

Persilangan Kedelai (*Glycine max* L. Merrill.) Varietas Anjasmoro dan Grobogan dengan Galur *Gm2* dan *Gm5* Toleran Alumunium (Al)

Hybridization of Soybean (*Glycine max* L. Merrill.) Anjasmoro and Grobogan Varieties With *Gm2* and *Gm5* Line to Aluminum (Al) Tolerant

Laila Nur Fatimah^{1*)}, Saptowo Jumali Pardal²⁾, Darmawan Saptadi¹⁾

¹⁾ Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Brawijaya University
 Jl. Veteran, Malang 65145 Jawa Timur, Indonesia

²⁾ Balai Besar Litbang Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian
 Jl. Tentara Pelajar No. 3A, Bogor 16111 Jawa Barat, Indonesia

^{*)}E-mail:lailanurfatimah31@gmail.com

ABSTRAK

Transformasi genetik dengan menyisipkan gen *MaMt2* sebagai gen toleran alumunium (Al) pada kedelai (*Glycine max* L. Merrill.) telah dilakukan dan hasil seleksi diperoleh galur *Gm2* dan *Gm5*. Galur *Gm2* dan *Gm5* memiliki biji kecil dan produktivitas rendah sehingga perlu ditingkatkan melalui persilangan buatan. Persilangan dilakukan menggunakan tetua betina varietas Anjasmoro dan Grobogan karena memiliki produktivitas tinggi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keberhasilan persilangan antara galur *Gm2* dan *Gm5* dengan varietas Anjasmoro dan Grobogan. Persilangan dilakukan dengan tiga kelompok perlakuan yaitu persilangan buatan (*crossing*), *selfing* buatan dan *selfing* alami. Hasil persilangan buatan menunjukkan persentase 56,67% hingga 80%, dengan tetua jantan galur *Gm5* memiliki persentase lebih tinggi dibandingkan galur *Gm2*. Keberhasilan *selfing* alami memiliki rerata paling tinggi (93,33% sampai 96,67%) dibandingkan *selfing* buatan maupun persilangan buatan.

Kata kunci: Gen *MaMt2*, *Gm2*, *Gm5*, Varietas toleran Al

ABSTRACT

Genetic transformation by inserting *MaMt2* gene for aluminum (Al) tolerant in soybean (*Glycine max* L. Merrill.) has been done and

the selection obtained *Gm2* and *Gm5* lines. *Gm2* and *Gm5* lines have small seeds and low productivity so its need to be increased through artificial crosses. Crosses were using female parents of Anjasmoro and Grobogan varieties because had high productivity. This research aims to determine the success of the crossing between *Gm2* and *Gm5* line with Anjasmoro and Grobogan varieties. The crossing was done with three treatment groups consist of crossing, hand selfing and natural selfing. The results of crosses showed a percentage of 56.67% to 80%, with the male parent *Gm5* line having a higher percentage than the *Gm2* line. Natural selfing success has the highest average (93.33% to 96.67%) compared to artificial selfing and artificial crosses.

Keywords: Al tolerant varieties, *Gm2*, *Gm5*, *MaMt2* gene

PENDAHULUAN

Kedelai (*Glycine max* L. Merrill.) menjadi salah satu komoditas pangan utama di Indonesia sebagai sumber protein nabati. Pengembangan kedelai di lahan marginal terkendala adanya kemasaman tanah dan kejenuhan alumunium (Al). Penanganan kemasaman tanah dan kejenuhan Al secara teknis dapat dilakukan melalui pengapuran, namun Pardal dan Suharsono (2016) menyatakan bahwa aplikasi kapur pada tanah masam untuk

budidaya kedelai memberikan pengaruh yang cepat hilang sehingga kurang ekonomis bagi petani. Alternatif lainnya adalah dengan menanam varietas kedelai toleran tanah masam dengan kejenuhan Al tinggi. Tetapi hingga saat ini ketersediaan varietas kedelai yang mampu beradaptasi dan berproduksi tinggi pada lahan masam masih terbatas. Oleh karena itu perlu diupayakan perakitan varietas kedelai yang memiliki toleransi terhadap cekaman Al.

Transformasi genetik terhadap kedelai telah dilakukan Anggraito (2012) dengan menyisipkan gen toleran cekaman Al (*MaMt2*) ke dalam kedelai varietas Lumut (kedelai peka Al) secara *in vitro* dan menghasilkan 31 galur pada generasi T0. Seleksi secara molekuler terhadap 31 galur menghasilkan sembilan galur yang positif mengandung gen *MaMt2*. Pardal dan Suharsono (2016) melakukan uji fenotipik dan genetik pada generasi T2 dengan hasil berupa empat galur memiliki toleransi terhadap cekaman Al, yaitu *Gm2*, *Gm5*, *Gm10* dan *Gm14*. Seleksi generasi T3 menghasilkan empat galur yang masih mengandung gen *MaMt2*, secara fenotipik *Gm2* dan *Gm5* menunjukkan pertumbuhan yang lebih baik.

Pengembangan galur *Gm2* dan *Gm5* diarahkan untuk menghasilkan kedelai toleran Al dan berdaya hasil tinggi. Karena galur *Gm2* dan *Gm5* memiliki daya hasil relatif rendah, maka perlu dilakukan upaya peningkatan daya hasilnya. Salah satu teknik yang dapat diterapkan adalah persilangan buatan dengan kedelai budidaya berdaya hasil tinggi seperti varietas Anjasmoro (2,03-2,25 ton ha⁻¹ dan Grobogan (2,77-3,40 ton ha⁻¹) (Balitkabi, 2016).

Persilangan antara kedelai hasil transformasi genetik galur *Gm2* dan *Gm5* sebagai donor gen toleransi Al dengan kedelai budidaya varietas Anjasmoro dan Grobogan dilakukan untuk memindahkan sifat toleransi Al pada kedelai budidaya yang berdaya hasil tinggi. Sehingga penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat keberhasilan persilangan antar kedelai hasil transformasi genetik dengan kedelai budidaya.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di rumah kawat kelompok peneliti Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (BB Biogen), Bogor pada bulan Desember 2017 sampai dengan April 2018.

Bahan yang digunakan adalah tanaman kedelai varietas Anjasmoro, Grobogan serta dua galur toleran Al yaitu *Gm2* dan *Gm5*, benang, label, tanah, ajir dan pupuk NPK mutiara. Alat yang digunakan dalam penelitian meliputi pinset, spidol permanen, tali rafia, gunting, gembor, sprayer, timbangan dan penggaris.

Penelitian menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan rancangan persilangan biparental. Tetua betina menggunakan kedelai varietas Anjasmoro dan Grobogan, sedangkan tetua jantan adalah galur *Gm2* dan *Gm5* toleran Al. Kombinasi tetua Persilangan antar tetua dihasilkan dua belas kombinasi yaitu (1) ♀Anjasmoro x ♂*Gm2*, (2) ♀Anjasmoro x ♂*Gm5*, (3) ♀Grobogan x ♂*Gm2*, (4) ♀Grobogan x ♂*Gm5*, (5) ♀Anjasmoro x ♂Anjasmoro, (6) ♀Grobogan x ♂Grobogan, (7) ♀Grobogan x ♂*Gm2*, (8) ♀Grobogan x ♂*Gm5*, (9) *Selfing* Anjasmoro, (10) *Selfing* Grobogan, (11) *Selfing Gm2*, (12) *Selfing Gm5*. Masing-masing kombinasi persilangan diulang sebanyak tiga kali berdasarkan kelompok waktu, yaitu ulangan 1 (08.00 – 11.00), ulangan 2 (11.00 – 14.00) dan ulangan 3 (14.00 – 17.00).

Persilangan kedelai dilaksanakan dengan prinsip membuang kepala sari yang terdapat pada tetua betina, kemudian kepala putik diserbuki dengan serbuk sari tetua jantan yang sudah dipersiapkan. Persilangan dilakukan pada saat tanaman mulai berbunga pada 30 – 45 Hst. Setiap kombinasi persilangan dipilih 10 bunga untuk disilangkan.

Bunga yang muncul lima hari pertama dan berada di batang utama diprioritaskan sebagai tetua terpilih karena memiliki karakteristik lebih baik. Bunga yang dipilih sebagai tetua betina merupakan kuncup yang masih terbungkus kelopak, dengan mahkota bunga di bagian ujung sudah mulai terlihat dan kuncup besar (menggembung). Bunga sebagai tetua

betina yang sudah siap disilangkan kemudian dikastrasi. Kastrasi dilakukan dengan cara bunga terpilih dipegang menggunakan jari telunjuk dan ibu jari tangan kiri, tangan kanan digunakan untuk memegang pinset. Kemudian mahkota bunganya dibuka dan dibuang menggunakan pinset yang memiliki ujung lancip. Bunga terpilih yang sudah dikastrasi selanjutnya dilakukan emaskulasi yaitu pembuangan tangkai sari yang mengelilingi kepala putik.

Penyerbukan dilakukan sesaat setelah dilakukan kastrasi dan emaskulasi pada bunga terpilih sebagai tetua betina. Bunga terpilih dari tetua jantan (galur *Gm2* dan *Gm5*) yang baru mekar dan segar diambil menggunakan pinset, untuk selanjutnya dioleskan pada kepala putik tetua betina. Bunga yang sudah dilakukan penyerbukan selanjutnya ditandai dengan benang untuk membedakan hasil persilangan dan diberikan label. Persilangan antar tetua yang digunakan sebagai kontrol dibiarkan menyerbuk sendiri.

Variabel yang diamati meliputi persentase keberhasilan persilangan, persentase pembentukan polong, jumlah polong berisi, jumlah polong hampa, jumlah biji per polong, panjang polong, lebar polong, tebal polong, panjang biji, lebar biji, tebal biji, umur berbunga, dan umur masak polong. Data kuantitatif pada variabel persentase keberhasilan persilangan dan persentase pembentukan polong dianalisis dengan analisis ragam (ANOVA) dan dilanjutkan dengan uji lanjut apabila menunjukkan pengaruh nyata menggunakan uji DMRT (*Duncan's Multiple Range Test*) pada taraf 5%. Hasil pengamatan pada variabel ukuran (panjang, lebar, tebal) polong dan ukuran (panjang, lebar, tebal) biji dianalisis menggunakan uji *t* independent pada taraf 5% untuk membandingkan hasil persilangan dari perlakuan *crossing* dan *selfing*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Persilangan buatan dilakukan sebagai salah satu upaya untuk mendapatkan kombinasi baru terhadap sifat tertentu, misalnya kedelai toleran Al

berdaya hasil tinggi. Keberhasilan persilangan ditentukan oleh banyak faktor, seperti kombinasi tetua dan kecocokan masing-masing tetua, cuaca saat persilangan, kesehatan tanaman serta kemampuan penyilang (Talukdar dan Shivakumar, 2012). Selain itu, sinkronisasi waktu berbunga antara tanaman yang akan dijadikan tetua juga sangat perlu diperhatikan.

Umur mulai berbunga paling cepat ditunjukkan oleh tetua persilangan Grobogan (33,86 hst) dibandingkan Anjamoro (38,47 hst), *Gm5* (46,58 hst) maupun *Gm2* (46,62 hst). Galur *Gm5* dan *Gm2* memiliki umur mulai berbunga hampir bersamaan karena memiliki asal yang sama yaitu kedelai varietas Lumut. Karena memiliki umur berbunga yang tidak sama maka penanaman tetua dapat dilakukan secara berselang sehingga didapatkan sinkronisasi umur berbunga antar tetua persilangan.

Kombinasi tetua persilangan kedelai memberikan pengaruh nyata terhadap keberhasilan persilangan. Perlakuan *selfing* alami menunjukkan hasil keberhasilan penyerbukan tertinggi (93,33% sampai 96,67%) dibandingkan dengan *selfing* buatan maupun persilangan buatan, karena bunga kedelai bersifat kleistogami sehingga kepala putik diserbuki secara langsung oleh benang sari sebelum atau sesaat setelah mahkota bunga membuka (*anthesis*) (Talukdar dan Shivakumar, 2012). Keberhasilan persilangan buatan pada penelitian sebesar 56,67%-80% (Tabel 1) tergolong baik karena kedelai memiliki persentase keberhasilan persilangan buatan rendah 11-15% (Talukdar dan Shivakumar, 2012). Hasil tersebut setara dengan hasil persilangan buatan Shivakumar *et al.* (2016) yaitu 54,23%-66,25% serta Matsuo *et al.* (2015) sebesar 64,8% pada kondisi lapang.

Cuaca saat persilangan berpengaruh pada keberhasilan persilangan. Persilangan yang dilakukan pada cuaca sejuk (24°C - 28°C) menghasilkan pengaruh berbeda tidak nyata terhadap tiga periode waktu ulangan (U1 08.00 – 11.00, U2 11.00 – 14.00, dan U3 14.00 – 17.00). Hal ini disebabkan karena suhu saat persilangan sesuai dengan suhu

optimum kedelai untuk *anthesis* (26°C) dan perkecambahan serbuk sari (Luo, 2011). Kondisi sejuk dan lembab akan membuat periode waktu persilangan menjadi lebih lama (07.30 sampai 13.00), padahal saat cuaca panas hanya dapat dilakukan pukul 08.30 - 10.30 (Shivakumar *et al.*, 2016). Walaupun demikian cuaca yang sejuk akan menyebabkan serbuk sari menggumpal dan tidak berbentuk serbuk (Matsuo *et al.*, 2015) sehingga kemampuan untuk menyerbuki kepala putik menjadi rendah.

Tabel 1 Kerberhasilan persilangan kedelai transgenik dengan kedelai budidaya

Perlakuan	Kerberhasilan persilangan (%)	Kerberhasilan pembentukan polong (%)
A	56,67 a	59,05 e
B	80,00 ab	42,59 bc
C	60,00 a	53,77 cde
D	80,00 ab	28,97 a
E	76,67 ab	48,15 bcde
F	83,33 abc	40,28 ab
G	73,33 ab	54,17 cde
H	80,00 ab	41,60 bc
I	93,33 bc	57,04 de
J	96,67 c	44,81 bcd
K	93,33 bc	60,74 e
L	96,67 c	48,52 bcde

Keterangan: A-L: tetua persilangan; A: Anjasmoro x *Gm2*; B: Anjasmoro x *Gm5*; C: Grobogan x *Gm2*; D: Grobogan x *Gm5*; E: Anjasmoro x Anjasmoro; F: Grobogan x Grobogan; G: *Gm2* x *Gm2*; H: *Gm5* x *Gm5*; I: Anjasmoro *selfing*; J: Grobogan *selfing*; K: *Gm2selfing*; L: *Gm5selfing*

Kemahiran manusia menyilangkan berkaitan dengan morfologi bunga kedelai yang kecil dan mudah gugur. Luka pada kepala putik walaupun kecil akan menyebabkan bunga kedelai gugur (Talukdar dan Shivakumar, 2012), sehingga kemahiran manusia saat melakukan persilangan buatan diperlukan untuk meminimalkan terjadinya luka pada kepala putik ketika kastrasi maupun emaskulasi dengan tujuan persentase keberhasilan meningkat.

Jumlah polong dan biji yang dapat berkembang hingga panen berkaitan dengan ketersediaan asimilat hasil fotosintesis sebagai *source* serta karakteristik biji dan polong yang berkembang sebagai *sink* dalam keadaan seimbang. Selama periode pengisian biji kedelai, apabila terjadi ketidakseimbangan antara *source* dan *sink* akan menimbulkan kompetisi antara polong yang berkembang dan polong yang mengandung biji dengan pertumbuhan cepat yang membutuhkan asimilat dalam jumlah besar. Kompetisi ini merupakan penyebab utama gugurnya bunga dan polong pada kedelai (Egli and Bruening, 2006). Pertumbuhan serbuk sari yang tidak bersamaan pada kepala putik untuk masing-masing bunga dalam satu tetua persilangan memungkinkan kompetisi menjadi tinggi yang kemudian diikuti dengan tingkat keberhasilan pembentukan polong hanya berkisar 28,97% hingga 60,74%. (Tabel 1).

Polong yang berhasil terbentuk tidak seluruhnya mampu terisi biji, akibatnya akan dihasilkan polong hampa. Pada beberapa kondisi buluh serbuk sari mengalami kegagalan dalam pertumbuhannya yang berakibat tidak dapat mencapai bakal biji. Bakal biji yang tidak dapat dicapai buluh serbuk sari tidak akan mengalami pembuahan dan menyebabkan tidak ada biji terbentuk (Tjitrosoepomo, 2009).

Polong bernas (polong isi) kedelai umumnya mengandung 1 – 4 biji per polong, tetapi pada hasil penyerbukan buatan jumlah biji rata-rata yang terbentuk hanya berkisar 1 sampai 2 biji per polong (Tabel 2). Jumlah biji terbentuk tidak maksimal ini disebabkan karena serbuk sari yang mampu mencapai bakal buah tidak mencukupi untuk semua bakal biji di dalamnya (Calvino, 2014). Bakal biji yang berjumlah lebih dari satu per bakal buah harus dibuahi masing-masing agar semuanya membentuk biji sehingga jumlah serbuk sari yang ada dalam bakal buah harus berjumlah cukup untuk semua bakal biji (Tjitrosoepomo, 2009).

Tabel 2 Rerata jumlah polong berisi, polong hampa dan jumlah biji per polong

Perlakuan	Jumlah polong (polong)					
	Hampa	Berisi	Berbiji 1	Berbiji 2	Berbiji 3	Berbiji 4
A	0,00	3,33	1,67	1,33	0,33	0,00
B	0,67	2,67	2,00	0,67	0,00	0,00
C	0,00	3,00	2,00	1,00	0,00	0,00
D	0,00	2,33	1,67	0,67	0,00	0,00
E	0,67	3,00	1,33	1,67	0,00	0,00
F	0,33	3,00	0,33	2,67	0,00	0,00
G	1,67	2,33	1,00	0,67	0,33	0,00
H	1,00	2,33	0,67	1,67	0,00	0,00
I	0,33	5,00	1,00	2,00	2,00	0,00
J	0,67	3,67	0,33	1,33	1,67	0,33
K	0,33	4,67	1,67	1,67	1,33	0,00
L	1,00	3,67	0,33	0,67	2,67	0,00

Keterangan: Huruf A-L: kombinasi tetua persilangan; A: Anjasmoro x *Gm2*; B: Anjasmoro x *Gm5*; C: Grobogan x *Gm2*; D: Grobogan x *Gm5*; E: Anjasmoro x Anjasmoro; F: Grobogan x Grobogan; G: *Gm2* x *Gm2*; H: *Gm5* x *Gm5*; I: Anjasmoro *selfing*; J: Grobogan *selfing*; K: *Gm2selfing*; L: *Gm5selfing*

Tabel 3 Perbandingan uji t biji hasil persilangan dengan *selfing* tetua betinanya pada variabel ukuran biji (panjang, lebar, tebal)

Selfing alami	Panjang biji (cm)	Persilangan buatan	Panjang biji (cm)	Notasi
Perlakuan I	0,97	Perlakuan A	0,81	*
Perlakuan I	0,97	Perlakuan B	0,75	*
Perlakuan J	0,83	Perlakuan C	0,77	*
Perlakuan J	0,83	Perlakuan D	0,82	tn
Selfing alami	Lebar biji (cm)	Persilangan buatan	Lebar biji (cm)	Notasi
Perlakuan I	0,73	Perlakuan A	0,63	*
Perlakuan I	0,73	Perlakuan B	0,60	*
Perlakuan J	0,67	Perlakuan C	0,64	tn
Perlakuan J	0,67	Perlakuan D	0,66	tn
Selfing alami	Tebal biji (cm)	Persilangan buatan	Tebal biji (cm)	Notasi
Perlakuan I	0,55	Perlakuan A	0,46	*
Perlakuan I	0,55	Perlakuan B	0,42	*
Perlakuan J	0,54	Perlakuan C	0,45	*
Perlakuan J	0,54	Perlakuan D	0,47	*

Keterangan: Huruf A, B, C, D, I, J: kombinasi tetua persilangan; A: Anjasmoro x *Gm2*; B: Anjasmoro x *Gm5*; C: Grobogan x *Gm2*; D: Grobogan x *Gm5*; I: Anjasmoro x Anjasmoro *selfing*; J: Grobogan x Grobogan *selfing*; tanda * menunjukkan hasil berbeda nyata dalam uji t taraf 5%; tn: menunjukkan berbeda tidak nyata

Biji hasil persilangan buatan menggunakan tetua betina Anjasmoro dan Grobogan serta tetua jantan galur *Gm2* dan *Gm5* menghasilkan ukuran (panjang, lebar, tebal) biji yang berada diantara keduanya, dengan kecenderungan mengikuti ukuran tetua betina (maternal). Ukuran biji ditentukan oleh jumlah dan ukuran sel kotiledon (Davies, 1997, Duc et al., 2001).

Mengacu pada hasil persilangan resiprok pada galur *Arabidopsis thaliana* diketahui bahwa variasi jumlah sel terutama dikontrol oleh faktor maternal, sedangkan faktor non-maternal seperti adanya pengaruh paternal akan mempengaruhi sebagian besar ukuran sel (Alonso-Balanco et al., Duc et al., 2001).

Ukuran biji hasil persilangan yang dibandingkan dengan tetua betinanya

menunjukkan hasil yang berbeda nyata (Tabel 3). Meskipun demikian, tetua betina yang sama menghasilkan ukuran biji yang bervariasi ketika diserbuki dengan serbuk sari dari tetua jantan yang berbeda. Biji diploid angiospermae termasuk kedelai mengandung susunan embrio yang membawa satu salinan alel maternal dan satu salinan alel paternal, serta endosperma yang membawa dua alel salinan maternal dan satu salinan alel paternal (House *et al.*, 2010). Hal ini menunjukkan bahwa variasi ukuran biji yang berbeda pada keturunan hasil persilangan dapat dipengaruhi oleh paternal meskipun keberadaannya masih kontroversial (De Jong and Scott, 2007). Hasil yang sama ditunjukkan pula pada karakter ukuran polong, karena ukuran polong berhubungan dengan ukuran biji.

KESIMPULAN

Tingkat keberhasilan persilangan buatan antara Anjasmoro x *Gm2* memiliki persentase sebesar 56,67%, Anjasmoro x *Gm5* 80%, Grobogan x *Gm2* 60%, dan Grobogan x *Gm5* 80%. Kombinasi perlakuan selfing alami memiliki persentase keberhasilan lebih tinggi (93,33% - 96,67%) dibandingkan dengan selfing buatan (73,33% - 80%) maupun persilangan buatan (56,67%-80%). Keberhasilan pembentukan polong Anjasmoro x *Gm2*, Anjasmoro x *Gm5*, Grobogan x *Gm2*, dan Grobogan x *Gm5* secara berturut-turut adalah 59,05%; 42,59%; 53,77%; 28,97%. Keberhasilan pembentukan polong pada perlakuan selfing buatan dan selfing alami secara berturut-turut untuk Anjasmoro sebesar 48,15%; 57,04%; Grobogan sebesar 40,28%; 44,81%; *Gm2* sebesar 54,17%; 60,74%; dan *Gm5* 41,60%; 48,52%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada BB Biogen, Bogor atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan selama melaksanakan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

Anggraito, Y.U. 2012. Transformasi genetik *Nicotiana benthamiana* L. dan kedelai dengan gen *MaMt2* penyandi

metallothionein tipe II dari *Melastoma malabatricum* L. Disertasi Institut Pertanian Bogor. Bogor.

Balitkabi. 2016. Deskripsi varietas unggul aneka kacang dan umbi. Malang.

Calvino, A. 2014. Effects of ovule and seed abortion on brood size and fruit costs in the leguminous shrub *Caesalpinia gilliesii* (Wall. ex Hook.) D. Dietr. *Acta Botanica Brasillica*. 28(1): 59-67.

De Jong, T.J. and R.J. Scott. 20017. Parental conflict does not necessarily lead to the evolution of impiring. *TRENDS in Plant Science*. 12(10): 440-443.

Duc, G., A. Moessner, F. Moussy, and C.M. Declas. 2001. A xenia effect on number and volume of cotyledon cells and on seed weight in faba bean (*Vicia faba* L.). *Euphytica*. 117(2): 169-174.

Egli, D.B., and W.P. Bruening. 2006. Temporal profiles of pod production and pod set in soybean. *European Journal of Agronomy*. 24(1): 11-18.

Luo, Q. 2011. Temperature thresholds and crop production: a review. *Climatic Change*. 109(3): 583-598.

Pardal, S.J. dan Suharsono. 2016. Evaluasi galur kedelai transgenik toleran aluminium pada fasilitas uji terbatas. *Penelitian Pertanian Tanaman Pangan*. 35(2): 155-161.

Shivakumar, M., C. Gireesh and A. Talukdar. 2016. Efficiency and utility of pollination without emasculation (PWE) method in intra- and inter-specific hybridization in soybean. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*. 76(1): 98-100.

Talukdar, A. and M. Shivakumar. 2012. Pollination without emasculation: an efficient method of hybridization in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). *Current Science*. 103(6): 628-630.

Tjitrosoepomo, G. 2009. Morfologi tumbuhan. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.