

KARAKTERISASI GENOTIPIK GALUR-GALUR KEDELAI PUTATIVE MUTAN-MUTAN TAHAN KEKERINGAN

Arvita Netti Sihalo¹, Trikoesoemaningtyas², Didy Sopandie², dan Desta Wirnas²

¹Mahasiswa Pascasarjana PBT Departemen AGH IPB

²Staf Pengajar Departemen AGH IPB

ABSTRACT

The objective of the research was to verify genotypic differences among drought tolerant putative soybean putative mutant lines and between putative mutant lines and their parental line. DNA samples were taken from 11 putative mutant lines consisting of six drought-tolerant mutant lines and five drought moderate putative mutant lines and Argomulyo variety as parental line. In this study, 12 random primers to amplify the sample DNA. The amplification results showed that only 10 primers are polymorphic. The results of amplification also showed that 11 mutant lines was tolerant and moderate mutant against drought. There were obtained 70 marker of RAPD where only 60 of this marker were polymorphic. The analysis similarities of UPMGA method were resulted mutan5 (M200-39-69-4) and mutan3 (M200-52A-66-8) as the really mutant group (completely unlike the parental).

Key words:

PENDAHULUAN

Kedelai telah menjadi salah satu komoditas strategis setelah padi dan jagung. Kebutuhan kedelai dalam negeri terus meningkat, tetapi produksi dalam negeri belum mampu mengimbangi peningkatan permintaan. Permasalahan yang dihadapi dalam budidaya kedelai antara lain masih kurangnya varietas kedelai yang mampu beradaptasi pada kondisi kekeringan (Arsyad *et al.*, 2007)

Induksi mutasi dengan sinar gamma adalah teknik yang umum digunakan untuk mendapatkan keragaman genetik. Mutasi iradiasi dapat dilakukan secara makro (*macro mutation*) dan mikro (*micro mutation*). Mutasi makro menggunakan dosis iradiasi yang tinggi, yaitu dosis yang berada di atas *Lethal Doses 50*, biasanya menyebabkan ketidakstabilan genetik, sedangkan mutasi mikro, yaitu mutasi yang menggunakan dosis rendah, yaitu dosis di bawah LD₅₀ (Van Harten, 1998). Induksi mutasi dosis rendah mempengaruhi perubahan karakter kuantitatif tanaman dan sedikit mempengaruhi perubahan kromosom dibandingkan dengan mutasi yang diinduksi oleh iradiasi sinar gamma pada dosis yang tinggi (Sakin, 2002).

Saat ini telah diperoleh galur-galur putatif mutan M₉ tahan kekeringan yang diseleksi di lapang pada kondisi kekeringan berdasarkan karakter agronomi dan hasil. Galur-galur putatif mutan yang diperoleh perlu diverifikasi sehingga diperoleh informasi bahwa galur-galur tersebut berbeda dengan tetuanya,

Penggunaan marka molekuler merupakan salah satu metode yang cepat dan akurat untuk melihat perbedaan lokus antara mutan-mutan tersebut dengan tetuanya (Thormann *et al.*, 1994). Hal ini sangat penting karena penandaan pada tingkat DNA tidak dipengaruhi lingkungan dan dapat dilakukan pada setiap organ dan fase tumbuh tanaman.

Random Amplified Polymorphic DNA adalah tehnik untuk mengamplifikasi DNA dengan mesin PCR menggunakan primer tunggal berukuran 10 nukleotida. Primer yang digunakan merupakan primer acak yang mengamplifikasi genom target secara acak. Primer acak yang dicampurkan

dengan reaksi amplifikasi akan berikatan dengan sekuens komplemen di sepanjang genom target. Selanjutnya sekuens target akan teramplifikasi, yang dapat divisualisasikan pada gel agarose yang diwarnai dengan ethidium bromide (Sharma *et al.*, 2008)

Metode RAPD mampu mendeteksi sekuens nukleotida dengan hanya menggunakan satu primer. Primer tersebut akan berikatan dengan ujung tunggal genom yang satu dan pada ujung DNA pasangannya dengan arah berlawanan. Selama situs penempelan primer masih berada pada jarak yang dapat diamplifikasi pada umumnya tidak lebih dari 5.000 pasangan basa (pb), maka akan diperoleh produk DNA amplifikasi (Weising *et al.*, 1995). Penelitian ini bertujuan untuk memverifikasi mutan-mutan putatif toleran dan memperoleh perbedaan karakter molekuler antara mutan-mutan yang ada serta perbedaan karakter molekuler mutan dengan tetuanya.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan dua tahap yaitu penelitian lapang di lahan petani di Kecamatan Natar Lampung pada bulan Maret 2012 hingga Mei 2012 dan molekuler di Laboratorium Biomolekuler Departemen Agronomi dan Hortikultura, yang dimulai bulan Juli 2012 hingga Agustus 2012. Bahan tanam yang digunakan untuk analisis RAPD adalah DNA dari satu tetua dan 11 galur mutan putatif yang terdiri atas enam genotipe mutan yang toleran kekeringan dan lima genotipe mutan agak peka kekeringan yang telah diseleksi pada lahan kering di Lampung. Pada penelitian ini yang diamati komponen hasil dan hasil serta keragaan mutan-mutan toleran kekeringan dan karakterisasinya secara molekuler.

Isolasi DNA (Ekstraksi DNA)

Bahan yang digunakan untuk ekstraksi DNA adalah daun pertama yang muncul setelah daun lembaga dari tanaman kedelai (pada saat tanaman kedelai berumur 3 minggu setelah tanam). Bahan digunting kecil sebesar kurang lebih 2 x 2 cm lalu dicacah, kemudian dimasukkan ke dalam mikrotube 2 ml yang telah berisi cairan ekstrak dari kit SIGMA sebanyak 100 µl. Mikrotube dipanaskan pada suhu 95°C selama 5 menit dalam waterbath. Setelah itu, ditambahkan larutan dilusi dari kit SIGMA sebanyak 100 µl, DD H₂O sebanyak 300 µl, sambil dikocok manual beberapa saat. Larutan tersebut, dipisahkan ke mikrotube baru dari sisa-sisa daun. *Chloroform* : Isoamyl alcohol (CIA = 24 : 1) 200 µl ditambahkan ke dalam mikrotube tersebut kemudian dihomogenkan dengan vorteks mixer selama 1 menit. Sentrifugasi 15.000 rpm dilakukan selama 5 menit. Supernatan di-

Tabel 1. Galur/varietas dan primer yang digunakan.

No.	Jenis galur/varietas	Nama galur/varietas	Primer	Urutan basa
1.	Tetua (T)	Argomulyo	OPE1	(5'-CCCAAGGTCC-3')
2.	Mutan1	M150-70-45-12	OPE7	(5'-AGATGCAGCC-3')
3.	Mutan2	M200-80-48-2	OPE8	(5'-TCACCACGGT-3')
4.	Mutan3	M200-52A-66-8	OPE19	(5'-ACGGCGTATG-3')
5.	Mutan4	M50-97-8-12	OPH5	(5'-AGTCGTCCCC-3')
6.	Mutan5	M200-39-69-4	OPH6	(5'-ACGCATCGCA-3')
7.	Mutan6	M200-64-51-8	OPH7	(5'-CTGCATCGTG-3')
8.	Mutan7	M200-13-47-5	OPH9	(5'-TGTAGCTGGG-3')
9.	Mutan8	M200-20-52-3	OPH13	(5'-GACGCCACAC-3')
10.	Mutan9	M100-29A-42-14	OPM1	(5'-GTTGGTGGCT-3')
11.	Mutan10	M150-29-44-10	OPM2	(5'-ACAACGCCTC-3')
12.	Mutan11	M100-96-53-6	OPM20	(5'-AGGTCTTGGG-3')

pisahkan ke mikrotube 1,5 ml, kemudian ditambah ethanol absolut sebanyak 2 kali dari volume supernatan. Sentrifugasi 15.000 rpm selama 3 detik. Setelah itu DNA dikeringkan dengan cara membalik tabung di atas kertas tisu sampai tidak ada tetesan. DNA dikeringkan dengan *vacuum pump*, selanjutnya dicairkan dengan 200 µl aquabides.

Amplifikasi DNA dengan PCR

Metode amplifikasi DNA dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dilakukan sesuai yang dilakukan metode SIGMA. Tahapan PCR meliputi *pre heat*, *denaturation*, *annealing*, *extention*, dan pendinginan suhu.

Untuk amplifikasi DNA, 5 µl primer, 5 µl DNA ekstrak dan 10 µl taqpol dari kit SIGMA dimasukkan ke dalam PCR *tube* dan diamplifikasi pada mesin PCR ASTEC Thermal Cycler PC 707. Proses amplifikasi ini dilakukan sebanyak 45 siklus, yaitu denaturasi selama 1 menit pada suhu 94°C, annealing selama 1 menit pada suhu 36°C dan extention selama 2 menit pada suhu 72°C serta stop PCR/post PCR dilakukan pada suhu 72°C selama 7 menit. Hasil dari amplifikasi ini dilanjutkan dengan elektroforesis.

Elektroforesis Produk PCR

Langkah elektroforesis dimulai dengan pembuatan gel agarose 1,5% 0,6 g dengan larutan TAE 1 x 200 ml. Gel agarose dipasang sekat pencetak dan sisir pelubang (pembentuk sumur), kemudian dilepaskan saat beku. Larutan TAE 1x ditambahkan sampai gel terendam. Pelaksanaan tahap elektroforesis sama dengan proses pengujian DNA. Dengan perbandingan *loading dye* dan DNA adalah 10:2 DNA ladder disimpan pada salah satu sumur untuk mengukur pita-pita DNA yang akan dihasilkan dari masing-masing galur kedelai. DNA ladder yang digunakan adalah Vivantis 100 bp. Elektroforesis dilakukan selama 90 menit pada voltase 90 V. Hasil elektroforesis divisualisasikan di atas ultra violet transiluminator dan didokumentasikan dengan kamera.

Analisa Data

Produk amplifikasi hasil pemotretan gel berupa pola pita DNA dengan ukuran tertentu, Ukuran DNA ditentukan dengan membandingkan marka dengan BM 1 Kb Ladder. Perbedaan antar individu tanaman ditunjukkan dengan adanya jumlah pita dan jarak migrasinya. Pita-pita DNA diubah menjadi data biner dengan melakukan skoring data. Pita diskor “1” bila ada pita atau diskor “0” bila tidak ada pita. Variasi genetik diantara tanaman sampel dilihat dengan menggunakan model jarak genetik (1-F). Nilai F diperoleh berdasarkan estimasi fraksi dari pita (F) di antara 2 tanaman sebagai berikut (Nei dan Li, 1979):

$$F = 2 \frac{m_{xy}}{m_x + m_y}$$

Keterangan :

F : Koeffisien kemiripan gen

m_{xy} : Jumlah pita RAPD dari dua tanaman

m_x : Jumlah pita pada individu x

m_y : Jumlah pita pada individu y

Data biner hasil marka RAPD dianalisis menggunakan UPMGA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic means) dengan fungsi SIMQUAL menjadi dendrogram melalui program NTSYSpc 2.02 for windows. Hasil analisis tersebut dapat diketahui kemiripan antara mutan yang satu dengan yang lain serta tetuanya. Pada karakter agronomi dilakukan analisis uji t untuk membandingkan antara mutan-mutannya dengan tetua.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil amplifikasi menunjukkan bahwa dari 10 primer (OPE1, OPE7, OPE19, OPH5, OPH6, OPH7, OPH9, OPH13, OPM2, dan OPM20) diperoleh 60 pola pita yang polimorfik. Kesepuluh primer tersebut menghasilkan 5 sampai 12 pola pita dengan ukuran 200-2.500 bp (base pair). Jumlah fragmen DNA dari masing-masing mutan dari masing-masing primer disajikan pada Tabel 2.

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) adalah suatu sistem deteksi molekuler yang berbasis PCR, salah satu teknik molekuler untuk mendeteksi keragaman DNA didasarkan pada penggandaan DNA. RAPD merupakan penanda DNA yang memanfaatkan primer acak oligonukleotida pendek (dekamer) untuk mengamplifikasi DNA genom organisme (Bardakci 2001; Sharma *et al.* 2008).

Amplifikasi DNA tergantung dari kecocokan primer dengan sekuen DNA kedelai mutan. Primer yang tidak sesuai dengan sekuen DNA kedelai tidak menghasilkan produk amplifikasi. Hal ini disebabkan karena tidak terdapat situs yang komplementer pada DNA kedelai dengan sekuen primer tersebut. Menurut Yuwono (2006), primer yang tidak spesifik dapat menyebabkan teramplifikasinya daerah lain dalam genom yang tidak dijadikan sasaran atau sebaliknya tidak ada daerah genom yang teramplifikasi.

Berdasarkan profil pita DNA hasil amplifikasi yang menggunakan 10 primer, ditentukan matrik kesamaan untuk mengetahui hubungan kesamaan genetik antar individu dalam 11 galur mutan dan satu tetua (Tabel 3). Diperoleh galur mutan 9 dan galur mutan 10 (M100-29A-42-14 dan M150-29-44-10) mempunyai tingkat kesamaan mutan tertinggi, yaitu 95%, sedangkan mutan 5 (M200-39-69-4) mempunyai tingkat kesamaan genetik yang paling rendah 47,2%. Pada Gambar 1 hasil analisis UPGMA dengan 10 primer memperlihatkan bahwa mutan5 (M200-39-69-4) dan mutan 3 (M200-52A-66-8) sangat jauh kemiripannya dengan tetua Argomulyo.

Pada Tabel 4 terlihat pita-pita hasil amplifikasi DNA mutan-mutan dengan tetuanya bersifat polimorfik terutama pada primer OPE1 (pita 600 bp) dan primer OPM20 (pita 1.000 bp, 800 bp, 500

Tabel 2. Primer dan jumlah pita DNA hasil amplifikasi satu tetua dan 11 galur mutan kedelai.

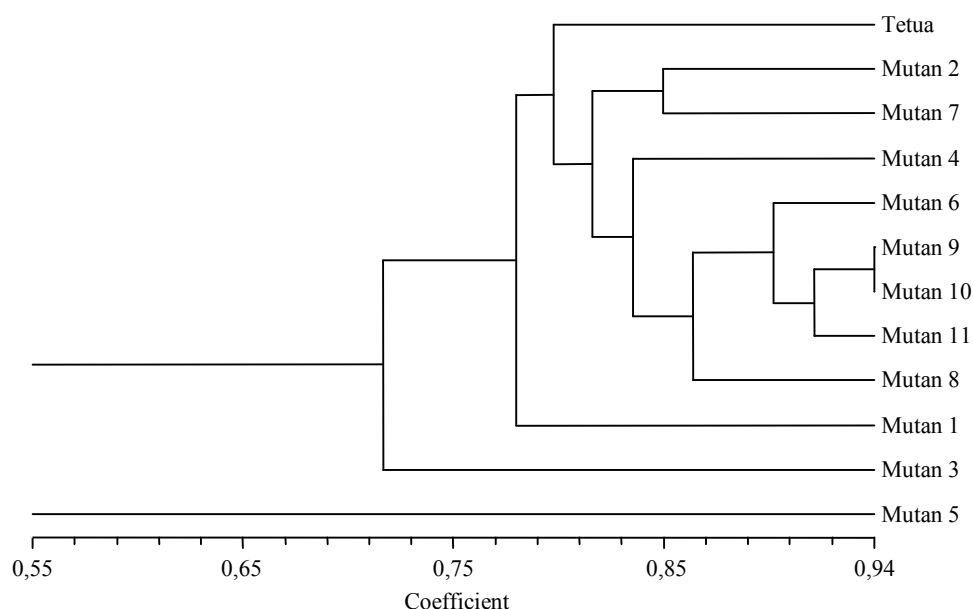
Primer	Kisaran Ukuran Pita (bp)	Jumlah Pola Pita	Jumlah Pita Polimorfik	Persentase Polimorfik
OPE1	400-1700	9	8	88,88
OPE7	300-2500	12	10	83,33
OPE19	250-900	6	5	83,33
OPH5	200-800	5	3	60
OPH6	600-2000	6	6	100
OPH7	400-1500	8	7	87,5
OPH9	400-1500	5	4	80
OPH13	300-1500	7	5	71,43
OPM2	300-1500	6	6	100
OPM20	300-2000	6	6	100

bp dan 300 bp). Perbedaan antara mutan-mutan dengan tetua yaitu pada primer OPE1 (pita 600 bp) dan primer OPM20 (pita 300 bp) tetua tidak memiliki pita-pita tersebut tetapi pada mutan-mutan pita-pita tersebut ada. Sedangkan pada primer OPM20 (pita 1.000 bp, 800 bp dan 500 bp) tetua memiliki pita-pita tersebut tetapi untuk mutan-mutan tidak ada, sehingga dapat dikatakan bahwa mutan-mutan tersebut mempunyai keragaman genetik yang berbeda dari tetuanya. Menurut Van Harten (1998) dan Mudibu *et al.* (2012) sinar gamma menghasilkan electron bebas yang bersifat radikal sehingga mengakibatkan kerusakan sel yang dapat merubah morfologi tanaman menjadi berbeda dengan tetuanya.

Mutan 5 (M200-39-69-4) dan mutan 3 (M200-52A-66-8) secara genom dan fenotipik dilapang juga berbeda dengan tetua (Argomulyo) karena keragaman genetik dari galur-galur mutan dapat diamati melalui karakter morfologi, agronomi dan molekuler (Lima *et al.*, 2011). Hal ini terlihat dari karakter agronomi dan karakter morfologi yang berbeda dengan tetuanya (Tabel 5). Perubahan karakter morfologi tanaman diantaranya perubahan bentuk daun dari bulat telur menjadi bulat

Tabel 3. Matrik kemiripan analisis RAPD Argomulyo dan 11 mutan.

	Tetua	Mutan 1	Mutan 2	Mutan 3	Mutan 4	Mutan 5	Mutan 6	Mutan 7	Mutan 8	Mutan 9	Mutan 10	Mutan 11
Tetua	1,000											
Mutan 1	0,729	1,000										
Mutan 2	0,789	0,861	1,000									
Mutan 3	0,713	0,800	0,765	1,000								
Mutan 4	0,732	0,753	0,789	0,759	1,000							
Mutan 5	0,472	0,613	0,606	0,545	0,639	1,000						
Mutan 6	0,805	0,824	0,868	0,828	0,854	0,583	1,000					
Mutan 7	0,795	0,815	0,861	0,747	0,769	0,676	0,821	1,000				
Mutan 8	0,791	0,854	0,875	0,747	0,883	0,657	0,884	0,854	1,000			
Mutan 9	0,843	0,814	0,883	0,813	0,819	0,575	0,939	0,835	0,874	1,000		
Mutan 10	0,861	0,805	0,904	0,786	0,835	0,609	0,911	0,853	0,867	0,950	1,000	
Mutan 11	0,837	0,854	0,875	0,813	0,883	0,579	0,907	0,829	0,911	0,919	0,916	1,000



Gambar 1. Dendrogram Satu Tetua dan 11 Galur Mutan yang Dihasilkan dari Analisis UPGM Gabungan 10 Primer.

memanjang, perubahan warna bunga dari ungu menjadi putih dan perubahan jumlah cabang yang sedikit menjadi banyak.

Tabel 4. Lokus hasil amplifikasi yang polimorfik antara tetua dengan 11 mutan.

Primer	Ukuran lokus	Tetua	Mutan 1	Mutan 2	Mutan 3	Mutan 4	Mutan 5	Mutan 6	Mutan 7	Mutan 8	Mutan 9	Mutan 10	Mutan 11
OPE-1	1700	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	1500	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	1200	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	100	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	900	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	800	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
	600	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	400	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
OPE-7	2500	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	2000	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	1500	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	1200	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	1.000	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	900	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	800	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	500	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
OPE-19	400	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	300	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
	900	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	600	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	500	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	400	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
	250	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
	500	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
OPH-5	400	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	200	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2.000	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
OPH-6	1.500	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
	1.200	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
	1.000	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
	800	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
	600	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
	1.500	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	1.200	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	1.000	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
OPH-7	800	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
	700	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
	600	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
	500	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
	1.500	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+
	1.000	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
	800	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
	600	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
OPH-9	1.500	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+
	1.000	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
	800	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
	600	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
OPH-13	1.500	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	1.000	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	900	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	800	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
OPM-2	400	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	300	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	1.500	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	1.000	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	700	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OPM-20	600	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
	400	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	300	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	2.000	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	1.350	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
	1.000	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	800	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	500	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	300	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Pada mutan 5 dan mutan 3 terjadi peningkatan keragaman genetik dimana keragaman yang terjadi akibat adanya iradiasi yang menyebabkan perubahan tinggi tanaman, produksi polong, bobot biji dan karakter-karakter kuantitatif yang bersifat diwariskan (Tah, 2006; Pavadai *et al.*, 2010).

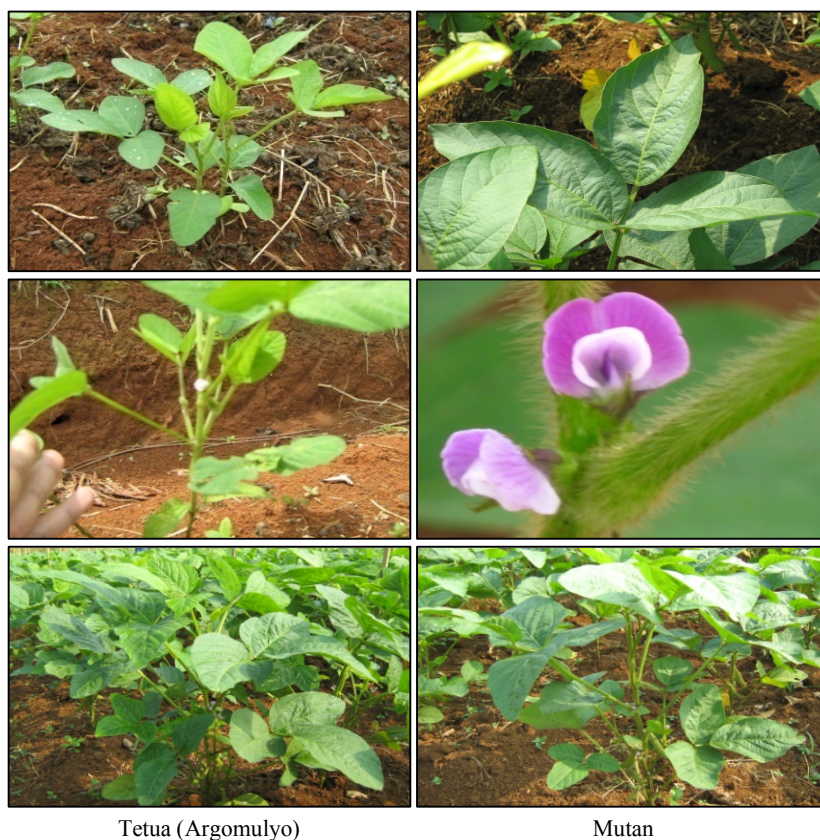
KESIMPULAN

Berdasarkan analisis penanda RAPD yang dihasilkan dari satu tetua dan 11 mutan putatif kedelai yang diuji, galur mutan 5 (M200-39-69-4) menunjukkan perbedaan terbesar dengan tetua

Tabel 5. Keragaan karakter agronomi generasi M₈ hasil iradiasi sinar gamma.

Galur	Jumlah polong bernas	Bobot biji/tanaman (g)	Bobot 100 biji (g)
Argomulyo	20,3	8,88	18,44
M150-70-45-12	20,83	7,14	16,40*
M200-80-48-2	16,8	7,59	15,55*
M200-52A-66-8	17,93	8,14	16,76*
M50-97-8-12	22,1	7,67	17,43
M200-39-69-4	16,77	7,03	17,38*
M200-64-51-8	21,77	8,75	17,76
M200-13-47-5	19,1	8,34	17,70
M200-20-52-3	22,1	8,66	17,21
M100-29A-42-14	19,33	7,70	17,38*
M150-29-44-10	21,47	8,09	16,55*
M100-96-53-6	14,6*	5,46*	13,41*

* = berbeda nyata dengan tetua (Argomulyo) pada taraf 5% berdasarkan uji t.



Tetua (Argomulyo) Mutan
Gambar 2. Perbedaan karakter morfologi antara tetua dan mutan-mutan.

dengan tingkat kesamaan genetik yang paling rendah, yaitu 47,2% Argomulyo pada karakter agronomi dan molekuler.

DAFTAR PUSTAKA

- Arsyad, D.M., M.M. Adie, dan H. Kuswanto. 2007. Perakitan Varietas Unggul Kedelai Spesifik Agroekologi. *Dalam* Sumarno, Suyanto, A. Widjono, Hermanto, dan H. Kasim (Eds.) *Kedelai. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan, Bogor*. hlm. 205-228.
- Bardacki, F. 2001. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. *Turk. J. Biol.* 25:185-196.
- Mudibu, J., K.K.C. Nkongolo, A. Kalonji-Mbuyi, and R.V. Kizungu. 2012. Effect of gamma irradiation on morpho-agronomic characteristics of soybeans (*Glycine max* L.). *American Journal of Plant Sciences* 3:331-337.
- Nei, M. and W.H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variations in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Science, Washington*, 76:5269-5273.
- Pavadai, P., M. Girija, and Dhanavel. 2010. Effect of gamma rays on some yield parameters and protein content of soybean in M₂, M₃ and M₄ generation. *Journal of Experimental Sciences* 1(6):8-11.
- Sakin, M.A. 2002. The use of induced micro-mutation for quantitative characters after EMS and gamma ray treatments in Durum wheat breeding. *Pakistan Journal of Applied Sciences* 2(12):1102-1107.
- Sharma, A., A.G. Namdeo, and K.R. Mahadik. 2008. Molecular Markers: New Prospects in Plant Genome Analysis. *Pharmacognosy Reviews* 2(3):23-31.
- Tah, P.R. 2006. Studies on gamma ray induced mutation in Mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilezek]. *Asian Journal of Plant Science* 5(1):61-70.
- Thormann C.E, M.E. Ferreira, L.E.A. Camango, J.G. Tivang, and T.C. Osborne. 1994. Comparison of RFLP and RAD Markers to Estimating Genetic Relationships Within and Among Cruciferous Species. *Theor Appl Genet* 88:973-980.
- Van Harten, A.M. 1998. Mutation Breeding, Theory and Practical Application. *The United Kingdom: The Press Syndicate of the Univ. Of Cambridge*. 243-353 p.
- Yuwono, T. 2006. Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction. Yogyakarta: Andi Offset.
- Weising, K., H. Nybom, K. Wolff, and W. Meyer. 1995. DNA Finger Printing in Plants and Fungi. *Boca Raton-Florida: CRC Pr.*