

APLIKASI MARKA RAPD DALAM SELEKSI GALUR KEDELAI TOLERAN NAUNGAN

**Trikoesoemaningtyas¹, Imam Widodo¹, Desta Wirnas¹,
Darman M. Arsyad² dan Didy Sopandie¹**

¹Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor

²Balai Besar Pengkajian dan Pengembangan Teknologi Pertanian, Bogor

ABSTRACT

The increase of soybean consumption in Indonesia has not been met by domestic soybean production due to low productivity and limited planting area leading to a large amount of import. Expansion of planting area beyond the traditional soybean planting area as intercrop with estate crops is an alternative to reduce import. The main constraint in planting soybean as intercrop with estate crops is low light intensity in addition to drought, low soil pH and Aluminium toxicity. Breeding for soybean varieties with improved adaptation to low light intensity under intercropping condition is currently in progress at the Center for Crop Improvement Studies, Department of Agronomy and Horticulture, Bogor Agricultural University. Selection of RAPD markers was conducted with 85 random primers using Bulk Segregate Analysis. Phenotype of recombinant inbred lines (RILs) for the BSA was conducted under artificial shading. From polymorphic bands, several markers, OPM 19, OPH07, OPE 19, OPH2 dan OPM8, SB01-22, G10, I09, P01 were linked to tolerant lines. These marker were then validated using tolerant lines selected from intercropping with rubber trees. The two markers were consistently linked to tolerant lines, namely OPM 19 and P01, and were used in the marker assisted selection of 300 soybean lines from BP2TP and IPB.

Keywords: RAPD, soybean, shading tolerance, bulk segregant analysis

PENDAHULUAN

Kebutuhan kedelai Indonesia pada tahun 2004 mencapai 2.02 juta ton. Sementara produksinya baru mencapai 0,71 juta ton. Untuk memenuhi selisihnya di tahun yang sama Indonesia mengimpor 1,3 juta ton (Badan Litbang Pertanian 2005). Kebutuhan ini terus meningkat karena penambahan penduduk dan perkembangan industri.

Luas tanaman kedelai di dalam negeri justru cenderung menurun. Pada tahun 1992 luas panen kedelai mencapai 1,66 juta ha, tetapi pada tahun 2000 luas panen kedelai telah menyusut menjadi 824.484 ha dan terus menurun hingga pada tahun 2004 hanya 564.883 ha (Badan Litbang Pertanian 2005).

Salah satu potensi pengembangan pertanaman kedelai adalah melalui tumpangsari di bawah tegakan tanaman perkebunan atau hutan tanaman industri. Luas lahan perkebunan karet di Indonesia mencapai 3,3 juta hektar yang terdiri dari sekitar 15% di antaranya merupakan lahan perkebunan besar dengan jarak tanam yang teratur, dan 85% lainnya merupakan perkebunan rakyat dengan pola agroforestri karet. Lahan perkebunan besar sangat potensial untuk dimanfaatkan sebagai pertanaman kedelai karena 33% di antaranya merupakan tananam belum menghasilkan (Dirjenbun *dalam* Nurhaimi 2004).

Kendala utama pada lahan di bawah tegakan tanaman perkebunan adalah rendahnya intensitas cahaya karena faktor naungan. Untuk itu perlu ada varietas yang adaptif dan berproduksi tinggi pada kondisi intensitas cahaya rendah (naungan). Sampai saat ini pengembangan kedelai sebagai tanaman sela yang adaptif terhadap naungan masih kurang mendapat perhatian. Pada kedelai, pemuliaan untuk tanaman sela masih terbatas untuk tumpangsari dengan kondisi naungan ringan 33%, yaitu tumpangsari dengan jagung (Asadi dan Arsyad 1995; Asadi *et al.* 1997).

Hasil penelitian Sopandie *et al.* (2002) menunjukkan bahwa kedelai yang ditanam di bawah naungan 50% memberikan hasil biji yang lebih rendah dibandingkan pada keadaan tanpa naungan dengan penurunan hasil sampai 60%. Tanggapan genotipe kedelai terhadap cekaman intensitas cahaya rendah sangat beragam. Beberapa genotipe seperti Godek A, Klungkung dan galur 8529 sangat peka terhadap cekaman intensitas cahaya rendah dan mengalami penurunan hasil sampai 50%. Genotipe Ceneng dan B613 menunjukkan adaptasi yang baik terhadap intensitas cahaya rendah, dan pada naungan 50% kedua genotipe memberikan hasil yang lebih tinggi (102–108%) dibandingkan hasil biji pada kondisi tanpa naungan (Sopandie *et al.* 2002).

Pemuliaan konvensional sangat bergantung pada seleksi berdasarkan fenotipe terhadap individu superior dari suatu populasi bersegregasi. Walaupun kemajuan yang pesat telah diperoleh dari pemuliaan melalui seleksi fenotipe, tetapi untuk beberapa tujuan pemuliaan seperti toleransi terhadap cekaman lingkungan, sering menghadapi masalah karena harus dilakukan di lingkungan target. Untuk itu penggunaan marka molekuler dalam membantu seleksi (*molecular marker assisted selection/MAS*) dapat menjadi alternatif karena seleksi dapat dilakukan langsung terhadap genotipe dan tidak terpengaruh lingkungan.

Keberhasilan seleksi dengan marka molekuler sangat bergantung pada keeratan hubungan antara marka dengan gen atau QTL yang dituju. Idealnya, marka berada dalam sekuen gen yang dituju (Babu *et al.* 2004). Namun marka seperti ini sangat jarang diperoleh. Penelitian di Departemen Agronomi dan Hortikultura IPB telah berhasil mengidentifikasi tiga cDNA yaitu JJ3, EE2, dan E3 dari kedelai toleran naungan. Gen JJ3 homolog terhadap *psaD* yaitu gen yang mengkode protein PsaD pada subunit PS-I yang berperan dalam fotosintesis (Sopandie *et al.*, 2005). Pemanfaatan sekuen gen-gen tersebut dalam mengembangkan marka untuk seleksi genotipe kedelai toleran intensitas cahaya rendah tidak dapat dilakukan karena gen-gen tersebut terekspresi pada genotipe toleran maupun peka dengan intensitas yang lebih tinggi pada genotipe toleran (Kisman 2007).

Untuk itu, marka Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) yang terpaut karakter toleran intensitas cahaya rendah pada kedelai dikembangkan untuk seleksi. Marka RAPD telah banyak digunakan dalam seleksi baik untuk karakter kualitatif maupun karakter kuantitatif (Cheghamirza *et al.* 2002). Seleksi terhadap marka yang terpaut karakter yang diinginkan dapat dilakukan dengan metode *Bulk Segregant Analysis* (Shasidar *et al.* 2001).

Makalah ini melaporkan hasil seleksi marka RAPD yang terpaut toleransi terhadap intensitas cahaya rendah dan seleksi terhadap galur-galur kedelai dalam rangka mengembangkan varietas kedelai toleran intensitas cahaya rendah sebagai tanaman sela pada perkebunan atau hutan tanaman industri.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan dalam tiga percobaan yaitu (1) analisis toleransi terhadap intensitas cahaya rendah dari galur-galur (RIL) F6 kedelai, (2) seleksi marka RAPD, dan (3) seleksi terhadap galur-galur kedelai dengan bantuan marka (*marker assisted selection*). Percobaan 1 dilaksanakan di Kebun Percobaan BB Biogen, Cikeumeuh, Bogor pada Juni-Agustus 2006, Percobaan 2 dan 3 dilaksanakan pada bulan Mei-November 2007 di Laboratorium Terpadu, Research Group on Crop Improvement, Departemen Agronomi dan Hortikultura, Institut Pertanian Bogor.

Bahan Tanaman

Bahan tanaman yang digunakan adalah galur kedelai toleran naungan (Ceneng), galur kedelai peka naungan (Godek A), 100 *recombinant inbred lines* (RILs) F6 dari persilangan Ceneng x Godek, 150 galur kedelai hasil pemuliaan peneliti Badan Litbang Pertanian, dan 150 galur kedelai hasil pemuliaan RGCI- Departemen Agronomi dan Hortikultura.

Percobaan 1: Analisis Fenotipe

Tujuan dari percobaan ini adalah untuk memperoleh sebaran keragaan karakter agronomi dari populasi RILs F6 hasil persilangan galur toleran Ceneng dan galur peka Godek A. Percobaan dilaksanakan di dalam *screen house* yang terbuat dari Paranet 55% (intensitas cahaya 45%). Seratus RIL F6 dan kedua tetua, Ceneng dan Godek A, ditanam di *screen house* dengan rancangan lingkungan acak kelompok (RAK) dengan tiga ulangan. Setiap galur ditanam dalam baris dengan setiap baris terdiri dari 10 tanaman. Penanaman kedelai menggunakan budidaya optimum. Pengamatan dilakukan terhadap komponen hasil dan hasil kedelai di bawah naungan.

Data hasil pengamatan kemudian diplot untuk melihat sebaran data dan dilakukan uji normalitas dengan menggunakan Uji Shapiro-Wilks. Jika data tidak menyebar normal maka dilakukan standarisasi dengan nilai $Z = (X - \bar{x}) / SDev$ (Steel dan Torie 1986). Sebaran data nilai terstandarisasi yang menyebar normal kemudian digunakan untuk menentukan toleransi terhadap cekaman naungan.

Percobaan 2. Seleksi Marka RAPD

Dalam penelitian ini seleksi dilakukan pada 85 primer random yang terdiri atas 20 primer OPE, 20 primer OPH, 20 primer OPM, 22 primer SB, G10, I09, dan P01.

Bulk Segregant Analysis

Metode *bulk segregant analysis* (BSA) digunakan untuk secara cepat menyeleksi marka-marka yang terpaut dengan karakter toleransi terhadap intensitas cahaya rendah. Dari hasil analisis fenotipe RIL (Percobaan 1) ditetapkan 5 galur yang paling toleran dan 5 galur yang paling peka untuk digunakan dalam BSA. Ekstraksi DNA dilakukan terhadap masing-masing galur kemudian DNA dari galur-galur toleran digabung (*bulk*) dan DNA dari galur-galur peka juga digabung. Gabungan DNA dari galur-galur toleran dan peka kemudian digunakan untuk menyeleksi marka RAPD. Marka RAPD yang teramplifikasi pada bulk DNA galur toleran dan tidak teramplifikasi pada bulk DNA galur peka dipilih sebagai marka untuk seleksi.

Ekstraksi DNA

Bahan tanaman yang digunakan adalah daun kedelai berumur 2 minggu setelah tanam. Sebanyak 0,10 gram daun muda digerus dengan nitrogen cair, kemudian dimasukkan ke dalam tabung eppendorf 1,5 ml yang telah berisi 0,3 ml larutan penyangga dari Plant-DNAzol, dan diinkubasikan semalam pada suhu kamar. Kemudian ditambahkan Chloroform isoamilalkohol sebanyak 0,3 ml dan digoyang-goyang sampai terbentuk emulsi kemudian disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 10 menit pada suhu ruang. Larutan bagian atas dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung yang baru kemudian ditambahkan 225 μ l Etanol 100% dan digoyang-goyang secara perlahan. Pengendapan DNA dilakukan dengan sentrifugasi pada kecepatan 5.000 rpm selama 5 menit pada suhu ruang. Larutan bagian atas dibuang, disisakan pellet, kemudian ditambahkan 0,3 ml *washing solution* (DNAzol : Ethanol = 4 : 3), divortex agar tercampur sempurna kemudian disentrifugasi pada kecepatan 5.000 rpm selama 5 menit. Selanjutnya supernatan dibuang dan ditambahkan 0,3 ml ethanol 70%, divortex kembali agar tercampur merata kemudian disentrifugasi pada kecepatan 5.000 rpm selama 5 menit. Selanjutnya supernatan dibuang kemudian ditambahkan 50 μ l TAE 1X dan dilarutkan sempurna.

Amplifikasi DNA

DNA diamplifikasi menggunakan primer acak dengan reaksi yang terdiri dari DNA template 30 ng/ μ l, primer 2 pmol/ μ l, Go Taq Green Master Mix 0,01 unit/ μ l, dNTPs 200 μ M, MgCl₂ 4Mm dengan volume total 25 μ dalam mesin PCR (Master Cycler Gradient Eppendorf). Reaksi amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan PCR dan diprogramkan untuk PCR awal pada suhu 94 °C selama 5 menit satu siklus. Denaturasi DNA pada suhu 94 °C selama 5 detik, penempelan primer ke DNA cetakan pada suhu sesuai dengan susunan basa pada primer kira-kira $T_m - 4$ °C selama 30 detik dan pemanjangan pada 72 °C selama 1 menit sebanyak 45 siklus, dan PCR-akhir pada suhu 72 °C selama 10 menit sebanyak satu siklus. Hasil amplifikasi sebanyak 10 μ l DNA ditambahkan 2 μ l loading dye dielektroforesis pada gel

agarose 2% dengan tegangan 50 volt selama 2 jam. Pita DNA hasil amplifikasi selanjutnya diamati pada UV transluminator.

Percobaan 3: Seleksi Galur-galur Kedelai dengan Marka RAPD

Seleksi dilakukan terhadap 150 galur kedelai yang dikembangkan dari program pemuliaan di Departemen Agronomi dan Hortikultura IPB, dan 150 galur yang dikembangkan oleh pemulia dari Badan Litbang Pertanian. Galur-galur tersebut ditanam dan diambil daunnya pada umur 2 minggu setelah tanam untuk ekstraksi DNA. Ekstraksi DNA dilakukan dengan metode yang sama dengan pada Percobaan 2. Untuk seleksi, DNA dari galur-galur kedelai diamplifikasi dengan menggunakan primer yang terpaut karakter toleransi terhadap intensitas cahaya rendah hasil seleksi marka pada Percobaan 2. Galur yang positif membawa marka dipilih sebagai galur yang membawa sifat toleransi terhadap intensitas cahaya rendah.

HASIL DAN PEMBAHASAN

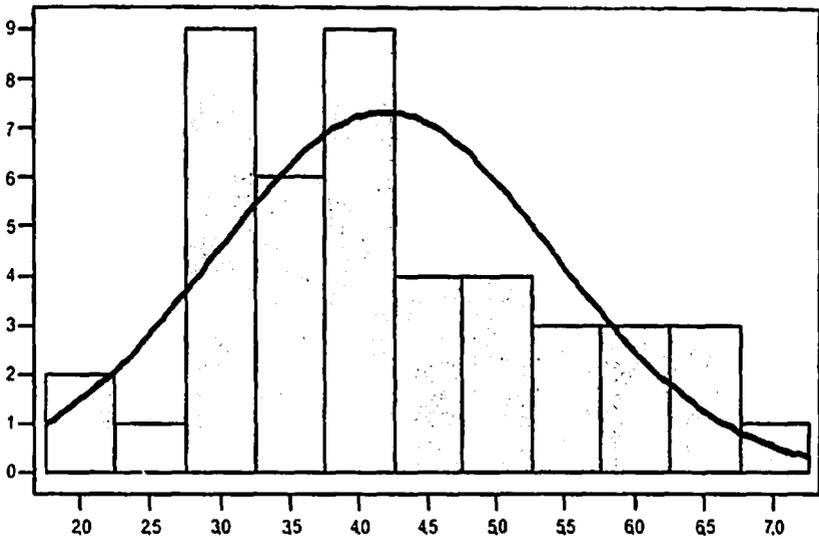
Karakter toleransi terhadap intensitas cahaya rendah pada tanaman kedelai merupakan karakter kuantitatif, yang ekspresinya sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungan (Wirnas 2007). Seleksi terhadap karakter toleransi yang bersifat kuantitatif harus dilakukan di lingkungan target untuk mengurangi pengaruh interaksi genotipe x lingkungan (Ceccarelli 1994). Hal inilah yang menyebabkan pemanfaatan marka molekuler dalam seleksi karakter toleransi terhadap cekaman lingkungan dianggap dapat memperbaiki efisiensi dan kemajuan seleksi, karena seleksi dilakukan terhadap genotipe sehingga tidak dipengaruhi oleh lingkungan.

Analisis Fenotipe

Dalam seleksi marka dengan menggunakan metode *bulk segregant analysis* (BSA) dapat digunakan populasi galur-galur hasil rekombinasi (*recombinant inbred lines/RILs*) selain populasi F₂, *Back Cross*, *Double Haploid* (DH). Populasi-populasi ini mempunyai latar belakang genetik yang sama, dan hanya bersegregasi untuk karakter yang dituju (Chalal dan Gosal 2003). Populasi RILs F₆ dipilih dalam penelitian ini karena tingkat homozigositasnya yang tinggi sehingga memungkinkan dilakukan pengulangan dalam analisis fenotipe.

Analisis fenotipe menggunakan karakter bobot biji/tanaman dalam keadaan ternaungi karena, karakter tersebut mempunyai nilai heritabilitas yang tertinggi (Wirnas 2007). Karakter yang digunakan untuk analisis fenotipe dalam seleksi marka maupun pemetaan QTL harus mempunyai heritabilitas yang tinggi.

Hasil pengujian populasi RILs F₆ hasil persilangan Ceneng x Godek A menunjukkan keragaman yang tinggi, tetapi nilai fenotipe tidak menyebar dalam sebaran yang normal. Untuk memperoleh dua kelompok galur yang berbeda dalam tingkat toleransi terhadap intensitas cahaya rendah



Gambar 1. Sebaran nilai fenotipe bobot biji/tanaman galur-galur RILs F6 hasil persilangan Ceneng x Godek A pada keadaan ternaungi dan sebaran nilai terstandarisasi (Z).

diperlukan sebaran normal, sehingga data distandarisasi dengan menggunakan nilai Z sehingga sebaran normal diperoleh (Gambar 1).

Galur yang dipilih adalah galur yang termasuk kategori sangat toleran yaitu galur yang mempunyai nilai fenotipe $X = \bar{x} X + 3SD$ (nilai $Z \geq 3$) dan galur yang sangat peka yaitu yang mempunyai nilai fenotipe $X = \bar{x} X - 3SD$ (nilai $Z \leq -1$) (Aluko dan Oard 2004). Dengan menggunakan nilai terstandarisasi telah ditetapkan galur-galur toleran dan peka yang ditampilkan pada Tabel 1.

Analisa fenotipe dengan metode diskriminan ini telah berhasil memisahkan genotipe yang toleran dan genotipe yang peka. Pemisahan ini sangat menentukan dalam keberhasilan metode *Bulk Segregant Analysis* yang digunakan dalam seleksi marka. Penggunaan galur sangat toleran dan sangat peka hasil *Bulk Segregant Analysis*.

Seleksi Marka RAPD

Dalam penelitian ini telah dilakukan seleksi terhadap 85 primer RAPD yang mengamplifikasi marka yang terpaut pada sifat toleransi terhadap intensitas cahaya rendah pada kedelai. Primer RAPD dipilih karena berbasis PCR dan mudah serta relatif murah untuk digunakan, sehingga dapat dilakukan seleksi terhadap sejumlah besar primer. Pemilihan marka untuk seleksi dapat dilakukan memanfaatkan metode *Bulk Segregant Analysis* karena dapat dengan pasti menyeleksi marka-marka yang terpaut pada karakter yang diinginkan.

Tabel 1. Nilai fenotipe bobot biji/tanaman dalam keadaan ternaungi dari galur-galur yang sangat toleran dan sangat peka terhadap intensitas cahaya rendah.

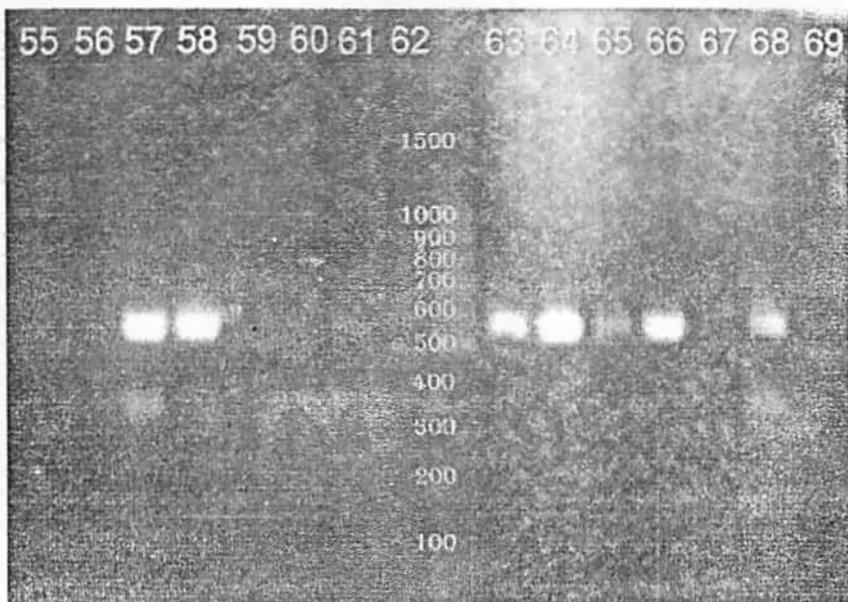
Nama Galur	Kategori	Bobot biji/tanaman (g)
CG-30-10	Toleran	7,04
CG-2-2	Toleran	6,40
CG-26-4	Toleran	6,39
CG-56-3	Toleran	6,27
CG-31-7	Toleran	6,21
CG-53-9	Peka	2,77
CG-21-1	Peka	2,72
CG-29-4	Peka	2,53
CG-76-7	Peka	2,23
CG-76-10	Peka	2,05

Dari hasil amplifikasi diperoleh sejumlah pita polimorfik dan beberapa di antaranya terpaut pada galur-galur RILs toleran yaitu OPM 19, OPH07, OPE 19, OPH2, dan OPM8, SB01-22, G10, I09, P01. Primer yang mengamplifikasi sejumlah pita yang terpaut pada galur toleran, kemudian divalidasi kembali menggunakan galur-galur toleran yang terseleksi berdasarkan indeks toleransi di bawah tegakan karet (Widodo, *belum dipublikasikan*). Hasil validasi menunjukkan bahwa terdapat dua marka yaitu P01-350 dan OPM19-350 konsisten terpaut pada galur-galur toleran hasil seleksi lapang. Kedua marka ini kemudian dipilih sebagai marka yang digunakan dalam *Marker Assisted Selection*.

Seleksi Galur-galur Kedelai dengan Marka RAPD

Marka yang terpilih dari hasil seleksi marka digunakan dalam seleksi terhadap 150 galur hasil pemuliaan dari Dr Darman Arsyad dan 150 galur dari hasil pemuliaan Research Group on Crop Improvement, Departemen Agronomi dan Hortikultura IPB. Galur-galur RGCI merupakan galur-galur kedelai yang dikembangkan dari persilangan tetua toleran naungan, Ceneng dan Pangrango, sedangkan galur-galur dari Dr. Darman M. Arsyad adalah galur-galur yang diseleksi untuk karakter produksi yaitu biji besar.

Seleksi terhadap galur-galur ini masih berlangsung, dari 300 galur telah dilakukan seleksi terhadap lebih dari 200 galur dengan menggunakan marka P01-350. Hasil amplifikasi DNA dengan primer PO1 menunjukkan polimorfisme untuk marka PO1-350. Galur-galur yang positif membawa marka ini diseleksi sebagai galur toleran.



Gambar 2. Hasil amplifikasi DNA galur-galur kedelai dengan menggunakan primer P01. Galur no 57, 58, dan 68 positif membawa marka P01-350 yang terpaat dengan karakter toleransi kedelai terhadap intensitas cahaya rendah (Widodo, belum dipublikasikan).

KESIMPULAN

1. Karakter hasil biji per tanaman dalam keadaan tercekam intensitas cahaya rendah dapat memisahkan galur-galur kedelai toleran dan peka terhadap cekaman intensitas cahaya rendah.
2. *Bulk segregant analysis* dapat menyeleksi marka RAPD yang terpaat karakter toleransi kedelai terhadap intensitas cahaya rendah.
3. Marka P01-350 dan OPM-19-350 dapat digunakan untuk memisahkan galur-galur kedelai toleran dan peka terhadap intensitas cahaya rendah.

DAFTAR PUSTAKA

- Aluko, G.K and J. H. Oard. 2004. Evaluation of discriminant analysis as a tool for rapid identification of marker associated with drought resistance in rice. Rockefeller Foundation Workshop. CIMMYT.
- Asadi B dan D.M. Arsyad. 1995. "Pangrango" a new soybean variety for intercropping with maize. Food Legume Coarse Grain, Network Newsletter. 33: 15-18.
- Asadi, B., D. M. Arsyad, H. Zahara dan Darmijati. 1997. Pemuliaan kedelai untuk toleran naungan. Buletin Agrobio. 1(2):15-20.
- Babu, R, S.K. Nar, B.M. Prasanna and H. S. Gupta. 2004. Marker Assisted Selection and Crop Improvement. Current Science Special Review. 81:607-619.
- Balitbang Pertanian. 2005. Prospek dan arah pengembangan agribisnis kedelai. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Departemen Pertanian. 32 hal

- Ceccarelli, S. 1994. Specific adaptation and breeding for marginal conditions. *Euphytica* 77: 205-209
- Cheghamirza, K, O. Koveza, F. Konovalov, and S. Gostimsky. 2002. Identification of RAPD markers and their use for molecular mapping in Pea (*Pisum sativum* L.). *Cellular and Molecular Biology Letters* 7:649-685.
- Nurhaimi. 2004. Biology of Hevea Development and Natural Rubber Production: Development of Rootstock Clones for High Productivity on Rubber Plant (*Hevea Brasiliensis* Muell. Arg). Research Proposal. Indonesian International Joint Research Grant Program. p 22
- Sopandie, D., Khumaida N., Kisman, Takano T. 2005. Adaptability of soybean to shade stress: Cloning and identification of a full-length cDNA clone encoding the photosystem I sub unit. The 10th International Congress of SABRAO (The Society for The Advancement of Breeding Researches in Asia and Oceania), Tsukuba, Japan, August 22-23, 2005
- Sopandie, D., Trikoekoesomaningtyas, E. Sulistiyono, dan N. Heriani 2002. Pengembangan kedelai sebagai tanaman sela : Fisiologi dan pemuliaan untuk toleransi terhadap naungan. Laporan Penelitian Hibah Bersaing. Dirjen Dikti
- Sopandie, . Trikoekoesomaningtyas, E. Sulistiyono, dan N. Heriani 2003. Pengembangan kedelai sebagai tanaman sela : Fisiologi dan pemuliaan untuk toleransi terhadap naungan. Laporan Penelitian Hibah Bersaing. Dirjen Dikti
- Sopandie, D., Trikoesoemaningtyas, dan N. Khumaida. 2006. Pembentukan Varietas Unggul Kedelai Toleran Naungan: Fisiologi, Genetik, dan Molekuler Adaptasi terhadap Intensitas Cahaya Rendah Laporan Penelitian Hibah Penelitian Tim Pascasarjana. Dirjen Pendidikan Tinggi. Mendiknas
- Sopandie, D., Trikoesoemaningtyas, E. Sulistiyono, N. Heryani. 2002. Pengembangan kedelai sebagai tanaman sela : Fisiologi dan pemuliaan untuk toleransi terhadap naungan. Laporan Penelitian Hibah Bersaing. Dirjen Dikti
- Trikoesoemaningtyas, D. Wirnas, D. Sopandie, T. Takano. 2004. Development of selection criteria for the selection of shade-tolerant soybean lines. Proceeding of the 4th Seminar Toward Harmonization between Development and Environmental Conservation in Biological Production. Banten, December 2-4, 2004.
- Trikoesoemaningtyas, D. Wirnas, D. Sopandie. T. Takano. 2005. Identifikasi kriteria seleksi dan marka molekuler untuk seleksi kedelai toleran naungan. Prosiding Konggres Bioteknologi Indonesia. Malang, April 2005.