

**PENGUJIAN PENGARUH TETUA BETINA
TERHADAP SIFAT TOLERANSI PADA NAUNGAN KEDELAI [*Glycine max* (L.) Merrill]**

TITIN HANDAYANI

Balai Teknologi Lingkungan-Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi
PUSPIPTEK Serpong Tangerang Banten

ABSTRACT

This study was conducted at Green House IPB Cikabayan Darmaga Research Station. Soybean tolerance genotype (Ceneng) was crossed with sensitive genotype (Godek A) to study the mode of inheritance in tolerance to shade. Reciprocal cross were also made in soybean Ceneng and Godek A to study maternal effect. This experiment was conducted under artificial shading by using paranet with light intensity 75%. Material genetic were used Ceneng, Godek A, F₁ and F₁' that were planted according to complete Randomized Experimental Design. The result of "t" test showed that anatomical, morphological characters, and molecular marker for tolerance and sensitive genotype was significant difference, while was no significant in F₁ and F₁'. This experiment can be concluded that there was no maternal effect found in the soybean crossing between tolerance and sensitive genotype.

Key words : soybean, shading, maternal effect

PENDAHULUAN

Kemampuan tanaman untuk beradaptasi terhadap kondisi lingkungan spesifik akan ditentukan oleh sifat genetik tanaman (Mohr dan Schoopfer, 1995). Ketersediaan keragaman genetik akan menentukan keberhasilan program pemuliaan untuk toleransi terhadap naungan. Namun hal ini perlu ditunjang oleh pengetahuan mengenai pola pewarisan sifatnya. Sampai saat ini informasi tentang genetik dan pewarisan sifat toleransi terhadap naungan masih sangat kurang.

Menurut Austin (1993) karakter morfologi, seperti tinggi tanaman, ukuran daun, bentuk kanopi tanaman, secara relatif mudah diidentifikasi dan dihitung, tidak berubah dalam waktu singkat dan heritabilitasnya tinggi. Oleh karena itu karakter tersebut paling sering digunakan oleh pemulia tanaman dalam studi pewarisan sifat. Sifat morfologi tanaman umumnya dikendalikan secara genetik, sehingga berpeluang untuk dimanipulasi. Hal ini dimungkinkan karena sifat morfologi ini mempunyai nilai heritabilitas yang tinggi. Namun menurut Caccarelli (1994) heritabilitas pada lingkungan rawan cekaman abiotik pada umumnya lebih rendah dibandingkan pada lingkungan optimum.

Kalau kita menengok kembali percobaan yang dilakukan oleh Mendel, pewarisan sifat kualitatif yang dipelajari pada zuriat hasil persilangan identik dengan zuriat hasil persilangan resiprokalnya. Akan tetapi dalam beberapa kejadian

dilaporkan bahwa zuriat yang dihasilkan dari persilangan resiprokalnya menyerupai tetua betinanya. Dalam persilangan, tetua betina memberikan sitoplasma dan setengah genomnya kepada zuriat hasil zigot, jadi ada petunjuk bahwa terdapat pewarisan sitoplasmik atau plastid. Pewarisan yang dikontrol oleh gen yang ada di luar inti disebut pewarisan ektranuklear atau ekstra kromosomal (Hartana, 1992).

Penelitian padi gogo pada naunga dilaporkan bahwa tidak ada pewarisan sifat toleransi terhadap naungan yang dipengaruhi oleh tetua betinanya (Junaedi *et.al.*, 1999; Sahardi *et.al.*, 2000). Pada tanaman kedelai telah dilaporkan oleh Rostini *et.al.* (2000), bahwa tidak ada pengaruh tetua betina pada pewarisan sifat kandungan klorofil maksimum, tetapi ada pengaruh tetua betina pada periode lama kandungan klorofil maksimum dan retensi klorofil maksimum.

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pewarisan sifat toleransi terhadap intensitas cahaya rendah pada zuriat hasil persilangan kedelai toleran (Ceneng) dengan peka (Godek A) dan resiprokalnya. Karakter yang diamati adalah karakter yang telah dianalisis pada penelitian sebelumnya yaitu karakter klorofil *a* dan jumlah cabang produktif yang terkait dengan toleransi terhadap intensitas cahaya rendah. Hipotesis yang diajukan adalah bahwa tidak ada pengaruh tetua betina pada pewarisan sifat klorofil *a* dan jumlah cabang produktif.

METODOLOGI PENELITIAN

Persilangan antara Tetua Terpilih

Tetua terpilih ditentukan dari hasil seleksi terhadap intensitas cahaya rendah yang dilakukan pada percobaan sebelumnya yang merupakan uji ulang dari penelitian Elfarisna *et al.*, 2000. Persilangan dilakukan antara tetua toleran yaitu genotipe Ceneng dengan tetua peka yaitu genotipe Godek A dan resiproknya untuk memperoleh bahan kegenetikaan yang digunakan dalam studi identifikasi sifat anatomi, morfologi dan molekuler. Persilangan ini dilakukan di Rumah Plastik Balai Teknologi Lingkungan - BPPT PUSPIPTEK Serpong Tangerang.

Pengaruh Tetua Betina

Sebagai bagian dari studi pewarisan sifat, dilakukan pengujian terhadap populasi F_1 dan resiprokalnya untuk mengetahui pengaruh tetua betina pada pewarisan sifat toleransi terhadap intensitas cahaya rendah.

Penelitian dilakukan di KP IPB Cikabayan pada bulan Juli sampai September 2002. Pengujian dengan menggunakan naungan 0% dan 75%.

Bahan kegenetikaan yang digunakan adalah varietas Ceneng sebagai tetua toleran, Godek A sebagai tetua peka, F_1 dan resiproknya. Penanaman benih tetua dan zuriatnya menggunakan polibag berukuran 40 x 40 cm. Rancangan lingkungannya adalah Rancangan Acak Kelompok dengan dua ulangan. Setiap kelompok ditanam sebanyak 10 tanaman untuk masing-masing tetua dan zuriatnya. Pengujian menggunakan Rancangan Petak Terpisah.

Peubah yang diamati adalah tinggi tanaman, jumlah cabang, kandungan karoten, klorofil *a* dan *b* serta jumlah polong bernas. Analisis pengaruh tetua betina dalam pewarisan sifat toleransi terhadap intensitas cahaya rendah, nilai tengah dari populasi F_1 dan resiprokalnya dibandingkan dengan uji "t" menurut Singh dan Chaudary (1979). Perbedaan yang nyata diantara nilai tengah populasi F_1 dan resiprokalnya, menunjukkan adanya pengaruh tetua betina.

Tanaman F_1 yang diperoleh dari hasil persilangan kemudian ditanam dan sebagian dibiarkan bersari sendiri, sedangkan sebagian yang lain disilang balikkan kepada kedua tetuanya untuk memperoleh generasi silang balik BC_1P_1 dan BC_1P_2 . Sehingga diperoleh seluruh generasi yang diperlukan untuk melakukan identifikasi sifat toleransi terhadap intensitas rendah yaitu P_1 , P_2 , F_1 , F_1 resiprok, F_2 , BC_1P_1 dan BC_1P_2 .

Analisis Molekuler AFLP

Analisis AFLP dilakukan pada tetua toleran (Ceneng), tetua peka (Godek A), F_1 , F_1' , populasi F_2 , BC_1P_1 dan BC_1P_2 terdiri dari dua tahap. Tahap pertama yaitu seleksi kombinasi primer dengan menggunakan DNA tetua. Primer-primer yang digunakan adalah primer yang memberikan polimorfik terhadap tetua toleran (Ceneng) dan peka (Godek A). Analisis tahap kedua dilakukan melalui metoda BSA (*Bulk Segregation Analysis*). Terdapat 10 kelompok DNA untuk famili persilangan, yaitu (1) DNA tetua peka; (2) DNA tetua toleran, (3) DNA F_1 ; (4) DNA F_1 resiproknya; (5) Bulk toleran terdiri atas campuran DNA preamplified dari individu-individu tanaman yang sangat toleran dalam populasi BC_1P_1 ; (6) Bulk peka terdiri atas campuran DNA preamplified dari individu-individu tanaman yang sangat peka dalam populasi BC_1P_1 ; (7) Bulk toleran terdiri atas campuran DNA preamplified dari individu-individu tanaman yang sangat toleran dalam populasi BC_1P_2 ; (8) Bulk peka terdiri atas campuran DNA preamplified dari individu-individu tanaman yang sangat peka dalam populasi BC_1P_2 ; (9) Bulk toleran terdiri atas campuran DNA preamplified dari individu-individu tanaman yang sangat toleran dalam populasi F_2 . Analisis molekuler AFLP dilakukan di Laboratorium Molekuler 'Technical University of Muenchen' Freising-Germany.

Isolasi dan Pemurnian DNA

DNA genomik diekstraksi dari daun tanaman berumur 2 minggu yang ditumbuhkan di dalam kondisi naungan. Ekstraksi DNA menggunakan metode CTAB (Saghai-Marooof *et al.*, 1984).

Tahapan Analisis

Analisis AFLP dilakukan sesuai dengan AFLP plant *mapping kit* dari PE/Applied Biosystems. Ada tiga tahapan yang harus dilakukan yaitu sebagai berikut.

(a). Restriksi-Ligasi

DNA genom sebanyak 0,5 μ g dipotong dengan 1 U *MseI* dan 5 U *EcoRI* dan pada saat yang sama 5 pmol adaptor *EcoRI* dan 50 pmol adaptor *MseI* diligasi dengan 1 U T4 DNA ligase (*New England Biolabs, Beverly, MA, USA*) pada suatu bufer yang mengandung 10 mM Tris-HCl (pH 7,8), 1 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 0,1 mM ATP, 50 mM $NaCl_2$ dan 50 ng/ μ l bovine serum albumin dalam volume total 11 μ l selama 2 jam pada 37°C.

(b). Pre-amplifikasi

Sampel hasil restriksi-ligasi kemudian dilarutkan dengan 189 μl H_2O untuk menghasilkan konsentrasi yang sesuai untuk reaksi PCR selanjutnya. Preselektif amplifikasi dari sekuen target ditingkatkan fragmennya sesuai dengan yang diinginkan dengan primer homologous-adaptor *EcoRI* dan *MseI* yang masing-masing memiliki satu nukleotida tambahan pada ujung 3'. Reaksi PCR akan dilakukan dengan 4 μl hasil dilusi restriksi-ligasi; 0,125 μM *EcoRI* + 1 primer; 0,25 μM *MseI*; 0,4 unit DNA *Tag* polimerase (Qiagen GmbH, Germany); 0,2 mM setiap dNTP (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) dan 1 x Qiagen buffer PCR dengan volume total 20 μl . Amplifikasi siklus yang digunakan adalah 20 siklus yang terdiri dari 10 detik denaturasi pada 94 °C, 30 detik annealing pada 60 °C dan 2 menit ekstensi pada 72 °C. Verifikasi amplifikasi yang berhasil, 10 μl reaksi PCR dipisahkan dengan gel agarose 1,5 %; hasil *smear* dari fragmen target amplifikasi harus terlihat pada kisaran 1000-1500 bp. Sisa yang 10 μl dilarutkan 20 kali dengan menambahkan 190 μl H_2O dan disimpan pada 4 °C.

(c). Amplifikasi Selektif

Pada tahap amplifikasi selektif ini dilakukan dengan primer *EcoRI* dan *MseI* yang memiliki tiga nukleotida tambahan. Analisis fragmen multifluorophore, *EcoRI* dilabel dengan 5-carboxy-fluorescein (5-FAM); 2', 7' - dimethoxy-4',5' dichloro-6-carboxy-fluorescein (JOE), atau N,N,N',N'- tetramethyl-6-carboxyrhodamin (TAMRA), sedangkan primer *MseI* tidak dilabel.

Reaksi PCR dilakukan dengan menggunakan 3 μl hasil dilusi pre-amplifikasi; 0,05 μM *EcoRI* + 3 primer; 0,25 μM *MseI* + 3 primer; 0,4 DNA *Tag* polimerase; masing-masing dNTP dan 1x Qiagen buffer PCR dalam volume 20 μl . Selektivitas yang tinggi diperoleh melalui siklus berikut: satu siklus yang terdiri dari 30 detik pada 94 °C, 30 detik pada 65 °C, 2 menit pada 72 °C diikuti oleh 8 siklus yang terdiri dari penurunan temperatur annealing 1 °C per siklus dan akhirnya 23 siklus yang terdiri dari 1 detik pada 94 °C, 30 detik pada 65 °C, 2 menit pada 72 °C. Semua reaksi PCR dilakukan dengan Perkin Elmer 9600 thermocycler (PE/Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Analisis multifluorophore campuran 0,4 μl dari hasil PCR yang dilabel 5-FAM; 0,5 μl hasil PCR yang dilabel JOE atau 0,7 μl hasil PCR yang dilabel TAMRA. Sampel kombinasi ini dicampur dengan 0,2 μl *internal length standard genescan-500 ROX* (PE/Applied Biosystem) yang dilabel dengan 6-carboxy-X-rhodamin (ROX) dan 0,8 μl pewarna formamid (98% formamide, 0,005 % dextran blue), didenaturasi selama 3 menit pada 90 °C dan dengan cepat didinginkan pada es. Elektroforesis dilakukan dengan menggunakan 5 % *denaturing polyacrilamide gels* (Long RangerTM, FMC Bioproducts, Rockland, ME, USA) dengan buffer elektroforesis TBE 1x (89 mM Tris-base, 89 mM asam borat, 2,0 mM EDTA, pH 8,3) pada ABI PrismTM377 DNA sequencer (PE/Applied Biosystems) pada 2500 V selama 4 jam. *ABI collection software* versi 1.1 digunakan untuk mengumpulkan data.

HASIL DAN PEMBAHASAN

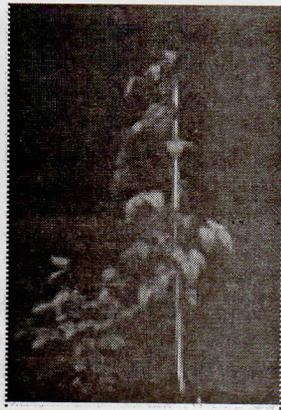
Persilangan antara Tetua Terpilih

Tetua terpilih adalah genotipe Ceneng sebagai tetua toleran dan genotipe Godek A sebagai tetua peka dengan pertimbangan perubahan hasil relatif yang menunjukkan sifat paling toleran diantara genotipe yang diuji adalah genotipe Ceneng, sedangkan genotipe paling peka adalah Godek A.

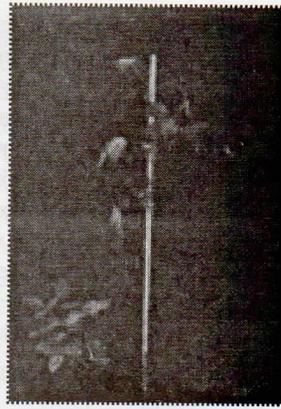
Genotipe Ceneng adalah kedelai berwarna hitam dan genotipe Godek A adalah kedelai berwarna kuning. Keunggulan kedelai Godek A adalah mempunyai daya hasil tinggi, sedangkan Ceneng belum diketahui keunggulannya selain toleran terhadap naungan.

Pengaruh Tetua Betina

Kedua tetua, F_1 dan F_1 resiproknya (Gambar 1 dan 2) diuji pada naungan 75% untuk diamati ada atau tidak pengaruh tetua betina. Tanaman F_1 dan F_1 resiproknya dari persilangan kedua genotipe tersebut mempunyai karakter warna kedelai hijau kekuningan (Gambar 3). Hal ini menunjukkan bahwa warna kedelai dari tetua 1 tidak dominan terhadap tetua 2 dan sebaliknya.

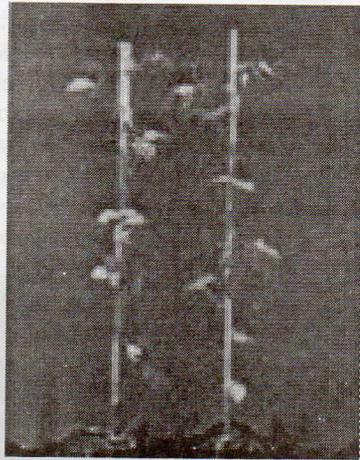


Ceneng

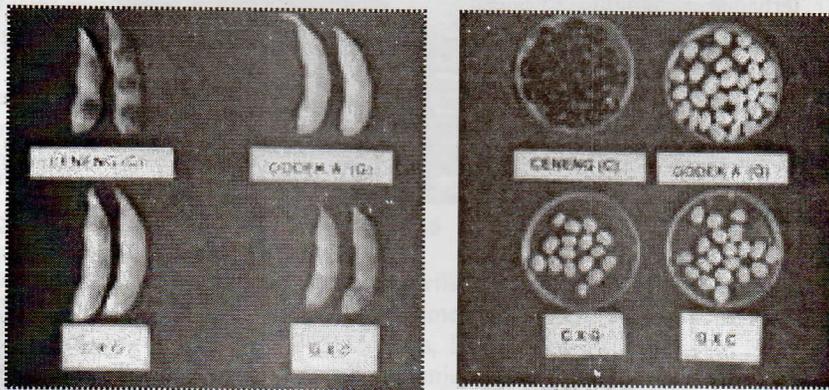


Godek A

Gambar 1. Ceneng dan Godek A dengan perlakuan naungan 0% dan 75%, perlakuan naungan 75% mengalami etiolasi



Gambar 2. Penampilan F₁ Ceneng x Godek A dan F₁ resiproknnya dengan perlakuan naungan 75% .



(a)

(b)

Gambar 3. Biji Kedelai Ceneng, Godek A, F₁ (a) dan resiproknnya (b).

Berdasarkan uji-t yang dilakukan menurut Singh dan Chaudhary (1979) yang ditampilkan pada Tabel 1 menunjukkan bahwa 't' hitung lebih kecil dari pada 't' tabel dengan derajat bebas efektif sesuai dengan keragaman yang ada untuk semua karakter yang diamati, kecuali penguningan daun. Hal ini menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan

nilai antara populasi tanaman F₁ dengan populasi tanaman F₁ resiproknya untuk semua karakter yang diamati, kecuali penguningan daun atau senesens. Berarti tidak ada gen diluar inti yang mempengaruhi pewarisan sifat pada kedelai toleran dan peka terhadap naungan.

Tabel 1. Hasil Uji-T Dari Persilangan Genotipe Ceneng Dan Godek A Berikut Resiproknya

Karakter	P ₁ Ceneng (C)	P ₂ Godek A (G)	t-hitung P ₁ dan P ₂	F ₁ (C x G)	F ₁ resiprok (G x C)	t-hitung F ₁ dan F ₁ resiprok	t-tabel 0,05
Anatomi:							
Klorofil a (mg/g)	1,5216	1,3516	21,7948*	1,4103	1,4108	0,0072	2,101
Morfologi:							
Jumlah cabang produktif	4,1	3,1	245,753*	4,05	4,0	0,2251	

Sumber data : Analisis data primer

Pewarisan sifat kandungan klorofil yang dilakukan oleh Rostini *et al.* (2000) dilaporkan bahwa hasil uji-t antara F₁ dengan F₁ resiproknya tidak ada perbedaan nyata untuk karakter kandungan klorofil maksimum (K_{maks}). Tetapi ada perbedaan pada karakter lama klorofil maksimum (Lk_{maks}) dan retensi klorofil maksimum (RK_{maks}). Dengan demikian menunjukkan bahwa kedua karakter klorofil tersebut dikendalikan oleh gen pada sitoplasma. Lamanya klorofil maksimum menunjukkan karakter klorofil daun yang masa hidupnya lama atau proses degradasinya lambat. Adanya pengaruh sitoplasma pada proses penguningan daun sejalan dengan penelitian Guaimet *et al.* (1990) yang menyebutkan adanya pengaruh gen *CytG* terhadap penguningan daun selain adanya pengaruh gen inti. Suatu karakter dapat dikendalikan oleh gen di dalam inti saja atau gen sitoplasma saja atau oleh keduanya. Untuk memastikan ada tidaknya pengaruh gen inti selain sitoplasma dapat dilihat pada generasi F₂.

Analisis Molekuler AFLP

Teknologi AFLP dapat digunakan untuk membuat peta keterkaitan kedelai melalui penghitungan dari penampakan dua marka fragmen AFLP yang diturunkan bersama dalam populasi. Dalam segregasi populasi yang dihasilkan dari persilangan antara dua galur tetua. Keturunan yang dihasilkan dari persilangan ini adalah generasi pertama atau F₁. Tanaman F₁ mempunyai semua pita DNA dari kedua tetuanya. Pita-pita tersebut mungkin ada dalam satu *copy*, jika hanya satu tetua yang mempunyai pita; atau dua *copy* jika kedua tetua mempunyai pita

Analisis AFLP pada penelitian ini digunakan 3 kombinasi primer (Tabel 2), diantaranya kombinasi primer selektif *EcoRI*-AGT/*MseI*-CAC menghasilkan marka spesifik fragmen 130 pasangan basa. Pada Gambar 19 menunjukkan segregasi pita DNA pada sebuah gel elektriforesis. Pita-pita DNA berwarna biru dan DNA standar berwarna merah. Sistem deteksi multifluorophore dengan menggunakan ABIPrism™ 377 DNA sequencer memudahkan analisis tiga sampel DNA yang dilabel dengan pewarna fluorescense yang berbeda.

Tabel 2. Sequen Nukleotida Dari Adaptor Dan Primer Selektif Yang Digunakan Dalam Penelitian Ini

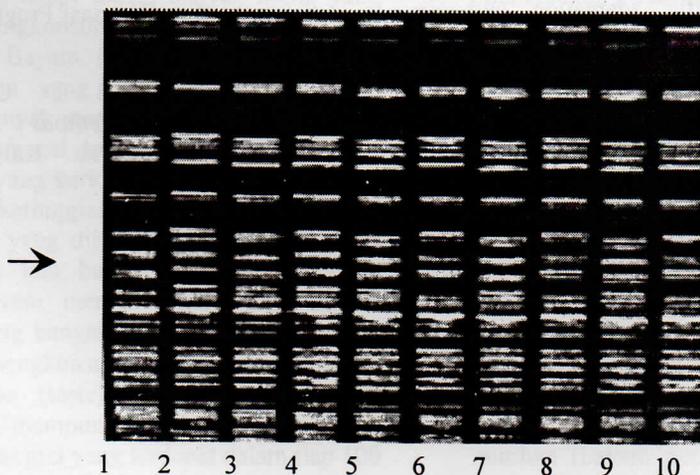
Adapter	<i>MseI</i>	5'-GACGATGATCCTGAG-3' 3'-TACTCAGGACTCAT-5' 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' 3'-CTGACGCATGGTTAA-5'
<i>MseI</i>	<i>EcoRI</i>	3'-CTGACGCATGGTTAA-5'
	M1	5'-GATGAGTCCTGAGTAA-AGT-3' *
	M2	5'-GATGAGTCCTGAGTAA-AGG-3'
<i>EcoRI</i>	M3	5'-GATGAGTCCTGAGTAA-AGC-3'
	M1	5'-ACTGCGTACCAATTC-ACT-3'
	M2	5'-ACTGCGTACCAATTC-CAC-3' *
	M3	5'-ACTGCGTACCAATTC-AAC-3'

*) Primer selektif yang menghasilkan marker spesifik pada DNA genom kedelai toleran terhadap intensitas cahaya rendah.

Pengujian sistem deteksi dapat membedakan multimix reaksi AFLP, tiga sampel DNA dengan label 5-FAM, JOE atau TAMRA dapat dianalisis secara terpisah dalam semua kemungkinan kombinasi. Dengan demikian elektroferogram yang diperoleh dari perangkat Gene Scan™ menunjukkan tidak ada perbedaan dalam mendeteksi puncak dalam observasi komigrasi fragmen menunjukkan perbedaan warna sesuai dengan warna pita pada autoradiogram.

Dalam penelitian ini, satu lajur pada autoradiogram tampak dua warna yaitu warna biru (label 5-FAM) dari sampel DNA dan warna merah

(label ROX size standard) dari DNA standar. Gambar 4 menunjukkan satu contoh hasil penelitian ini yaitu resolusi fragmen AFLP dalam rentang ukuran 60–600 pb. Fragmen-fragmen adalah hasil amplifikasi dari kombinasi primer selektif *EcoRI*-AGT/ *MseI*-ACA menggunakan DNA genom kedelai Godek A sebagai cetakan: (A) Elektroferogram menunjukkan 41 puncak yang dapat dibedakan dari label fragmen AFLP 5-FAM. Skala vertikal menunjukkan signal relatif dari intensitas label fragmen fluorescen. (B) Autoradiogram menunjukkan 41 fragmen AFLP yang dilabel dengan 5-FAM.



Gambar 4. Autoradiogram menunjukkan pita polimorfik yang dideteksi dengan teknik AFLP menggunakan primer selektif (*EcoRI* + AGT) dan (*MseI* +CAC), fragmen warna biru 1-10: Godek A (peka), Ceneng (toleran), F₁ (Godek A x Ceneng), F₁ resiproknya, BCP₁ toleran, BCP₁ peka, BCP₂ toleran, BCP₂ peka, F₂ (Godek A x Ceneng) toleran, F₂ peka. Lajur genotipe toleran menunjukkan marker spesifik 130 pasang basa (tanda panah). Fragmen warna merah adalah DNA standard (ROX), ukuran pasangan basa dari lajur paling bawah ke atas adalah 100 pb, 125pb, 150 pb dan 200 pb.

KESIMPULAN

Persilangan dilakukan dengan tetua toleran, yaitu genotipe Ceneng dengan pertimbangan bahwa genotipe ini mempunyai keunggulan konsisten toleran terhadap intensitas cahaya rendah. Sedangkan tetua peka ditentukan genotipe Godek A dengan pertimbangan bahwa genotipe ini konsisten peka terhadap intensitas cahaya rendah dan mempunyai keunggulan produksi tinggi. Pengujian pengaruh tetua betina dengan uji 't' untuk karakter anatomi klorofil *a* dan karakter morfologi jumlah cabang produktif tidak menunjukkan perbedaan nyata. Tidak ditemukan perbedaan marka pada pita polomorfik DNA F₁ dan F₁' yang dideteksi dengan teknik AFLP. Dengan demikian maka dalam percobaan selanjutnya dapat digunakan salah satu dari hibrid F₁ atau resiproknya.

DAFTAR PUSTAKA

- Austin, R B. 1933. Augumenting yield-based selection. *In: Plant Breeding: Principles and Prospect*. M D Hayward, N O Bosemark and I Romagosa (Eds.) Chapman and Hall, London.
- Ceccarelli, S. 1994. Specific adaptation and breeding for marginal conditions. *Euphytica* 77:205-219.
- Elfarisna. 2000. *Adaptasi Kedelai terhadap Naungan: Studi Morfologi dan Anatomi*. Tesis Magister Sains, Pascasarjana IPB.
- Guaimet, J. J., J. A. Terri, and L. D. Nooden. 1990. Effects of nuclear and cytoplasmic genes altering chlorophyll loss on gas exchange during monocarpic senescence in soybean. *Plant Cell Physiol.* 31(8):1123-1130. Abstract.
- Hartana, A. 1992. *Genetika Tumbuhan*. Dept. Pendidikan dan Kebudayaan. Dit Jend. Pendidikan Tinggi. PAU Ilmu Hayat. IPB.
- Junaidi, S. Sastrosumarjo, D. Sopandie, dan Suwarno. 1999. *Studi genetik pewarisan sifat toleransi naungan padi gogo (Oryza sativa L.)*. Tesis Magister Sains Program Pascasarjana IPB.
- Mohr, H. and P. Scooper. 1995. *Plant Physiology*. Translated by Gudrun and D W Lawlor. Springer.
- Rostini, N., A. Baihaki, R. Setiamihardja, dan G. Suryatmana. 2000. Pewarisan Karakter Kandungan Klorofil Pada Kedelai. *Zuriat Vol. 11, No. 2. PERIPI*. Fakultas Pertanian UNPAD. Sumedang, Jawa Barat.
- Sahardi. 2000. *Studi karakteristik anatomi dan morfologi serta pewarisan sifat toleransi terhadap naungan pada padi gogo (Oryza sativa L.)*. Disertasi Program Pascasarjana IPB.
- Singh, R. K. and B. D. Chaudary. 1979. *Biometrical Methods in Quantitative Genetics Analysis*. Kalyani Publishers. New Delhi.