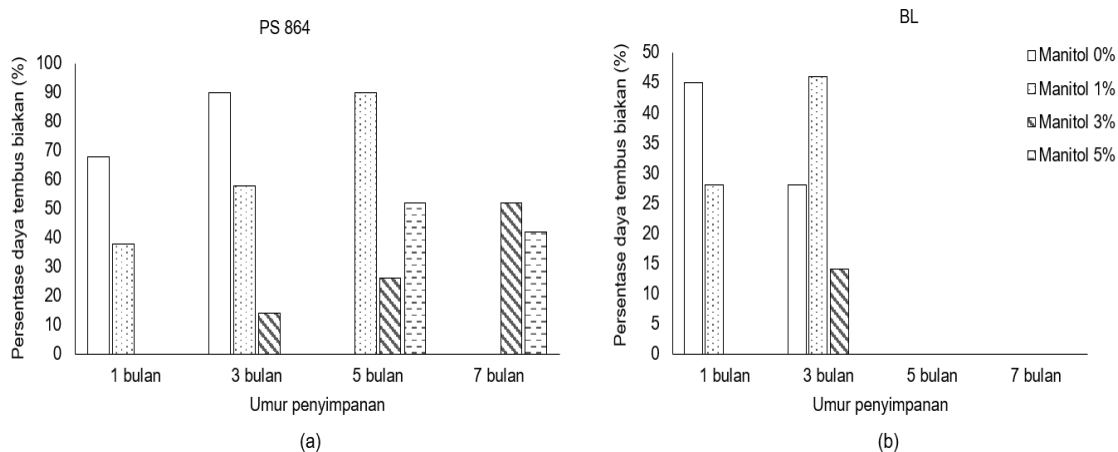
Metode konservasi *in vitro* dengan pertumbuhan minimal menggunakan manitol tidak terjadi interaksi yang nyata antara kultivar tebu dengan konsentrasi manitol. Gambar 1 memperlihatkan persentase daya hidup biakan pada umur penyimpanan 1 hingga 7 bulan. Pada kultivar PS 864, daya hidup biakan umur 1 bulan penyimpanan tertinggi diperoleh dari perlakuan 1% manitol yaitu 98% sedangkan tanpa penambahan manitol hanya mencapai 52%. Demikian juga untuk umur penyimpanan 3 bulan. Pada kultivar BL, umur penyimpanan 1 bulan memiliki daya hidup tertinggi yang diperoleh dari perlakuan 1% manitol yaitu sebesar 78% sedangkan tanpa penambahan manitol hanya mencapai 34%. Penambahan 1 dan 3% manitol dengan umur penyimpanan 1 dan 3 bulan memperlihatkan kemampuan tumbuh yang sama baik pada kultivar PS 864. Sebaliknya pada kultivar BL, terjadi penurunan kemampuan hidup biakan pada umur penyimpanan 3 bulan dan bahkan mengalami kematian setelah 3 bulan penyimpanan. Pada penambahan 5% manitol terjadi penurunan daya hidup biakan. Pada kultivar PS 864 umur 7 bulan terjadi penurunan daya hidup, penambahan 1% manitol daya hidup biakan hanya 30%. Hal ini berarti telah terjadi penurunan daya hidup bila dibandingkan umur penyimpanan 5 bulan yaitu mencapai 42.8%. Perlakuan 3% manitol memiliki daya hidup biakan tebu kultivar PS 864 tertinggi yaitu 56%. Sedangkan tanpa penambahan manitol tidak ada biakan yang mampu bertahan hidup. Penyimpanan biakan tebu dengan penambahan manitol dalam Na-alginat menunjukkan daya hidup biakan menurun seiring dengan peningkatan lama penyimpanan (Gambar 1).



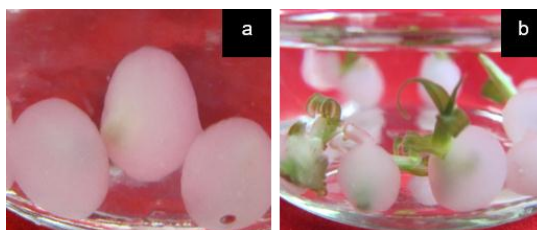
Gambar 1. Persentase daya hidup biakan secara pertumbuhan minimal dengan manitol dalam kapsul 3% Na-alginat. Standart Error (SE) dari empat ulangan

Biakan tebu terenkapsulasi kultivar PS 864 memperlihatkan kemampuan menembus kapsul sampai umur penyimpanan 7 bulan sedangkan kultivar BL hanya 3 bulan penyimpanan (Gambar 2). Hal ini berarti adanya daya hidup dari biakan. Gambar 3 memperlihatkan penampakan visual dari biakan terenkapsulasi. Pada umur penyimpanan 1 bulan, biakan kultivar PS 864 dari perlakuan 3 dan 5% manitol belum ada yang menembus kapsul. Sedangkan perlakuan tanpa penambahan manitol dan 1% manitol biakan sudah mampu menembus kapsul. Daya tembus biakan tertinggi dihasilkan dari perlakuan tanpa penambahan manitol yaitu 68% dan 45% masing-masing untuk kultivar PS 864 dan BL. Daya tembus biakan dengan penambahan 1% manitol meningkat seiring dengan lamanya umur penyimpanan. Biakan menembus kapsul pada penambahan 3% manitol terjadi pada 3 bulan penyimpanan dan terus meningkat seiring dengan peningkatan umur penyimpanan yaitu 14% untuk kultivar PS 864 dan BL. Pada kultivar PS 864 kemampuan

biakan menembus kapsul terus meningkat pada umur penyimpanan 5 dan 7 bulan yaitu sebesar 26 dan 52%. Sedangkan pada kultivar BL tidak ada biakan yang bertahan hidup setelah umur 3 bulan penyimpanan. Penambahan 5% manitol pada kultivar PS 864, biakan mampu menembus kapsul setelah penyimpanan 5 bulan dan terjadi penurunan pada umur 7 bulan penyimpanan.



Gambar 2. Persentase daya tembus biakan secara pertumbuhan minimal dengan manitol dalam kapsul 3% Na-alginat

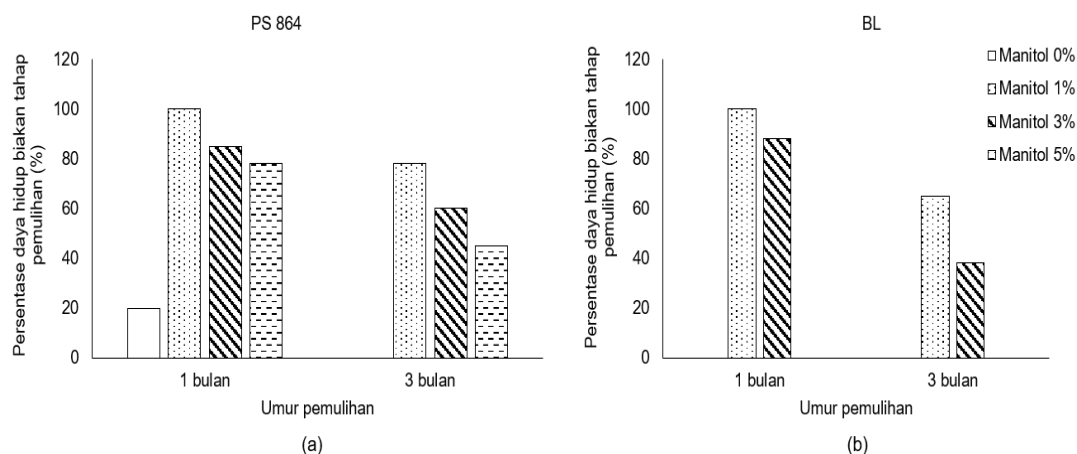


Gambar 3. Konservasi *in vitro* tebu dengan metode pertumbuhan minimal menggunakan manitol dalam kapsul 3% Na-alginat. (a) biakan tebu terenkapsulasi; (b) tunas hijau yang mampu menembus kapsul

Setelah tujuh bulan penyimpanan biakan kultivar PS 864 dan tiga bulan untuk kultivar BL terenkapsulasi dalam manitol semua biakan yang mampu bertahan hidup disubkultur ke dalam media pemulihan dan regenerasi. Gambar 4a memperlihatkan daya hidup biakan kultivar PS 864 pasca penyimpanan. Pada tahap pemulihan dan regenerasi pasca penyimpanan tanpa penambahan manitol tidak ada biakan yang bertahan hidup. Pada perlakuan 1% manitol daya hidup biakan tebu kultivar PS 864 setelah 1 bulan pada media pemulihan mencapai 100%. Namun seiring dengan bertambahnya waktu pemulihan daya hidup biakanpun menurun. Perlakuan penambahan 3% manitol umur 1 bulan mencapai 85% dan menurun seiring dengan penambahan umur pemulihan yaitu 60% pada umur 3 bulan. Pada perlakuan 5% manitol dengan umur pemulihan 1 bulan, daya hidup biakan mencapai 78% namun pada bulan ketiga mengalami penurunan yang drastis, yaitu hanya 45%. Gambar 4b memperlihatkan daya hidup biakan kultivar BL pasca penyimpanan. Sama seperti kultivar PS 864, tidak ada biakan kultivar BL yang bertahan hidup pada tahap pemulihan dan regenerasi pasca penyimpanan tanpa penambahan manitol. Penambahan 1% manitol daya hidup biakan kultivar BL pada media pemulihan mencapai 100% pada umur 1 bulan dan 65% pada umur 3 bulan. Daya hidup biakan pada perlakuan 3% manitol umur 1 bulan mencapai 88% dan menurun drastis pada umur 3 bulan yaitu 38%.

Pembahasan

Kultivar PS 864 memperlihatkan kemampuan daya hidup biakan lebih tinggi dari kultivar BL (Gambar 1). Penambahan 3% manitol memperlihatkan daya hidup biakan kultivar PS 864 yang lebih stabil sampai umur penyimpanan 7 bulan bila dibandingkan dengan 1 dan 5% manitol. Penambahan manitol dalam kapsul terbukti mampu mempertahankan masa penyimpanan biakan kultivar PS 864 sampai umur 7 bulan. Hal ini terlihat dari perlakuan tanpa penambahan manitol baik pada kultivar PS 864 dan BL memiliki daya hidup yang sangat rendah bahkan tidak mampu bertahan hidup setelah 3 bulan penyimpanan. Kultivar PS 864 dengan adanya penambahan manitol biakan mampu bertahan hidup sampai umur penyimpanan 7 bulan, sebaliknya kultivar BL hanya mampu bertahan hidup sampai umur penyimpanan 3 bulan. Seiring dengan lamanya masa penyimpanan biakan dalam manitol terjadi penurunan daya hidup biakan. Dalam kondisi tercekam tersebut, jaringan akan memproduksi etilen yang mengakibatkan eksplan mencoklat dan akhirnya mengalami kematian. Selain itu, penambahan manitol dalam Na-alginat meningkatkan tekanan osmotik dalam media. Hal ini menyebabkan menurunnya pasokan air bagi biakan. Pada Gambar 1 terlihat semakin tinggi konsentrasi manitol menyebabkan semakin rendah daya hidup biakan dimana pasokan air dan nutrisi ke biakan semakin terbatas yang menyebabkan viabilitas biakan menurun. Daya hidup kultivar PS 864 dari penambahan 3% manitol dengan masa penyimpanan 3 bulan sebesar 74%. Hasil ini masih lebih tinggi bila dibandingkan dari penelitian Skalova *et al.* (2012) pada tanaman *Smallanthus sonchifolius*. Penambahan 3% manitol pada biakan *S. sonchifolius* menghasilkan daya hidup sebesar 70% dengan masa penyimpanan 2 bulan. Penelitian Joshi and Jadhav (2013) memperlihatkan bahwa pada tanaman obat *Spilanthes acmella* dengan penambahan 2% manitol yang dikombinasi dengan perlakuan suhu rendah 15 ± 2 °C dapat menyimpan biakan *S. acmella* sampai umur delapan bulan dengan persentase daya hidup mencapai 68%.



Gambar 4. Persentase daya hidup biakan tahap pemulihan pasca penyimpanan pada perlakuan manitol

Biakan kultivar PS 864 terenkapsulasi sampai umur penyimpanan 7 bulan memperlihatkan kemampuan menembus kapsul. Sedangkan biakan kultivar BL tidak mampu bertahan hidup setelah 3 bulan penyimpanan. Kemampuan biakan menembus kapsul memperlihatkan adanya daya hidup dari biakan. Seiring dengan lamanya masa penyimpanan biakan kultivar PS 864 dalam manitol, daya tembus biakan meningkat pada perlakuan 3% manitol. Biakan menembus kapsul setelah 3 bulan penyimpanan dan terus meningkat persentasenya pada umur penyimpanan 5 dan 7 bulan. Belum adanya biakan menembus kapsul menunjukkan telah terjadi penghambatan

pertumbuhan karena adanya penambahan manitol dalam Na-alginat. Manitol adalah salah satu dari osmoregulator yang dapat meningkatkan tekanan osmotik media sehingga nutrisi mengalir secara perlahan ke dalam jaringan tanaman. Peningkatan tekanan osmotik terjadi karena berhubungan dengan plasmolisis sel yang menyebabkan terhambatnya pertumbuhan dan pembelahan sel. Rendahnya daya tembus biakan terjadi karena manitol dengan konsentrasi tinggi dapat menyebabkan tekanan osmotik yang tinggi. Hal ini menyebabkan seolah-olah dalam media tidak tersedia nutrisi sehingga terjadi dehidrasi jaringan. Hasil penelitian ini memperlihatkan penambahan manitol mampu menghambat pertumbuhan biakan kultivar PS 864 sampai umur 7 bulan. Sebaliknya hasil penelitian Mohanty *et al.* (2012) memperlihatkan dengan adanya penambahan 7.5 dan 12.5% manitol pada biakan protokorm *Dendrobium nobile* hanya mampu menghambat pertumbuhan sampai umur penyimpanan 2 bulan.

Biakan kultivar PS 864 setelah tujuh bulan penyimpanan memiliki daya hidup mencapai 60% pada media pemulihan dan regenerasi bila dibandingkan kultivar BL hanya 38% (Gambar 3). Daya hidup biakan pasca penyimpanan merupakan salah satu tahapan yang sangat penting. Hal ini berhubungan dengan kemampuan biakan beregenerasi pasca penyimpanan. Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa penyimpanan biakan kultivar PS 864 dapat disimpan dalam 3% manitol sampai umur penyimpanan 7 bulan. Sedangkan kultivar BL pada konsentrasi manitol tinggi tidak dapat bertahan hidup lebih lanjut terlihat dari biakan yang berwarna coklat. Penyimpanan biakan tebu terenkapsulasi dengan 3% Na-alginat dapat disimpan dalam 3% manitol namun tidak lebih dari 3 bulan. Hal ini berbeda dengan penelitian yang diperoleh Bhuiyan *et al.* (2016) dengan penambahan 4% manitol menggunakan tunas aksilar dan meristem dari tanaman talas mampu menyimpan biakan sampai 24 bulan. Penelitian Montalvo-Peniche (2007) pada tanaman cabe memperlihatkan penambahan 2% manitol mampu menyimpan tunas cabe selama sembilan bulan.

Konservasi *in vitro* harus mampu menekan pertumbuhan biakan selama mungkin tetapi tidak menghilangkan kemampuan biakan regenerasi pasca konservasi. Penambahan 3% manitol terbukti lebih efektif menekan pertumbuhan biakan tebu. Perlakuan manitol ini mampu menyimpan apeks tebu kultivar PS 864 dengan teknik enkapsulasi sampai tujuh bulan yang ditunjukkan dengan rendahnya kemampuan biakan menembus kapsul selama penyimpanan dan memiliki daya pemulihan dan regenerasi pasca penyimpanan mencapai 60%. Konservasi *in vitro* dengan metode pertumbuhan minimal memiliki prinsip yaitu terjadi penghambatan pertumbuhan biakan sehingga dapat disimpan untuk jangka panjang namun tetap mampu hidup normal. Perlakuan 3% manitol dapat direkomendasikan untuk konservasi apeks tebu kultivar PS 864 dengan waktu penyimpanan lebih lama mungkin lebih dari 7 bulan. Perpanjangan interval subkultur diharapkan dapat menghemat biaya, waktu, tenaga, dan terhindar dari kontaminasi.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Konservasi *in vitro* secara pertumbuhan minimal dengan penambahan 3% manitol dalam kapsul 3% Na-alginat adalah perlakuan penyimpanan yang terbaik untuk apeks tebu kultivar PS 864. Waktu penyimpanan perlakuan ini mencapai 7 bulan dengan daya tembus kapsul yang rendah dan daya regenerasi pasca penyimpanan mencapai 60%. Sedangkan kultivar BL dapat disimpan dalam 3% manitol terenkapsulasi namun tidak lebih dari tiga bulan dengan daya regenerasi pasca penyimpanan sangat rendah yaitu di bawah 40%.

Saran

Perlu dilakukan konservasi *in vitro* biakan tebu dengan metode pertumbuhan minimal menggunakan zat regulator osmotik lain atau senyawa retardant. Selain itu perlu juga dilakukan konservasi *in vitro* jangka panjang dengan metode kriopreservasi yang akan digunakan sebagai koleksi dasar untuk sumber keragaman pemuliaan tanaman tebu.

DAFTAR PUSTAKA

- A. Quraishi, S. Mehar, D. Sahu and S. K. Jadhav, *In vitro* mid-term conservation of *Acorus calamus* L. via cold storage of encapsulated microrhizome, *Braz Arch Biol Technol* **160**, 1-9 (2017).
- C. Benelli, Encapsulation of shoot tips and nodal segments for *in vitro* storage of “Kober 5BB” grapevine rootstock, *Horticulturæ* **2**(10), 1-8 (2016).
- C. J. Eeuwens, S. Lord, C. R. Donough, V. Rao, G. Vallejo and S. Nelson, Effects of tissue culture conditions during embryoid multiplication on the incidence of “mantled” flowering in clonally propagated oil palm, *Plant Cell Tiss* **3**(3), 311-323 (2002).
- F. Damayanti, I. Roostika I dan M. Mansur, Penyimpanan *in vitro* melalui teknik pertumbuhan minimal pada tunas *Nepenthes mirabilis* dengan penggunaan sorbitol, *Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi III*, 160-167 (2010).
- F. Damayanti, Suharsono, U. Widiastuti, I. Mariska, Encapsulation of embryogenic callus and shoot tips for storage of sugarcane (*Saccharum officinarum*L.), *Proceeding ICOLIB Exploration and Conservation of Biodiversity*, 279-282 (2015).
- F. Damayanti, Suharsono, U. Widiastuti, dan I. Mariska, Enkapsulasi kalus embriogenik tebu (*saccharum officinarum* L.) dengan metode pertumbuhan minimal, *Prosiding Prosiding Seminar Nasional Matematika, Sains, dan Teknologi*, 173-177 (2016).
- G. Mahendran, Encapsulation of protocorm of *Cymbidium bicolor* Lindl. for short-term storage and germplasm exchange, *J Ornamen Plants* **4** (4), 17-27 (2014).
- H. F. Sakhanokho, C. T. Ponders and E. K. Blythe, Alginate encapsulation of *Begonia* micro shoots for short-term storage and distribution, *Sci World J*, 1-7. doi:10.1155/2013/341568 (2013).
- I. Skalova, I. Viehmannova and J. Vitamvas, *In vitro* conservation of *Smallanthus sonchifolius* under slow-growth conditions, *Agric Tropic Subtropic* **45**(3), 147-150 (2012).
- J. V. I Muthiah, K. P. Shunmugiah, R. Manikandan, Genetic fidelity assessment of encapsulated *in vitro* tissues of *Bacopa monnieri* after 6 months of storage by using ISSR and RAPD markers, *Turk J Bot* **37**, 1008-1017 (2013).
- M. C. Montalvo-Peniche, *In vitro* germplasm conservation of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.), *Hort sci* **42**(5), 1247-1252 (2007).
- M. C. Reddy, K. S. R. Murthy and T. Pullaiah, Synthetic seeds: A review in agriculture and forestry, *Afr J Biotechnol* **11**, 14254-14275 (2012).
- M. K. R. Bhuiyan, M. J. Hossain and M. M. Haque, *In vitro* conservation of taro (*Colocasia esculenta* var. *Globulifera*) as influenced by mannitol, *Bangladesh J Agril Res* **4**(1), 67-74 (2016).
- N. Mahmad, R. M. Taha, R. Othman, H. Elias and A. Saleh, Encapsulated embryogenic callus of *Clitoria ternatea* L. for regeneration and conservation, *Inter J Environ Sci Develop* **7**(5), 363-367 (2016).

- P. Mohanty, P. Nongkling, M. C. Das, S. Kumaria and P. Tandon, Short-term storage of alginate-encapsulated protocorm-like bodies of *Dendrobium nobile* Lindl.: an endangered medicinal orchid from North-east India, *Biotech* **3**(3), 235-239 (2012).
- R. Elangomathavan, N. S. Beulah, S. Hariharan and P. Kalaivanan, Encapsulation of shoot tips and nodal segments of *Cleistanthus collinus* for short term storage and germplasm exchange, *Int J Curr Res Biol Med* **2**(1), 21-32 (2017).
- S. Moradi, M. Azimi, F. Habibi and S. S. Pouredad, *In vitro* plant regeneration of *Helianthus annuus* (Hyb. Azargol) from alginate-encapsulated shoot tips for short term storage, germplasm exchange and distribution, *J Plant Mol Breeding* **4**(2), 1- 8 (2016).
- T. Murashige and F. Skoog, A Revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture, *Physiol Plant* **15**, 473-497 (1962).
- V. Joshi and S. K. Jadhav, Effect of temperature and media supplements on slow growth conservation of medicinal plant *Spilanthes acmella*, *Bot Serb* **37**(2), 155-160 (2013).