

Keragaman Genetik 50 Aksesori Plasma Nutfah Kedelai Berdasarkan Sepuluh Penanda Mikrosatelit

Chaerani*, Nurul Hidayatun, dan Dwinita W. Utami

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111
Telp. (0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820; *E-mail: chaeran1@yahoo.com

Diajukan: 1 Maret 2011; Diterima: 25 Agustus 2011

ABSTRACT

Genetic Diversity of 50 Soybean Accessions Based on Ten Microsatellite Markers. *Chaerani, Nurul Hidayatun, and Dwinita W. Utami.* Soybean accessions in germplasm collection have increased in number as a result of exploration, introduction as well as development or release of new commercial varieties. This complicates accurate and reliable evaluation of an accession for purposes of utilization in breeding program and discrimination of a new commercial variety for purposes of plant variety protection. The aims of this study were to identify the genetic diversity of soybean germplasm to complement the existing phenotypic database as the basis for efficient management and accurate discrimination of commercial varieties, and to identify potential parents for hybridizations. Fifty soybean accessions consisting of 12 released varieties, 32 local varieties, and 6 introductions were analyzed using microsatellite DNA markers based on semi-automatic sizing system. A total of 86 alleles were detected with the number of alleles per locus ranged from 4 to 16. Rare alleles were detected at a rate of 53% which was shown by 68% of the genotypes. Informativeness of the microsatellite markers as measured by the average gene diversity (D) or polymorphism information content (PIC) was 0.60 and 0.58, respectively. A heterozygosity level of 0.09 as detected by seven loci was observed among 64% of the genotypes. The average genetic distance among the genotypes was 0.56, which indicated the relatively low polymorphism among the analyzed soybean germplasm. Four microsatellites that showed a high D or PIC value (over 0.75) were able to discriminate between accession reliably. Each soybean accession had different DNA microsatellite fingerprint which can be used for accurate discrimination to complement the previous conventional characterizations. UPGMA clustering separated the 50 accessions into 10 major clusters, which showed no clear pattern of clustering according to varietal group or geographical origin. Genetic similarity data identified five clusters and 15 genotypes with highest inter-cluster or inter-genotype genetic distances which are potential candidates to be exploited as parents in hybridizations for development of new commercial varieties.

Keywords: DNA fingerprinting, microsatellite, automatic sizing, soybean genetic diversity, variety identification, genetic improvement.

ABSTRAK

Keragaman Genetik 50 Aksesori Plasma Nutfah Kedelai Berdasarkan Sepuluh Penanda Mikrosatelit. *Chaerani, Nurul Hidayatun, dan Dwinita W. Utami.* Koleksi plasma nutfah kedelai semakin bertambah akibat hasil eksplorasi, introduksi, maupun perakitan atau pelepasan varietas baru. Penambahan jumlah aksesori akan semakin menyulitkan evaluasi aksesori untuk tujuan pemanfaatan dalam program pemuliaan dan diskriminasi varietas unggul untuk tujuan perlindungan varietas tanaman secara akurat dan terpercaya jika hanya berlandaskan pada karakter-karakter fenotipik. Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi keragaman genetik plasma nutfah kedelai untuk melengkapi pangkalan data karakter konvensional yang sudah ada sebagai dasar pengelolaan plasma nutfah secara efisien dan diskriminasi varietas-varietas unggul nasional secara akurat, serta identifikasi calon tetua persilangan yang potensial. Lima puluh aksesori kedelai yang terdiri dari 12 varietas unggul nasional, 32 varietas lokal, dan 6 aksesori introduksi dianalisis berdasarkan DNA mikrosatelit menggunakan metode deteksi semi-otomatik. Sebanyak 86 alel terdeteksi dengan jumlah alel per lokus berkisar antara 4 sampai 16. Alel-alel jarang terdeteksi sebanyak 53% yang diperlihatkan oleh 68% genotipe. Rata-rata nilai keinformatifan penanda mikrosatelit, yang diukur berdasarkan keragaman gen (D) atau *polymorphism information content* (PIC), berturut-turut 0,60 dan 0,58. Tingkat heterosigositas sebesar 0,09 terdeteksi oleh 7 lokus mikrosatelit dan teramati pada 64% genotipe. Rata-rata jarak genetik antar genotipe adalah 0,56, yang menunjukkan polimorfisme yang relatif rendah di antara plasma nutfah kedelai yang dianalisis. Masing-masing aksesori kedelai memiliki sidik jari DNA mikrosatelit yang berbeda satu sama lain sehingga berguna untuk diskriminasi sebuah varietas secara lebih akurat melengkapi data karakterisasi secara konvensional yang sudah ada. Empat lokus dengan nilai keinformatifan tinggi (nilai D atau PIC lebih dari 0,75) dapat digunakan untuk membedakan antar aksesori. Analisis UPGMA memisahkan ke-50 aksesori ke dalam 10 gerombol utama, yang tidak terkait dengan kelompok varietas atau asal lokasinya. Data kesamaan genetik mengidentifikasi lima gerombol dan 15 genotipe yang berjarak genetik berjauhan antar gerombol atau antar genotipe, sehingga potensial digunakan sebagai calon tetua persilangan dalam perakitan varietas unggul baru.

Kata kunci: Sidik jari DNA, mikrosatelit, deteksi otomatis, keragaman genetik kedelai, identifikasi varietas, perbaikan genetik.

PENDAHULUAN

Plasma nutfah tanaman merupakan sumber genetik untuk perakitan varietas unggul. Karakterisasi, evaluasi, dan pengarsipan dalam pangkalan data dilakukan untuk mempermudah pemanfaatannya dalam program pemuliaan tanaman. Kedelai dikenal sebagai salah satu komoditas pangan penting di Indonesia sehingga penelitian tentang kedelai termasuk dalam prioritas penelitian tanaman pangan. Bank gen plasma nutfah tanaman pangan Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian misalnya, memiliki 900 aksesori plasma nutfah kedelai yang 771 di antaranya sudah didokumentasi dalam pangkalan data berikut keragaman karakter morfologinya berdasarkan 28 deskriptor (Kurniawan *et al.*, 2005). Jumlah koleksi ini diprediksi akan semakin meningkat seiring dengan dilakukannya eksplorasi secara rutin maupun introduksi. Deskripsi yang lebih akurat dan lengkap serta pengetahuan mendalam tentang pola keragaman genetik kedelai berguna untuk seleksi tetua sebagai bahan material genetik dalam program perbaikan varietas dalam rangka pembentukan varietas kedelai komersial (Thompson *et al.*, 1998).

Perlindungan varietas tanaman memungkinkan para pemulia mendapatkan proteksi varietasnya secara hukum dari eksploitasi secara komersial oleh pihak lain (Rongwen *et al.*, 1995). Sebuah varietas dianggap baru jika menunjukkan perbedaan dengan varietas-varietas lainnya di dalam spesies tersebut. Kebanyakan varietas kedelai komersial berasal dari persilangan antar genotipe-genotipe kedelai elit, yang mana variasi genetik antar genotipe-genotipe ini sangat sempit. Sebagai akibatnya, varietas-varietas baru seringkali tidak dapat dibedakan berdasarkan karakter konvensional (Diwan dan Cregan, 1997). Semakin banyak varietas baru yang didaftarkan, perbedaan varietas-varietas baru secara morfologi dengan varietas yang telah ada akan semakin sulit dilakukan secara morfologi. Terlebih lagi, kebanyakan deskriptor didasarkan pada karakter fenotipik yang dikendalikan oleh banyak gen, bersifat kuantitatif, dan ekspresinya sangat dipengaruhi oleh faktor-faktor lingkungan, sehingga diperlukan uji rumah kaca dan lapang yang ekstensif (Bredemeijer *et al.*, 2002).

Sistem identifikasi berdasarkan penanda DNA dapat menyediakan profil unik atau sidik jari dari setiap varietas yang sangat diperlukan dalam perlindungan varietas bagi pemulia (Diwan dan Cregan, 1997). Penanda mikrosatelit memiliki peluang yang sangat baik sebagai alat identifikasi varietas karena bersifat polimorfik sehingga lebih informatif dibandingkan de-

ngan penanda-penanda molekuler lainnya, di samping itu, ketersediaannya melimpah dalam genom, diwariskan secara kodominan, serta mudah diamplifikasi dengan teknik PCR (Diwan dan Cregan, 1997).

Pembacaan ukuran alel mikrosatelit secara semi-otomatik menggunakan primer berlabel warna fluoresens pada alat *genetic analyzer*, yang dikombinasi dengan analisis hasil amplifikasi PCR beberapa primer mikrosatelit yang berbeda secara sekaligus dalam satu reaksi (*multiloading*), dapat meningkatkan efisiensi, akurasi, dan kecepatan analisis keragaman alelik mikrosatelit (Jain *et al.*, 2004). Schuelke (2000) memodifikasi sistem deteksi ini dengan meletakkan label fluoresens pada primer ketiga, yaitu primer universal M-13, dalam amplifikasi PCR untuk menekan biaya analisis. Sistem yang dimodifikasi ini telah diadopsi oleh Chaerani *et al.* (2009) untuk pengembangan set panel produk-produk PCR primer mikrosatelit (set panel *multiloading*) komoditas padi dan kedelai.

Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi keragaman genetik 50 aksesori plasma nutfah kedelai untuk melengkapi pangkalan data karakter konvensional yang sudah ada sebagai dasar pengelolaan plasma nutfah secara efisien dan diskriminasi varietas-varietas unggul nasional secara akurat, serta identifikasi calon tetua persilangan yang potensial untuk perakitan varietas unggul baru. Keragaman genetik dianalisis berdasarkan 10 DNA mikrosatelit yang terletak pada 10 kromosom kedelai yang belum dipilih oleh Santoso *et al.* (2006) dengan menggunakan sistem deteksi semi-otomatik.

BAHAN DAN METODE

Plasma Nutfah Kedelai dan Isolasi DNA

Lima puluh aksesori plasma nutfah kedelai dipilih secara acak dari koleksi Bank Gen Plasma Nutfah Tanaman Pangan BB-Biogen. Ke-50 aksesori tersebut terdiri dari 12 varietas unggul nasional, 32 varietas lokal, dan 6 varietas introduksi (Tabel 1). Dari setiap aksesori 10 benih ditanam dalam *polybag*. Tanaman dipelihara hingga umur 4 sampai 6 minggu.

DNA diisolasi dalam skala miniprep dari daun-daun muda yang diperoleh dari 10 tanaman menggunakan bufer ekstraksi *hexadecyltrimethylammonium bromide* (CTAB) sesuai prosedur dari Lab Doyle (Santoso *et al.*, 2006). DNA dilarutkan dalam bufer TE (pH 8,0) kemudian dielektroforesis pada gel agarose 0,8-1%. Setelah gel direndam dalam larutan ethidium bromida, DNA divisualisasi dengan alat ChemiDoc XRS (Bio-Rad) untuk dicek kualitas dan kuantitasnya.

Tabel 1. Daftar 50 aksesi plasma nutfah kedelai yang dianalisis.

No.	No. aksesi	Nama	Kelompok varietas	Asal
1.	B-3460	Wilis	Unggul	
2.	B-3464	Lompobatang	Unggul	
3.	B-1343	Orba	Unggul	
4.	B-4363	Bromo	Unggul	
5.	B-4385	Burangrang	Unggul	
6.	B-4424	Kaba	Unggul	
7.	B-3463	Lokon ¹	Unggul	
8.	B-4435	Muria	Unggul	
9.	B-3468	Lawu	Unggul	
10.	B-3513	No. 29 ¹	Unggul	
11.	B-4116	Pangrango	Unggul	
12.	B-4426	Sinabung ¹	Unggul	
13.	B-902A	Bali-A	Lokal	Bali
14.	B-3693	Lokal Tabanan	Lokal	Tabanan, Bali
15.	B-1340	Davros x 945/0/0/2	Lokal	Bogor, Jawa Barat
16.	B-467	F94	Lokal	Bogor, Jawa Barat
17.	B-4305	Lokal Bogor	Lokal	Bogor, Jawa Barat
18.	B-609	Pop x Zwart. 20	Lokal	Bogor, Jawa Barat
19.	B-4215	17/4/20/1/0	Lokal	Sukamandi, Jawa Barat
20.	B-4217	17/9/3/8/0	Lokal	Sukamandi, Jawa Barat
21.	B-4340	GM 216 Si	Lokal	Sukamandi, Jawa Barat
22.	B-4396	GM 2782 Si	Lokal	Sukamandi, Jawa Barat
23.	B-4382	GM 2841 Si	Lokal	Sukamandi, Jawa Barat
24.	B-4127	Crb-2	Lokal	Cirebon, Jawa Barat
25.	B-1630	Davros Lokal	Lokal	Garut, Jawa Barat
26.	B-3442	Lumut	Lokal	Tegal Gondo, Jawa Tengah
27.	B-1957	Moket	Lokal	Jawa Timur
28.	B-3478	Lokal Jatim	Lokal	Jawa Timur
29.	B-3592	M 2667	Lokal	Madiun, Jawa Timur
30.	B-3674	Lokal Tuban	Lokal	Tuban, Jawa Timur
31.	B-3668	M 2797	Lokal	Blitar, Jawa Timur
32.	B-4328	M 3109	Lokal	Malang, Jawa Timur
33.	B-3649	Lokal Jember	Lokal	Jember, Jawa Timur
34.	B-3650	Lokal Jember	Lokal	Jember, Jawa Timur
35.	B-3654	Lokal Jember	Lokal	Jember, Jawa Timur
36.	B-3656	Lokal Jember	Lokal	Jember, Jawa Timur
37.	B-3488	Manalagi	Lokal	Jember, Jawa Timur
38.	B-3498	Kretek Balap	Lokal	Jember, Jawa Timur
39.	B-3607	Lokal Tulung Agung	Lokal	Tulung Agung, Jawa Timur
40.	B-3625	Lokal Bangkalan	Lokal	Bangkalan, Jawa Timur
41.	B-3623	Lokal Sumenep	Lokal	Sumenep, Jawa Timur
42.	B-1396	16BB	Lokal	Daerah Istimewa Yogyakarta
43.	B-3395	Gabil	Lokal	Gunung Kidul, Daerah Istimewa Yogyakarta
44.	B-3659	M 2787	Lokal	Samarinda, Kalimantan Timur
45.	B-906	Avoyelles 17193	Introduksi	Australia
46.	B-3956	AVRDC 8310	Introduksi	Taiwan
47.	B-1446	Bon Minori	Introduksi	Jepang
48.	B-4191	BR40	Introduksi	Brazil
49.	B-1958	Columbus	Introduksi	Amerika Serikat
50.	B-1731	Hampton	Introduksi	Nigeria

¹Benih diperoleh dari Dr. Muchlis Adie dan Dr. Rudy Soehendi (Balitkabi), sisanya disediakan oleh Dr. Asadi (BB-Biogen).

Primer Mikrosatelit dan Amplifikasi PCR

Sepuluh penanda mikrosatelit dipilih yang terpetakan pada lokus tunggal sehingga variasi panjang mikrosatelit dapat dianggap sebagai alel (Tabel 2). Ke-10 mikrosatelit memiliki motif pengulangan trinucleotida dengan nilai *polymorphic informative content* (PIC) >0,6 (Rongwen *et al.*, 1995; Narvel *et al.*, 2000). Urutan basa primer-primer mikrosatelit ini dapat di-

lihat pada <http://soybean.org/resources/ssr.php>. DNA tiap aksesi diamplifikasi secara terpisah menggunakan primer *forward* yang sudah ditambah dengan utasan primer M13 sebagai adapter, primer *reverse*, dan primer universal M13 berlabel fluoresens pada tiap reaksi menggunakan prosedur seperti diuraikan dalam Chaerani *et al.* (2009). Reaksi amplifikasi dilakukan dalam volume 20 µl pada mesin PCR (Biometra T1).

Tabel 2. Kisaran ukuran alel (pasang basa, pb), jumlah total alel, heterosigositas (H), nilai diversitas gen (D), dan nilai *polymorphic information content* (PIC) dari 10 lokus mikrosatelit yang diuji pada 50 aksesori plasma nutfah kedelai.

Panel <i>multi-loading</i>	Lokus	Label fluoresen	Kelompok pautan (kromosom)	Kisaran ukuran alel (pb)	Jumlah alel total	Jumlah alel umum dan ukurannya (pb) ¹	Jumlah alel jarang dan ukurannya (pb) ²	D	PIC	H
1	Satt142	D2 (hitam)	H (12)	165-172	4	1 (166)	1 (168)	0,53	0,48	0,00
	Satt143	D3 (hijau)	B1 (19)	131-139	4	1 (289)	2 (250, 290)	0,24	0,23	0,04
	Sct026	D3 (hijau)	L (11)	250-292	6	1 (132)	3 (131, 135, 139)	0,38	0,36	0,00
2	Satt002	D4 (biru)	D2 (17)	134-164	13	0	7 (134, 135, 143, 150, 152, 163, 164)	0,86	0,85	0,06
	Satt005	D2 (hitam)	D1b+W (2)	108-183	12	0	7 (108, 128, 147, 172, 180, 181, 183)	0,83	0,82	0,03
	Satt063	D3 (hijau)	B2 (14)	119-165	7	1 (123)	5 (119, 121, 122, 146, 152)	0,38	0,36	0,04
3	Sct028	D4 (biru)	C2 (6)	106-161	16	0	10 (106, 110, 127, 133, 137, 149, 151, 153, 155, 161)	0,89	0,89	0,02
	Satt042	D2 (hitam)	A1 (5)	145-194	5	1 (145)	1 (194)	0,52	0,49	0,44
	Satt263	D3 (hijau)	E (15)	220-265	8	1 (227)	3 (228, 264, 265)	0,58	0,56	0,00
	Satt571	D4 (biru)	I (20)	136-176	11	1 (147)	7 (136, 145, 148, 156, 160, 163, 176)	0,78	0,75	0,24
Rata-rata					8,6	0,7	4,6	0,60	0,58	0,09

¹Alel umum adalah alel dengan frekuensi >0,30 dari seluruh genotipe yang dianalisis, ²Alel jarang adalah alel dengan frekuensi <0,05 dari seluruh genotipe yang dianalisis.

Deteksi Fragmen Mikrosatelit

Fragmen mikrosatelit dideteksi pada mesin *genetic analyzer* (Beckman Coulter® CEQ-8000). Produk PCR dari setiap primer diencerkan dalam *sample loading solution* (SLS, Beckman Coulter®) kemudian dicampur dengan produk PCR dari beberapa primer lainnya (*multiloading*) sesuai dengan set panel yang telah dirancang sebelumnya (Chaerani *et al.*, 2009). Perbandingan campuran antar produk PCR mengikuti prosedur yang diuraikan dalam Chaerani *et al.* (2009). *Genetic analyzer* dijalankan menggunakan program Frag-1 (suhu kapiler 35°C, injeksi pada 2,0 kV selama 30 detik, denaturasi pada 90°C selama 120 detik dan separasi pada 7,5 kV selama 35 menit).

Analisis Data

Ukuran fragmen DNA diolah dengan CEQ *Fragment Analysis Software* untuk pengelompokan (*binning*) berdasarkan motif pengulangan mikrosatelit. Ukuran alel dibulatkan ke bilangan bulat terdekat. Kedelai adalah spesies menyerbuk sendiri, sehingga seharusnya hanya ada satu alel yang terdeteksi per lokus mikrosatelit pada tiap genotipe. Akan tetapi pada beberapa genotipe juga terdeteksi dua alel dengan ukuran berbeda per lokus. Data hasil *binning* diskor secara kodominan, di mana genotipe dengan satu alel pada sebuah lokus diskor "2", sedangkan genotipe dengan dua alel berukuran berbeda diskor "1" untuk masing-masing alel. Frekuensi alel dihitung menggunakan program PowerMarker V3.25 (Liu dan Muse, 2005). Data frekuensi alel digunakan untuk menghitung kesamaan genetik antar genotipe berdasarkan metode Nei (1973) yang kemudian digunakan untuk penggerombolan aksesori berdasarkan *unweighted pair-group method for arithmetic average* (UPGMA). Kedua

metode perhitungan ini terdapat pada program PowerMarker V3.25. Hubungan antar genotipe berdasarkan matriks kesamaan genetik dan pengelompokan UPGMA divisualisasi sebagai dendrogram menggunakan program TreeView 1.6.6 (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html>). Kemampuan sebuah lokus dalam membedakan genotipe diukur berdasarkan nilai keragaman gen atau keragaman penanda (*gene/marker diversity*, D), *polymorphism information content* (PIC), dan heterosigositas (H), yang juga dihitung menggunakan program PowerMarker V3.25.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Keragaman Alel Mikrosatelit

Jumlah alel

Sebanyak 86 alel terdeteksi di antara ke-50 varietas kedelai dengan jumlah yang bervariasi pada tiap lokus, dari 4 (Satt142 dan Satt143) hingga 16 (Sct028), dengan rata-rata 9 alel per lokus (Tabel 2). Hal ini berarti ke-10 lokus mikrosatelit yang digunakan mempunyai tingkat polimorfisme tinggi di antara kelima puluh varietas kedelai meskipun tidak ada kerabat liar yang dianalisis. Tingkat polimorfisme ini sebanding dengan yang dilaporkan oleh Akkaya *et al.* (1992) di antara 43 genotipe varietas kedelai dan kerabat liarnya di mana sebanyak 8 alel per lokus mikrosatelit terdeteksi. Maughan *et al.* (1995) bahkan mendeteksi total 79 alel dengan hanya menggunakan 5 lokus mikrosatelit di antara 94 varietas kedelai dan kerabat liarnya. Karena tingkat polimorfismenya yang tinggi, sebuah lokus mikrosatelit akan polimorfik bahkan pada populasi hasil hibridisasi genotipe yang telah teradaptasi. Jumlah alel total untuk tiap kelompok varietas adalah 32 untuk varietas introduksi ($n = 6$), 58 untuk varietas unggul

($n = 13$), dan 66 untuk varietas lokal ($n = 31$). Data ini menunjukkan bahwa dengan meningkatnya jumlah aksesi yang dianalisis, jumlah alel juga meningkat, seperti yang juga dilaporkan oleh Wang *et al.* (2005). Perbandingan jumlah alel antar kelompok varietas akan lebih bermakna jika tiap kelompok varietas memiliki jumlah anggota yang sama.

Kisaran ukuran alel tersempit ditunjukkan Satt142 (6 pasang basa, pb), sedangkan yang terluas ditunjukkan Satt005 (75 pb). Kisaran ukuran alel pada sebuah lokus berkorelasi positif tetapi tidak signifikan dengan jumlah alel pada lokus bersangkutan ($r = 0,48$; $P > 0,05$). Jain *et al.* (2004) juga melaporkan korelasi positif antara kisaran ukuran alel dengan jumlah alel yang dihasilkan sebuah lokus mikrosatelit padi.

Alel umum dan jarang

Tujuh alel (8%) dari tujuh lokus (Satt142, Satt143, Sct026, Satt063, Satt042, Satt263, Satt571) merupakan alel umum, yaitu yang frekuensi terdeteksinya $> 30\%$ pada semua genotipe (Tabel 2). Sebanyak 58% geno-

tipe berbagi alel umum. Jumlah alel per lokus berkorelasi negatif tetapi signifikan dengan frekuensi alel umum pada sebuah lokus ($r = -0,93$; $P < 0,001$).

Semua lokus mikrosatelit mendeteksi alel-alel jarang, yaitu yang frekuensi terdeteksinya $< 5\%$ dari seluruh genotipe yang dianalisis, sebanyak 46 alel atau 53% dari seluruh alel (Tabel 2). Alel-alel *intermediate* ($5\% \leq \text{frekuensi} \leq 30\%$) dan alel-alel umum mencapai 41% dari seluruh alel yang diperoleh. Sct028 menghasilkan paling banyak alel tetapi tidak satupun merupakan alel umum. Alel-alel jarang ditampilkan oleh 68% varietas (Tabel 3). Santoso *et al.* (2006) melaporkan sebanyak 58 alel jarang di antara ke-96 genotipe kedelai yang dianalisisnya. Jumlah alel per lokus dan frekuensi alel jarang berkorelasi positif dan sangat signifikan ($r = 0,94$; $P < 0,001$); kecenderungan yang sama juga dilaporkan oleh Jain *et al.* (2004) pada plasma nutfah padi yang dianalisisnya.

Sebagian besar alel-alel jarang (86%) juga merupakan alel spesifik, yaitu alel yang dimiliki oleh sebuah genotipe tertentu, dan terdeteksi dengan propor-

Tabel 3. Plasma nutfah kedelai yang terdeteksi mengandung alel jarang dan spesifik (bergaris bawah)¹.

No.	Varietas	Kelompok	Lokus mikrosatelit dan ukuran alel spesifik (pasang basa, pb)
1.	Bromo	Unggul	<u>Satt063 (119)</u> , Sct028 (151)
2.	Burangrang	Unggul	<u>Satt005 (180)</u> , Satt063 (146)
3.	Lawu	Unggul	<u>Satt002 (164)</u>
4.	No. 29	Unggul	<u>Satt002 (143)</u>
5.	Pangrango	Unggul	Sct028 (149)
6.	Sinabung	Unggul	<u>Satt142 (168)</u> , Satt143 (290), <u>Sct026 (131)</u> , <u>Satt005 (147)</u> , <u>Satt063 (122)</u> , <u>Satt571 (148)</u>
7.	16BB	Lokal	<u>Satt005 (183)</u> , <u>Satt571 (163)</u>
8.	Bali-A	Lokal	<u>Satt143 (290)</u> , <u>Satt571 (176)</u>
9.	Crb-2	Lokal	<u>Satt571 (136)</u> , <u>Sct028 (127)</u>
10.	Davros Lokal	Lokal	<u>Satt571 (145)</u> , <u>Sct028 (161)</u>
11.	Davros x 945/0/0/2	Lokal	<u>Satt005 (172)</u>
12.	F94	Lokal	<u>Satt063 (152)</u>
13.	Gabil	Lokal	<u>Satt263 (228)</u>
14.	GM 216 Si	Lokal	<u>Satt005 (183)</u> , <u>Sct028 (106)</u>
15.	GM 2782 Si	Lokal	<u>Satt063 (146)</u>
16.	GM 2841 Si	Lokal	<u>Sct026 (135)</u> , Satt002 (135)
17.	Kretek Balap	Lokal	<u>Satt002 (152)</u>
18.	Lokal Bogor	Lokal	<u>Sct028 (153)</u>
19.	Lokal Bangkalan	Lokal	<u>Satt005 (181)</u>
20.	Lokal Jember B3649	Lokal	<u>Sct026 (139)</u>
21.	Lokal Jember B3654	Lokal	<u>Sct028 (155)</u>
22.	Lokal Jember B3656	Lokal	<u>Sct028 (133)</u>
23.	Lokal Sumenep	Lokal	<u>Satt002 (134)</u>
24.	Lokal Tabanan	Lokal	<u>Satt042 (194)</u> , <u>Satt571 (160)</u>
25.	Lokal Tuban	Lokal	<u>Satt143 (250)</u> , Sct028 (137)
26.	Lumut	Lokal	<u>Satt263 (264)</u> , Sct028 (151)
27.	M 2667	Lokal	<u>Satt063 (121)</u>
28.	M 2797	Lokal	<u>Satt002 (150)</u>
29.	M 3109	Lokal	<u>Satt005 (108)</u> , Sct028 (137)
30.	17/4/20/1/0	Lokal	<u>Satt002 (134)</u>
31.	Avoyelles 17193	Introduksi	<u>Satt002 (163)</u> , <u>Satt263 (265)</u>
32.	AVRDC 8310	Introduksi	<u>Sct028 (149)</u>
33.	Bon Minori	Introduksi	<u>Satt005 (128)</u> , Satt063 (121), <u>Sct028 (110)</u>
34.	BR40	Introduksi	<u>Satt571 (156)</u>

¹Alel jarang adalah alel dengan frekuensi $< 0,05$ dari seluruh genotipe yang dianalisis, sedangkan alel spesifik adalah alel jarang yang terdeteksi hanya pada genotipe tertentu.

si 43% dari total alel. Jumlah alel spesifik terbanyak terdapat pada kelompok varietas lokal (23), disusul oleh kelompok varietas unggul (9) dan introduksi (5) (Tabel 3). Satu aksesori dapat memiliki lebih dari satu alel spesifik dari lokus mikrosatelit berbeda. Varietas Sinabung memiliki jumlah alel spesifik terbanyak (5) (Tabel 3).

Adanya alel-alel jarang ini, bahkan pada varietas unggul yang telah teradaptasi, dapat disebabkan oleh adanya mutasi pada lokus mikrosatelit, yang diperkirakan terjadi pada laju 10^{-5} sampai 10^{-4} per generasi (Diwan dan Cregan, 1997). Alel-alel ini dapat menjadi penciri suatu varietas sehingga sangat berguna untuk keperluan sidik jari varietas (Jain *et al.*, 2004). Genotipe-genotipe dengan alel jarang dapat menjadi sumber keragaman genetik baru untuk pemuliaan dan perbaikan genetik kedelai, terlebih bila alel-alel tersebut berkaitan dengan karakter agronomik penting ataupun ketahanan terhadap cekaman biotik dan abiotik (Narvel *et al.*, 2000; Santoso *et al.*, 2006).

Nilai Keinformatifan Penanda Mikrosatelit. Nilai D , yang dihitung berdasarkan frekuensi dan jumlah alel, berkisar antara 0,20 (Satt143) sampai 0,90 (Sct028) dengan rata-rata 0,58 (Tabel 2). Nilai PIC tiap lokus menunjukkan kecenderungan yang serupa tetapi lebih rendah daripada nilai D . Rongwen *et al.* (1995) menyatakan bahwa D sama dengan PIC atau indeks polimorfisme (*polymorphism index*) yang dimaksud oleh beberapa peneliti lain. Nilai D maupun PIC berkorelasi positif dan signifikan dengan jumlah alel, berturut-turut dengan koefisien korelasi (r) 0,90 ($P < 0,001$) dan 0,92 ($P < 0,001$). Kesepuluh lokus mikrosatelit telah dipilih berdasarkan informasi nilai keragaman yang tinggi ($> 0,60$) dari penelitian sebelumnya (Rongwen *et al.*, 1995; Narvel *et al.*, 2000), tetapi rata-rata nilai D yang diperoleh pada penelitian ini lebih rendah. Santoso *et al.* (2006), yang menganalisis lebih banyak genotipe kedelai dengan menggunakan 10 lokus mikrosatelit yang berbeda, mendapatkan tingkat keragaman penanda mikrosatelit yang lebih tinggi ($D = 0,74$ dan $PIC = 0,70$). Perbedaan nilai keragaman penanda antar penelitian-penelitian tersebut menunjukkan bahwa pilihan varietas yang dianalisis akan berpengaruh pada tinggi rendahnya nilai keragaman penanda (Bredemeijer *et al.*, 2002).

Berdasarkan nilai D atau PIC, maka tiga penanda mikrosatelit (Satt143, Sct026, dan Satt063) dianggap kurang informatif. Sct028 yang memiliki nilai D atau PIC tertinggi, yang berarti lokus ini memiliki laju mutasi tinggi dan berpotensi tidak stabil, sulit diskor karena hiperalelik. Namun demikian, penggunaan lokus informatif yang dikombinasikan dengan lokus yang kurang informatif dianjurkan untuk sidik jari dan identifikasi

varietas tanaman (Bredemeijer *et al.*, 2002; Jain *et al.*, 2004). Empat lokus dengan nilai D atau PIC tinggi ($> 0,75$), yaitu Sct028, Satt002, Satt005, dan Satt571, dapat digunakan untuk membedakan antar aksesori pada set 50 aksesori yang dianalisis dalam penelitian ini. Analisis diskriminasi terhadap lebih banyak aksesori akan memerlukan lebih banyak lokus, yang bilamana perlu masih harus ditambah beberapa lokus lagi. Bredemeijer *et al.* (2002), misalnya, menggunakan dua lokus tambahan untuk membedakan dua varietas tomat yang semula tidak dapat dibedakan di antara > 500 varietas komersial yang dianalisis dengan menggunakan set baku 20 mikrosatelit.

Keragaman Genotipe Kedelai

Heterosigositas

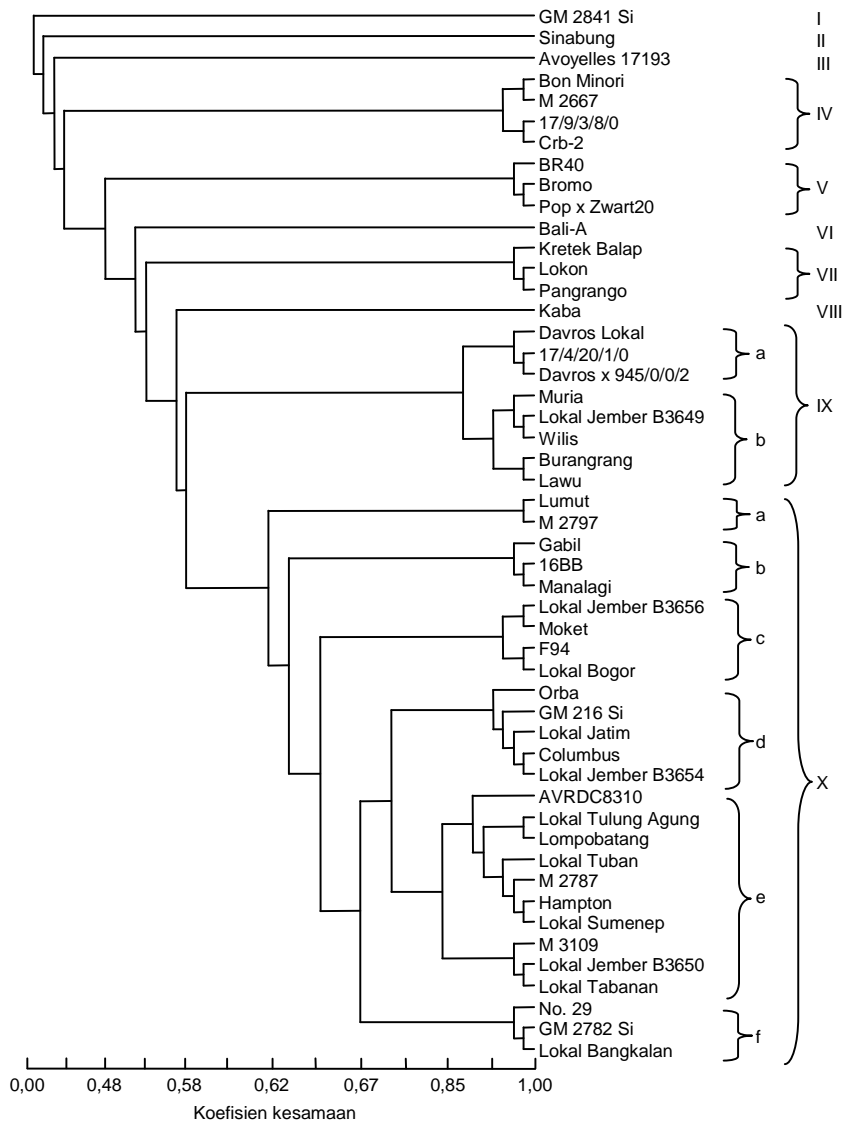
Heterosigositas (H) berkaitan dengan peluang bahwa dua alel yang diambil secara acak dari sebuah populasi dapat dibedakan dengan menggunakan sebuah penanda. Tujuh lokus mikrosatelit dapat membedakan genotipe heterosigot dengan nilai H berkisar antara 0,02 (Sct028) hingga 0,44 (Satt042; Tabel 2). Rata-rata tingkat heterosigositas yang lebih rendah (0,03), yang dideteksi oleh tujuh dari 10 lokus mikrosatelit yang dianalisis, dilaporkan juga oleh Santoso *et al.* (2006), yaitu tiga puluh dua genotipe (64%) heterosigot pada satu atau dua lokus. Heterosigositas bahkan terdeteksi pada varietas unggul, seperti Burangrang, Lawu, Lokon, Lompobatang, Muria, Orba, Sinabung, dan Wilis, atau 16% dari se-luruh genotipe yang dianalisis. Kelompok varietas lokal adalah yang paling heterosigot (38% dari seluruh genotipe yang dianalisis), sedangkan kelompok varietas introduksi memiliki tingkat heterosigositas hanya 10%. Dua puluh dua varietas di antara yang heterosigot ini juga memiliki alel-alel jarang.

Heterosigositas pada kedelai masih dapat terjadi sebagai akibat dari (i) hasil penyerbukan silang secara alami, yang diperkirakan mencapai 0,5% pada kedelai (Bai dan Gai, 2002 *dalam* Wang *et al.*, 2005), (ii) mutasi pada lokus mikrosatelit yang diperkirakan terjadi pada laju 2×10^{-4} atau 0,8 alel baru per pedigree apabila menggunakan 20 lokus mikrosatelit (Diwan dan Cregan, 1997), (iii) sisa heterosigositas (*residual/remnant heterozygosity*) dari varietas yang bersangkutan (Bredemeijer *et al.*, 2002; Jain *et al.*, 2004), atau (iv) heterogenitas karena tercampurnya benih secara tidak sengaja (Bredemeijer *et al.*, 2002; Jain *et al.*, 2004). Dalam penelitian ini heterosigositas tidak dapat dibedakan dari heterogenitas karena DNA diperoleh dari beberapa individu tanaman. Untuk menjamin akurasi identifikasi varietas Diwan dan Cregan (1997) menyarankan agar DNA diambil dari 30-50 individu

tanaman yang digabung (*bulked*) untuk tiap varietas sebagai prosedur baku sehingga mutasi yang terjadi pada satu individu tanaman tidak mengubah komposisi alelik mikrosatelit dari varietas bersangkutan. Terdeteksinya alel-alel jarang, yang meskipun bernilai tinggi sebagai penanda spesifik genotipe atau karakter tertentu, mengisyaratkan perlunya evaluasi lebih lanjut pada tiap-tiap individu tanaman dari satu varietas untuk mengetahui kemungkinan adanya varietas heterogenus (Bredemeijer *et al.*, 2002; Jain *et al.*, 2004). Jika ditemukan heterogenitas antar individu dalam satu varietas maka diperlukan *selfing* beberapa generasi untuk meningkatkan homogenitas varietas bersangkutan.

Analisis gerombol

Analisis UPGMA membagi kelima puluh genotipe kedelai menjadi 10 gerombol utama pada tingkat kesamaan 61% (Gambar 1). Lima gerombol di antaranya hanya terdiri dari masing-masing satu varietas (Sinabung, Avoyelles 17193, GM 2841 Si, Bali-A, dan Kaba). Gerombol X memiliki kepadatan genotipe tertinggi (27) dan terbagi lagi menjadi enam subgerombol. Gerombol Xd dan e beranggotakan genotipe-genotipe dengan tingkat kesamaan genetik tertinggi (83%). Gerombol IX beranggotakan delapan genotipe yang terbagi lagi menjadi dua subgerombol. Tidak terlihat adanya pola penggerombolan aksesori berdasarkan kelompok varietasnya, kecuali gerombol I dan VI, subgerombol IXa, dan subgerombol Xa-c yang masing-



Gambar 1. Dendrogram hasil pengelompokan 50 aksesori plasma nutfah kedelai berdasarkan UPGMA dari profil alel 10 lokus mikrosatelit.

masing beranggotakan hanya varietas lokal. Karakteristik morfologi juga tidak berkaitan dengan pengelompokan aksesori. Misalnya, genotipe bertipe *semi-determinate* dapat berada dalam satu gerombol dengan yang bertipe *determinate*, atau yang berbunga putih juga berada satu gerombol dengan yang berbunga ungu. Di antara varietas lokal juga tidak terlihat adanya keterkaitan antara genotipe dengan asal daerah. Contohnya enam varietas lokal asal Jember tersebar dalam tiga gerombol, lima varietas asal Sukamandi berada dalam empat gerombol yang berbeda, dan empat varietas lokal asal Bogor menyebar dalam tiga gerombol, tetapi dua varietas di antaranya (F94 dan Lokal Bogor) mempunyai tingkat kesamaan genetik 72% dan berada dalam satu subgerombol. Tidak adanya pola penggerombolan yang jelas ini dapat diakibatkan oleh (i) terbatasnya aksesori plasma nutfah kedelai dan penanda mikrosatelit yang dianalisis sehingga kurang dapat menggambarkan keragaman genetik yang ada, dan (ii) pemilihan aksesori secara acak tidak terkait dengan karakter fenotipik tertentu. Di India tidak adanya pola penggerombolan yang jelas antara genotipe-genotipe kedelai dengan lokasi geografik asalnya diduga oleh Tyagi dan Sethi (2011) berkaitan dengan tekanan seleksi yang diarahkan pada daya hasil maksimum di tiap daerah budi daya kedelai.

Rata-rata kesamaan genetik tiap gerombol menunjukkan bahwa kesamaan genetik terjauh terlihat antara gerombol I dengan II dan III (0,00), diikuti oleh gerombol I dengan IV (0,05), II dengan IV (0,05), III dengan IV (0,09), dan II dengan VII (0,09) (Tabel 4). Rata-rata kesamaan genetik di dalam tiap gerombol lebih tinggi daripada antar gerombol.

Matriks kesamaan genetik antar genotipe (data lengkap tidak diperlihatkan) menunjukkan keragaman genetik antar genotipe yang relatif rendah dengan rata-rata jarak genetik 0,56; yang menandakan sempitnya basis genetik dari genotipe-genotipe kedelai yang dianalisis, terlebih lagi tidak ada kerabat liar yang disertakan dalam analisis. Rata-rata kesamaan genetik

antar genotipe di dalam kelompok varietas unggul adalah 0,58, yang setara dengan rata-rata kesamaan genetik antar genotipe di dalam kelompok varietas introduksi (0,57) dan lokal (0,54). Hal ini menunjukkan bahwa pada umumnya varietas-varietas unggul yang ada telah dirakit menggunakan sumber genetik yang berjarak genetik yang berdekatan.

Untuk merakit varietas unggul baru dari set genotipe yang digunakan dalam penelitian ini genotipe-genotipe yang berasal dari gerombol I, II, III, IV, dan VII ataupun genotipe-genotipe yang memiliki kesamaan genetik rendah dapat dipertimbangkan sebagai calon tetua persilangan. Di antara kelima puluh aksesori yang dianalisis rata-rata kesamaan genetik terendah (data lengkap tidak diperlihatkan) terdeteksi pada 15 genotipe, yaitu antara GM 2841 dengan Sinabung, Avoyelles 17993, M 2667, 17/9/3/8/0, Crb-2, Bromo, Lokal Tabanan, GM 2782 Si, dan Lokal Bangkalan; antara Sinabung dengan M 2667; antara Avoyelles 17193 dengan M 2667, Lokal Jember B3649, dan GM 2782 Si; antara M 2667 dengan Bromo, Davros Lokal, 17/4/20/1, Davros x 945/0/0/2, dan Lokal Jember B3649; antara Lokal Jember B3649 dengan 17/9/3/8/0, Crb-2, dan GM 2782 Si; dan antara Bromo dengan Pangrango. Persilangan antar calon-calon tetua yang berjauhan jarak genetiknya ini akan memaksimalkan kesempatan memperoleh segregan transgresif di antara progeni persilangan (Narvel *et al.*, 2000) dan memperoleh pengaruh heterotik pada generasi awal (Tyagi dan Sethi, 2011) karena ada peluang bahwa genotipe-genotipe yang tidak berhubungan akan menyumbang kombinasi alel-alel untuk sifat-sifat yang menguntungkan. Akan tetapi Narvel *et al.* (2000) mengingatkan bahwa seleksi calon tetua persilangan hanya berdasarkan pada jarak genetik berjauhan sebagaimana terukur oleh set penanda mikrosatelit acak bisa saja tidak meningkatkan keragaman genetik (*genetic variance*) pada progeni untuk fenotipe-fenotipe yang diinginkan, kecuali ada alel-alel unik (alel jarang atau spesifik) yang terpaut dengan gen atau lokus-lokus pengendali sifat-sifat yang diwariskan secara kuantitatif (*quantitative trait loci*,

Tabel 4. Matriks rata-rata kesamaan genetik antar dan di dalam (bergaris bawah) 10 gerombol 50 aksesori plasma nutfah.

Gerombol (n)	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
I (1)	<u>1,00</u>									
II (1)	0,00	<u>1,00</u>								
III (1)	0,00	0,15	<u>1,00</u>							
IV (4)	0,05	0,05	0,09	<u>0,53</u>						
V (3)	0,13	0,17	0,20	0,30	<u>0,48</u>					
VI (1)	0,20	0,17	0,25	0,31	0,20	<u>1,00</u>				
VII (3)	0,24	0,09	0,28	0,32	0,31	0,38	<u>0,60</u>			
VIII (1)	0,20	0,14	0,35	0,25	0,19	0,41	0,32	<u>1,00</u>		
IX (8)	0,23	0,28	0,21	0,18	0,30	0,27	0,34	0,47	<u>0,59</u>	
X (27)	0,23	0,23	0,24	0,36	0,37	0,42	0,46	0,43	0,49	<u>0,61</u>

QTL). Strategi seleksi calon tetua persilangan yang disarankan adalah dengan terlebih dahulu memilih genotipe-genotipe berdasarkan karakteristik-karakteristik agronomik atau mutu gizi yang penting kemudian menganalisis keragaman genetiknya menggunakan penanda-penanda mikrosatelit yang berasosiasi dengan karakter-karakter tersebut. Selanjutnya, berdasarkan profil sidik jari DNA satu subset genotipe yang mempunyai jarak genetik terjauh diseleksi sebagai calon tetua persilangan.

Masing-masing aksesori beridentitas sidik jari DNA yang berbeda satu sama lain sehingga tidak ditemukan adanya duplikasi aksesori. Perluasan sidik jari DNA mikrosatelit terhadap lebih banyak plasma nutfah kedelai berpeluang menemukan duplikasi koleksi akibat penamaan yang berbeda antar daerah atau bahkan memisahkan varietas-varietas yang identik secara fenotipik. Santoso *et al.* (2006) berhasil mendeteksi kesamaan genetik antara dua varietas introduksi yang semula bernama berbeda dan sebaliknya juga mendeteksi perbedaan genetik antar dua varietas introduksi dengan nama sama.

Data profil sidik jari DNA mikrosatelit yang diperoleh pada penelitian ini dan sebelumnya (Santoso *et al.*, 2006) berguna untuk melengkapi pangkalan data fenotipik yang telah ada untuk pengelolaan plasma nutfah, antara lain untuk merancang strategi pembuatan *core collection*. Tersedianya pangkalan data sidik jari DNA varietas-varietas yang sudah dilepas juga akan sangat membantu diskriminasi varietas-varietas unggul baru. Di Eropa Barat telah dibangun pangkalan data >500 varietas komersial tomat berdasarkan profil sidik jari mikrosatelit menggunakan teknik dan set mikrosatelit yang telah dibakukan (Bredemeijer *et al.*, 2002). Berdasarkan rujukan pangkalan data ini 92% varietas komersial tomat berhasil dibedakan dengan menggunakan 20 lokus mikrosatelit (Bredemeijer *et al.*, 2002).

Profil sidik jari mikrosatelit telah diterima di Amerika Serikat sebagai data pendukung untuk menyatakan keunikan sebuah varietas kedelai baru dengan menggunakan set panel primer mikrosatelit baku (Diwan dan Cregan, 1997). Set primer baku harus memenuhi kriteria (i) memiliki tingkat keragaman genetik tinggi, (ii) mewakili tiap kelompok pautan/kromosom, (iii) menghasilkan pita-pita DNA yang jelas, dan (iv) sebaiknya dapat diamplifikasi secara multipleks dalam proses PCR (*multiplexing*) untuk efisiensi pengerjaannya (Diwan dan Cregan, 1997). Jika penanda mikrosatelit akan rutin diaplikasikan untuk sidik jari plasma nutfah kedelai di Indonesia, maka kesepuluh penanda yang digunakan pada penelitian ini dan 10 penanda lainnya yang digunakan oleh Santoso *et al.* (2006) per-

lu dipadukan dan diuji kembali untuk penetapan set panel *moltloading* yang baku sekaligus untuk penentuan varietas rujukan sebagai kontrol antar *running* sampel. Lokus-lokus yang dipertahankan dalam set panel baku tersebut hendaknya yang memiliki nilai keinformatifan >0,8 (Rongwen *et al.*, 1995).

KESIMPULAN

Sepuluh lokus mikrosatelit yang digunakan untuk analisis keragaman genetik 50 aksesori plasma nutfah kedelai unggul, introduksi dan lokal bersifat polimorfik tetapi mempunyai tingkat kemampuan diskriminasi yang relatif rendah ($D = 0,60$ dan $PIC = 0,58$). Heterosigositas dapat dibedakan oleh tujuh lokus dengan rata-rata nilai $H = 0,09$ dan terdeteksi pada 64% varietas. Alel jarang terdeteksi pada 68% varietas dan sebagian besar alel jarang ini juga merupakan alel spesifik sebuah genotipe. Masing-masing aksesori kedelai memiliki profil alelik mikrosatelit yang berbeda satu sama lain, yang berguna untuk diskriminasi varietas. Empat lokus bernilai informatif tinggi (>0,75), yaitu Sct028, Satt002, Satt005, dan Satt571 dapat digunakan untuk membedakan antar aksesori pada set aksesori yang dianalisis dalam penelitian ini. Analisis gerombol memisahkan kelima puluh aksesori ke dalam 10 gerombol yang tidak berkaitan dengan asal geografi, kelompok varietasnya, maupun morfologinya. Keragaman kedelai yang dianalisis termasuk rendah dengan rata-rata kesamaan genetik 0,56. Lima gerombol aksesori dan 15 aksesori terdeteksi mempunyai kesamaan genetik rendah sehingga berpotensi digunakan sebagai tetua persilangan dalam perakitan varietas unggul baru.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami berterima kasih kepada Dr. Asadi dari BB-Biogen, Dr. Muchlis Adie dan Dr. Rudy Soehendi dari Balai Penelitian Tanaman Kacang-kacangan dan Umbi-umbian (Balitkabi) atas penyediaan benih kedelai, Ratna Utari dan Sujarno untuk penyiapan tanaman, dan Ma'sumah untuk isolasi DNA, serta kepada para penelaah atas saran-saran konstruktif untuk perbaikan makalah ini. Penelitian didanai APBN 2007 nomor proyek 3209.0/018-09.0/XII/2007.1525.0460.A5.

DAFTAR PUSTAKA

- Akkaya, M.S., A.A. Bhagwat, and P.B. Cregan. 1992. Length polymorphism of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics* 132:1131-1139.
- Bredemeijer, M., J. Cooke, W. Ganai, R. Peeters, P. Isaac, Y. Noordijk, S. Rendell, J. Jackson, S. Roder, K. Wendehake, M. Dijk, M. Amelaine, V. Wickaert, L. Bertrand, and B. Vosman. 2002. Construction and

- testing of a microsatellite containing more than 500 tomato varieties. *Theor. Appl. Genet.* 105:1019-1026.
- Chaerani, N. Hidayatun, dan D.W. Utami. 2009. Pengembangan set multipleks penanda DNA mikrosatelit untuk analisis variasi genetik padi dan kedelai. *J. AgroBiogen* 5:57-64.
- Diwan, N. and P.B. Cregan. 1997. Automated sizing of fluorescent-labeled simple sequence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean. *Theor. Appl. Genet.* 95:723-733.
- Jain, S., R.K. Jain, and S.R. McCouch. 2004. Genetic analysis of Indian aromatic and quality rice (*Oryza sativa* L.) germplasm using panels of fluorescently-labeled microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* 109:965-977.
- Kurniawan, H., Sutoro, M. Setyowati, T.S. Silitonga, S.G. Budiarti, Hadiatmi, Asadi, N. Dewi, S.A. Rais, I.H. Somantri, N. Zuraida, Minantyorini, dan T. Suhartini. 2005. Pengembangan sistem pangkalan data (database) plasma nutfah tanaman pangan. Kumpulan Makalah Seminar Hasil Penelitian BB-Biogen tahun 2004. hlm. 74-84.
- Liu, K. and S.V. Muse. 2005. PowerMarker: integrated analysis environment for genetic marker data. *Bioinformatics* 21:2128-2129.
- Maughan, P.J., M.A.S. Maroof, and R.G. Buss. 1995. Microsatellite and amplified sequence length polymorphisms in cultivated and wild soybean. *Genome* 38:715-723.
- Narvel, J.M., W. Chu, W.R. Fehr, P.B. Cregan, and R.C. Shoemaker. 2000. Development of multiplex sets of simple sequence repeat DNA markers covering the soybean genome. *Mol. Breed.* 6:175-183.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:3321-3323.
- Rongwen, J., M.S. Akkaya, A.A. Bhagwat, U. Lavi, and P.B. Cregan. 1995. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. *Theor. Appl. Genet.* 90:43-48.
- Santoso, T.J., D.W. Utami, dan E.M. Septiningsih. 2006. Analisis sidik jari DNA plasma nutfah kedelai menggunakan markah SSR. *J. AgroBiogen* 2(1):1-7.
- Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotech.* 18:233-234.
- Thompson, J.A., R.L. Nelson, and L.O. Vodkin. 1998. Identification of diverse soybean germplasm using RAPD markers. *Crop Sci.* 38:1348-1355.
- Tyagi, S.D. and J. Sethi. 2011. Genetic diversity pattern in soybean [*Glycine max* L. Merrill]. *Res. J. Agric. Sci.* 2:288-290.
- Wang, L., R. Guan, L. Zhangdong, R. Chang, and L. Qiu. 2005. Genetic diversity of classic cultivated soybean revealed by SSR markers. *Crop Sci.* 46(3):1032-1038.
-