

STRUKTUR GENETIK POHON INDUK *Calophyllum inophyllum* DI TEGAKAN BENIH PROVENAN BERDASARKAN PENANDA SIMPLE SEQUENCE REPEATS

Genetic structure of Calophyllum inophyllum mother trees at a provenance seed stand based on simple sequence repeats marker

ILG. Nurtjahjaningsih¹, Purnamila Sulistyawati², dan Anto Rimbawanto²

¹Kontributor Utama, ^{1,2}Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan
Jl. Palagan Tentara Pelajar KM 15, Purwobinangun, Pakem, Sleman, Yogyakarta, Indonesia
email: iluh_nc@yahoo.com

Tanggal diterima: 05 Maret 2019, Tanggal direvisi: 15 Maret 2019, Disetujui terbit: 10 Mei 2019

ABSTRACT

This study aimed to assess genetic structure of Calophyllum inophyllum mother trees using simple sequences repeats (SSR) markers to control genetic diversity at a provenance seed stand. Leaf samples were collected for DNA templates and 6 SSR primers were used. Genetic data of 280 trees were analyzed by FSTAT software, while PCoA was analyzed by GeneAlex. Results showed that number of allele (N_A) per SSR primer between 3 and 4, the allelic richness (A_R) ranged 2.805 to 4.000, the expected heterozygosity (H_E) ranged 0.018 to 0.631, inbreeding coefficient (F_{IS}) of overall SSR primers were insignificant deviate from Hardy-Weinberg Equilibrium, excepted NY3 primer. The mean H_E values of mother trees in the TBP was in low (mean $H_E=0.272$). However, the mean coefficient inbreeding values was not significant. PCoA analysis showed that the seed stand consisted genetically related trees; the 280 trees originated from only 5-6 mother trees. This is because the stand was originated from a conservation stand with narrow genetic differentiation. Management of the seed stand was discussed.

Keywords: *gene diversity, genetic differentiation, inbreeding*

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui struktur genetik pohon induk *Calophyllum inophyllum* menggunakan penanda *simple sequences repeats* (SSR) untuk mengontrol keragaman genetik di tegakan benih provenan. Sampel daun dikumpulkan untuk template DNA dan menggunakan 6 penanda SSR. Data genetik dari 280 pohon dihitung menggunakan software FSTAT, sedangkan PCoA dihitung menggunakan *software* GeneAlex. Hasil menunjukkan bahwa jumlah alel (N_A) per primer SSR antara 3 sampai 4, keragaman alel (A_R) berkisar 2,805 hingga 4,000, heterozigositas harapan (H_E) berkisar antara 0,018 hingga 0,631, koefisien *inbreeding* (F_{IS}) seluruh primer SSR tidak signifikan menyimpang dari hukum Hardy-Weinberg kecuali primer NY3. Nilai rata-rata heterozigositas harapan pohon induk didalam TBP termasuk rendah (rata-rata $H_E=0,272$). Namun demikian, nilai rata-rata *inbreeding* koefisien tidak signifikan. Analisis PCoA menunjukkan bahwa tegakan benih tersebut terdiri dari pohon yang secara genetik berkerabat; 280 pohon berasal dari 5-6 pohon induk. Hal ini disebabkan karena tegakan tersebut berasal dari tegakan konservasi yang memiliki perbedaan genetik sempit. Manajemen tegakan benih didiskusikan.

Kata kunci: *perbedaan genetik, keragaman genetik, inbreeding*

I. PENDAHULUAN

Nyamplung (*Calophyllum inophyllum*, L (Guttiferae)) termasuk dalam Family Calophyllaceae, Genus *Calophyllum* (Kindt, Dawson, & John, 2017). Jenis tanaman pantai yang bernilai ekonomi tinggi untuk *biofuel* sebagai pengganti bahan bakar fosil (Fadhlullah, Widiyanto, & Restiawati, 2015). Sebaran alam jenis ini sangat luas dari Madagaskar, India,

Jepang Taiwan, sebagian besar Asia Tenggara, Australia, Papua New Guinea, Solomon hingga Fiji (Kindt et al., 2017).

Tegakan benih provenan (TBP) nyamplung dibangun pada tahun 2011 dalam rangka memenuhi kebutuhan benih unggul untuk *biofuel* dengan rendemen minyak tinggi (Leksono, Hendrati, Windyarini, & Hasnah, 2014). Pembangunan plot TBP melibatkan biji campuran (*mixed-seeds*) dari kurang lebih 500

pohon induk di tegakan konservasi nyamplung di Watusipat, Gunung Kidul (Budi Leksono, komunikasi pribadi). Berdasarkan penelitian sebelumnya di plot Watusipat, pada musim berbunga yang cukup berlimpah, nyamplung memiliki pembungaan yang serempak dan jenis agen penyerbuk yang cukup efektif, didominasi oleh tawon dan semut, sehingga keragaman genetik anakan pada tegakan ini cukup tinggi (Nurtjahjaningsih, Sulistyawati, Widyatmoko, & Rimbawanto, 2012). Namun, tidak ada informasi pembungaan pada saat koleksi benih untuk pembangunan plot TBP. Konsekuensi apabila benih diperoleh pada saat tidak musim berbunga kemungkinan memiliki keragaman genetik rendah, tingkat *inbreeding* dan kekerabatan genetik tinggi (Nurtjahjaningsih, Saito, Tsuda, & Ide, 2007). Hal ini akan berpengaruh pada kualitas dan kuantitas benih yang dihasilkan dari plot TBP. Oleh karena itu, studi tentang struktur genetik pohon induk di plot TBP perlu dilakukan untuk memudahkan manajemen plot penghasil benih tersebut.

Simple sequence repeats (SSR) atau mikrosatelit adalah salah satu sekuen di untai DNA dengan ukuran sekuen 2-4 basa yang diulang; sekuen SSR tidak mengkode protein; mampu mendeteksi alel heterozigot (*co-dominant*) dan mempunyai tingkat *polimorfisme* tinggi (Nurtjahjaningsih, Saito, Lian, Tsuda, & Ide, 2005). Penanda SSR banyak diaplikasikan untuk meningkatkan efisiensi strategi konservasi dan pemuliaan (Alexander & Woeste, 2017; Borrell, Wang, Nichols, Buggs, & Buggs, 2018)

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui keragaman dan kekerabatan genetik pohon induk di plot TBP nyamplung. Informasi yang dihasilkan dari penelitian ini diharapkan bisa menjadi pertimbangan didalam pengelolaan TBP untuk menghasilkan benih dengan keragaman genetik tinggi dan bukan hasil kawin kerabat, dan dalam jumlah yang banyak

II. BAHAN DAN METODE

A. Waktu dan tempat

Penelitian ini dilaksanakan selama 3 bulan, dimulai pada bulan Agustus sampai dengan Oktober 2017. Sampel daun pohon induk yang digunakan berasal dari plot TBP nyamplung di Alas Kethu, Wonogiri. Analisis DNA dilakukan di Laboratorium Genetika Molekuler Balai Besar Penelitian Pengembangan Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan, Yogyakarta.

B. Bahan dan alat penelitian

1. Bahan

Materi genetik yang digunakan sebagai *template* DNA berupa daun. Bahan kimia yang digunakan diantaranya larutan CTAB (Shiraishi & Watanabe, 1995). Metode PCR menggunakan *AmpliTag Gold 360 polymerase Kit* (*Applied Biosystem*). Proses elektrophoresis menggunakan buffer 1x EDTA dan untuk staining menggunakan 1% *agarose* dan *Ethidium Bromide*).

2. Alat

Proses analisis DNA menggunakan alat diantaranya timbangan analitik, *minibeard*, *centrifuge*, lemari asam, berbagai ukuran pipet (10 μ L - 1 mL), mesin PCR (*Applied Biosystem type verity*), mesin elektrophoresis berbasis kapiler (*Applied Biosystem type 3100 avant*) dan software *GeneMapper* (*Applied Biosystem*).

C. Metode penelitian

Metode isolasi sampel DNA menggunakan daun nyamplung telah diuraikan pada penelitian sebelumnya (Nurtjahjaningsih et al., 2012). Enam penanda SSR pada nyamplung sudah dikembangkan menggunakan metode NGS (*Next-Generation Sequencing*) (Nurtjahjaningsih, et al. *under review*). Nama enam penanda SSR yang dikembangkan disajikan pada Tabel 1. Proses amplifikasi penempelan penanda SSR dilakukan

menggunakan mesin *thermal cycler*/ PCR (*poly chain reaction*) (*Applied Biosystem type verity*). Larutan PCR menggunakan *AmpliTag Gold 360 polymerase* (*Applied Biosystem*), 1 uL 2 uM primer SSR (*forward*), 1 uL 2 uM primer SSR (*reverse*) (Nurtjahjaningsih et al. *under review*). Kondisi mesin PCR terdiri dari 3 tahap yaitu tahap *denaturasi*; tahap *annealing*; tahap pemanjangan merupakan modifikasi kondisi PCR pada saat SSR nyamplung dikembangkan (Nurtjahjaningsih et al. *under review*). Elektroforesis berbasis kapiler dilakukan menggunakan mesin *Genetic Analyzer type 3100 Avant* (*Applied Biosystem*). Hasil elektroforesis berupa ukuran dan jumlah alel dibaca menggunakan *GeneMapper* (*Applied Biosystem*).

D. Rancangan penelitian

Penelitian ini menggunakan 280 sampel daun dari pohon induk nyamplung yang dipilih secara acak di plot TBP. Analisis DNA menggunakan 6 penanda SSR. Total jumlah sampel yang digunakan sebanyak 1,680 sampel.

E. Analisis data

Analisis data SSR di plot TBP menggunakan variabel jumlah alel (NA), keragaman alel (AR), heterozigositas harapan (HE), koefisien *inbreeding* (FIS). Sedangkan kekerabatan antar pohon induk di TBP menggunakan analisis *Principal coordinate analysis* (PCoA). Variabel keragaman genetik didalam TBP dihitung menggunakan program komputer FSTAT (Goudet, 2001), sedangkan analisis PCoA dihitung menggunakan program komputer GenAlex (Peakall & Smouse, 2006).

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

Karakteristik enam penanda SSR yang digunakan pada penelitian ini ditunjukkan pada Tabel 1. Tabel 1 menunjukkan jumlah alel per lokus berkisar antara 3 sampai dengan 4, dengan keragaman alel antara 2,805 sampai 3,998. Nilai heterozigositas harapan (HE) berkisar antara 0,018 sampai 0,631. Semua primer tidak menunjukkan penyimpangan dari hukum Hardy-Weinberg kecuali NY3.

Tabel 1. Karakteristik dan keragaman genetik pohon induk nyamplung di plot TBP berdasarkan 6 penanda SSR

PenandaSSR	N	N _A	A _R	H _E	F _{IS}
NY1	280	4	3,998	0,631	-0,076 ns
NY2	280	4	3,987	0,540	-0,049 ns
NY3	280	4	3,987	0,112	0,533 *
NY4	280	3	2,805	0,018	-0,006ns
NY5	280	3	2,993	0,068	-0,029ns
NY6	280	4	4,000	0,260	0,092ns
Rata-rata	280	3,7	3,628	0,272	0,004ns

Keterangan: N: Jumlah sampel, NA: Jumlah Alel, AR: Keragaman alel, HE: keragaman genetik, FIS: Koefisien *inbreeding* ns =tidak nyata, * P<0.05

Keragaman genetik di plot TBP merupakan nilai rata-rata enam penanda SSR menggunakan 280 pohon induk yang dipilih secara acak di TBP. Nilai heterozigositas harapan (HE) sebesar 0,272. Koefisien *inbreeding* (FIS) kecil dan tidak nyata (0,004).

Nilai heterozigositas harapan rendah pada Tabel 1, dijelaskan dengan hasil analisis PCoA dari 280 pohon induk nyamplung di TBP

(Gambar 1). Hasil PCoA menunjukkan bahwa 280 pohon induk mengelompok secara genetik menjadi hanya 5 kelompok besar. Hal ini menunjukkan bahwa 280 pohon induk tersebut secara genetik berkerabat dan berasal dari 5 kelompok besar.

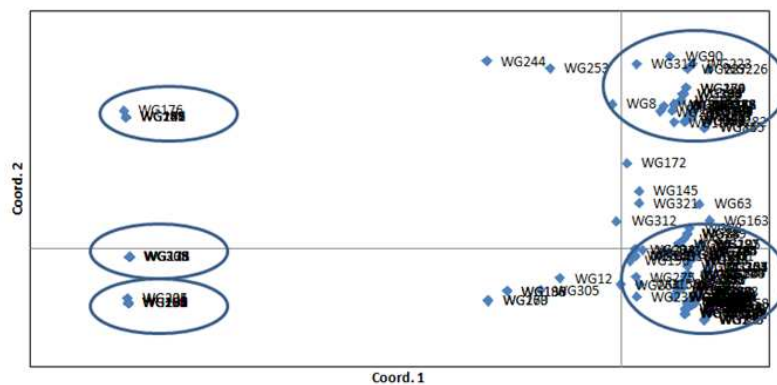
B. Pembahasan

Penanda SSR yang digunakan pada pohon induk nyamplung di plot TBP

mempunyai jumlah alel yang banyak dan nilai heterozigositas harapan (H_E) yang tinggi. Penanda tersebut juga tidak mencirikan kelebihan homozigositas atau segregasi yang menyimpang dari hukum Hardy Weinberg, kecuali primer NY3. Oleh karena itu, penanda SSR ini cukup baik digunakan untuk analisis genetik pada nyamplung.

Berdasarkan penanda SSR yang digunakan, keragaman genetik nyamplung di plot TBP termasuk rendah (rata-rata $H_E=0,272$);

sebanding dengan nilai keragaman genetik di plot konservasi Watusipat ($H_E: 0,290$) (Nurtjahjaningsih et al., 2012), maupun di populasi alam ($H_E: 0,186$) (Nurtjahjaningsih, Haryanti, Widyatmoko, Indrioko, & Rimbawanto, 2015). Nilainya lebih rendah apabila dibandingkan dengan *Acacia mangium* (rata-rata $H_E = 0,890$; Nurtjahjaningsih, *under review* jenis bambu (rata-rata $H_E=0,376$ (Jiang et al., 2017)).



Gambar 1. Analisis PCoA 280 individu nyamplung di plot TBP di Wonogiri

Berdasarkan analisis PCoA 280 individual pohon di plot TBP mengindikasikan berasal dari 5 pohon induk di plot konservasi di Watusipat. Oleh karena benih yang digunakan untuk pembangunan TBP berasal dari plot konservasi nyamplung yang ada di Watusipat, maka pembahasan difokuskan pada kemungkinan proses terjadinya benih di plot Watusipat. Banyak faktor yang berpengaruh terhadap terjadinya pembuahan di hutan tanaman seperti plot sumber benih atau kebun benih; diantaranya keseragaman umur tanaman, jarak, keserempakan pembungaan dan frekuensi ketersediaan bunga pada satu musim berbunga (Alexander & Woeste, 2017); panjang umur dan jarak pohon induk berbanding terbalik dengan keberhasilan terjadinya buah; keserempakan pembungaan berbanding lurus dengan pembuahan; sedangkan awal mekarnya bunga jantan pada musim berbunga merupakan musim terbaik untuk pembuahan pada jenis oak (*Quercus rubra*) (Alexander & Woeste, 2017; Nurtjahjaningsih et al., 2007) melaporkan

bahwa nilai H_E benih yang dihasilkan di kebun benih *Pinus merkusii* bergantung pada jumlah bunga jantan dan betina. Benih mempunyai nilai H_E tinggi pada puncaknya musim berbunga, dimana terjadi keseimbangan antara jumlah bunga betina dan jantan. Sebaliknya nilai H_E benih rendah, diperoleh pada saat produksi bunga jantan sedikit. Kontribusi bunga jantan dalam membuahi bunga betina bervariasi tergantung ketersediaan jumlah bunga jantan (Alexander & Woeste, 2017). Hal ini terjadi karena pada saat puncak musim bunga, laju *outcrossing* tinggi, bahkan tidak terjadi pohon induk hasil *selfing*. Jumlah bunga di plot konservasi Watusipat bervariasi dan dipengaruhi oleh umur pohon induk dan topografi (Nurtjahjaningsih et al., 2012). Plot konservasi nyamplung Watusipat dibangun sudah cukup lama (tahun 1958) (Nurtjahjaningsih et al., 2012). Suksesi pohon di plot ini cukup dinamis, sehingga umur pohon induk bervariasi. Pembungaan lebih banyak terjadi di areal plot bagian atas dibandingkan

bagian bawah plot (Nurtjahjaningsih et al., 2012). Hal ini salah satunya disebabkan oleh ketersediaan sinar matahari yang lebih banyak diperoleh di plot bagian atas sehingga mempengaruhi proses pembungaan. Selain itu, agen penyerbuk pada nyamplung juga bergerak aktif di bagian atas areal plot (Nurtjahjaningsih et al., 2012). Kelimpahan bunga dan aktifnya agen penyerbuk menyebabkan keragaman genetik anakan yang dihasilkan di plot bagian atas menjadi lebih tinggi dibandingkan plot bagian bawah. Faktor lingkungan juga menyebabkan variasi pembungaan pada oak (*Quercus robur*) (Caignard, Delzon, Bodénès, Dencausse, & Kremer, 2019).

Nilai koefisien *inbreeding* di plot TBP tidak signifikan; hal ini menggambarkan kondisi sistem perkawinan yang terjadi di plot konservasi Watusipat pada saat koleksi materi genetik untuk pembangunan TBP. Banyak faktor yang menyebabkan terjadinya perkawinan secara acak sehingga tidak menghasilkan benih hasil *inbreeding*; proses aliran gen (*gene flow*) yang tidak terhambat (Borrell et al., 2018; Hasan, Abdullah, & Sarker, 2019; Torokeldiev, Ziehe, Gailing, & Finkeldey, 2019), tercukupinya jumlah pohon induk (Potter, Campbell, Josserand, Nelson, & Jetton, 2017), pembungaan berlimpah (Alexander & Woeste, 2017). Pada musim berbunga, nyamplung memproduksi bunga cukup banyak; bunga nyamplung membentuk kelompok, setiap kelompok terdiri dari 20-30 kuntum bunga (Nurtjahjaningsih et al., 2012). Selain bentuk dan warna bunga yang menarik, bunga nyamplung juga harum sehingga menarik perhatian agen penyerbuk. Oleh karena itu, agen penyerbuk pada nyamplung (tawon, kumbang dan semut) merupakan agen pembawa serbuk sari yang cukup efektif (Nurtjahjaningsih et al., 2012); bahkan sebaran serbuk sari pada Leguminosae dengan agen penyerbuk serangga bisa mencapai 3 km (Guimarães et al., 2019).

Untuk tujuan pengelolaan plot TBP sebagai sumber benih, diusahakan untuk memaksimalkan proses pembungaan dan

penyerbukan di plot TBP. Selain itu, untuk mengetahui karakter pembungaan pada nyamplung di TBP diperlukan pengamatan secara intensif terhadap pembungaan pada awal, pertengahan dan akhir musim berbunga hingga terjadinya buah. Penjarangan pohon induk dengan menyisakan pohon dengan kelimpahan produksi bunga merupakan langkah awal untuk memaksimalkan proses fenologi. Penjarangan dilakukan untuk memaksimalkan kebutuhan sinar matahari untuk mendukung proses pembungaan. Penjarangan yang dilakukan pada *Picea abies* menyebabkan meningkatnya kesehatan dan pertumbuhan bibit (Fløistad, Hanssen, & Granhus, 2018). Penjarangan pohon juga mendukung pergerakan penyerbuk di plot TBP. Untuk meningkatkan kualitas biji di kebun benih, dilakukan dengan cara memanipulasi pembungaan seperti memperlambat atau mempercepat pembungaan masing-masing memberikan perlakuan pendinginan dan stimulasi penghangatan pada kebun benih *Pseudotsuga menziesii* (Song et al., 2018). Pemberian zat pengatur tumbuh giberelin juga sering digunakan untuk merangsang terjadinya proses pembungaan (Dong et al., 2017; Galimba, Bullock, Dardick, Liu, & Callahan, 2019). Infusi genetik dari populasi alam nyamplung juga bisa diaplikasikan untuk memperluas kekerabatan genetik di plot TBP (Nurtjahjaningsih, 2009; Zobel & Talbert, 1991). Berdasarkan hasil tersebut di atas, beberapa pertimbangan dalam infusi genetik adalah populasi yang mempunyai keragaman genetik tinggi, bukan populasi dengan *inbreeding* tinggi, dan tidak berkerabat dengan plot TBP (Nurtjahjaningsih, 2009).

IV. KESIMPULAN

Meskipun keragaman genetik pohon induk nyamplung di plot TBP termasuk rendah, namun demikian tidak menunjukkan nilai *inbreeding* yang signifikan. Hal ini mengindikasikan bahwa sistem perkawinan pada nyamplung cenderung bersilang luar

(*outcrossing*), namun demikian untuk memaksimal kualitas dan kuantitas benih yang dihasilkan diperlukan usaha untuk memaksimalkan proses keserempakan pembungaan. Selain itu, untuk memperluas keragaman genetik di TBP diperlukan infusi genetik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh anggaran DIPA Kementerian Lingkungan Hidup dan Kehutanan. Penulis menyampaikan terima-kasih kepada tim nyamplung yang telah banyak membantu dalam pengumpulan materi genetik di lapangan maupun diskusi dalam menyelesaikan tulisan ini. Ucapan terima-kasih juga disampaikan kepada tim lapangan di TBP Wonogiri, membantu pekerjaan di lapangan. Penulis juga mengucapkan terima-kasih kepada Sdri. Wahyunisari dan Sdr. Triyanta membantu analisis DNA di laboratorium Genetika Molekuler. ILG dan AR berkontribusi dalam analisis data dan penulisan naskah, sedangkan PS berkontribusi dalam pengumpulan sampel daun nyamplung.

DAFTAR PUSTAKA

- Alexander, L., & Woeste, K. (2017). Pollen gene flow, male reproductive success and genetic correlations among offspring in a northern red oak (*Quercus rubra* L.) seed orchard. *Plos One*. <https://doi.org/DOI:10.1371/journal.pone.0171598>
- Borrell, J. S., Wang, N., Nichols, R. A., Buggs, R. J. A., & Buggs, R. J. A. (2018). Genetic diversity maintained among fragmented populations of a tree undergoing range contraction. *Heredity*, 121, 304–318.
- Caignard, T., Delzon, S., Bodénès, C., Dencausse, B., & Kremer, A. (2019). Heritability and genetic architecture of reproduction-related traits in a temperate oak species. *Tree Genetics & Genomes*, 15(1). <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11295-018-1309-2>
- Dong, B., Deng, Y., Wang, H., Gao, R., Stephen, G. K., Chen, S., ... Fadi Chen. (2017). Gibberellic acid signaling is required to induce flowering of *Chrysanthemums* grown under both short and long days. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1259). <https://doi.org/10.3390/ijms18061259>
- Fadhullah, M., Widiyanto, S. N. B., & Restiawati, E. (2015). The potential of nyamplung (*Calophyllum inophyllum* L.) seed oil as biodiesel feedstock: effect of seed moisture content and particle size on oil yield. *Energy Procedia*, 68, 177–185.
- Fløistad, I. S., Hanssen, G. H. H., & Granhus, A. (2018). Germination and seedling establishment of Norway spruce (*Picea abies*) after clear-cutting is affected by timing of soil scarification. *New Forests*, 49(2), 231–247.
- Galimba, K. D., Bullock, D. G., Dardick, C., Liu, Z., & Callahan, A. M. (2019). Gibberellic acid induced parthenocarpic “Honeycrisp” apples (*Malus domestica*) exhibit reduced ovary width and lower acidity. *Horticulture Research*, 6(41). [https://doi.org/Galimba et al. Horticulture Research \(2019\) https://doi.org/10.1038/s41438-019-0124-8](https://doi.org/Galimba et al. Horticulture Research (2019) https://doi.org/10.1038/s41438-019-0124-8)
- Goudet, J. (2001). FSTAT (version 2.9.3): A program to estimate and test gene diversities and fixation indices. <https://doi.org/www.unil.ch/izea/software/fstat.html>
- Guimarães, R. A., Miranda, K. M. C., Chaves, L. J., Naves, R. V., Telles, M. P. de C., & Thannya Nascimento Soares. (2019). Mating system and pollen dispersal in *Dipteryx allata* Vogel (Leguminosae): comparing in situ and ex situ conditions. *Tree Genetics & Genomes*, 15(28). <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11295-019-1337-6>
- Hasan, M. N. H., Abdullah, H. M., & Sarker, U. (2019). Spatial distribution and genetic diversity of wild date palm (*Phoenix sylvestris*) growing in coastal Bangladesh. *Tree Genetics & Genomes*, 15(3). <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11295-018-1310-9>
- Jiang, W., Bai, T., Dai, H., Wei, Q., Zhang, W., & Ding, Y. (2017). Microsatellite markers revealed moderate genetic diversity and population differentiation of moso bamboo (*Phyllostachys edulis*)—a primarily asexual reproduction species in China. *Tree Genetics & Genomes*, 13(130). <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11295-017-1212-2>
- Kindt, R., Dawson, I., & John, I. (2017). Documentation of agroforestry species web database (version 1.4).

- Leksono, B., Hendrati, R. L., Windyarini, E., & Trimaria Hasnah. (2014). Variation in biofuel potential of twelve *Calophyllum inophyllum* populations in Indonesia. *Indonesian Journal of Forest Research*, 1(2), 127–138
- Nurtjahjaningsih, I. L. G. (2009). A potency of genetic infusion populations to broaden genetic variation in the seedling seed orchard of *Pinus merkusii* in Jember. *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*, 3(2), 73–81.
- Nurtjahjaningsih, I. L. G., Haryanti, T., Widyatmoko, A. Y. P. B. C., Indrioko, S., & Rimbawanto, A. (2015). Keragaman genetik populasi *Calophyllum inophyllum* Menggunakan penanda RAPD. *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*, 9(2), 91–102.
- Nurtjahjaningsih, I. L. G., Saito, Y., Lian, C. L., Tsuda, Y., & Ide, Y. (2005). Development and characteristics of microsatellite markers in *Pinus merkusii*. *Molecular Ecology Notes*, 5(3). <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.00984.x>
- Nurtjahjaningsih, I. L. G., Saito, Y., Tsuda, Y., & Ide, Y. (2007). Genetic diversity of parental and offspring populations in a *Pinus merkusii* seedling seed orchard detected by microsatellite markres. *Bulletin-Tokyo University Forest*, 118, 1–14.
- Nurtjahjaningsih, I. L. G., Sulistyawati, P., Widyatmoko, A., & Rimbawanto, A. (2012). Karakteristik pembungan dan sistem perkawinan nyamplung (*Calophyllum inophyllum*) pada hutan tanaman di Watusipat, Gunung Kidul. *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*, 6(2), 65–80.
- Peakall, R., & Smouse, P. E. (2006). GenAlex 6: Genetic analysis in excel, Population genetic software for teachng and research. *Molecular Ecology Notes*, 6, 288–295.
- Potter, K. M., Campbell, A. R., Josserand, S. A., Nelson, C. D., & Jetton, R. M. (2017). Population isolation results in unexpectedly high differentiation in Carolina hemlock (*Tsuga caroliniana*), an imperiled southern Appalachian endemic conifer. *Tree Genetics & Genomes*, 13(105). <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11295-017-1189-x>
- Shiraishi, S., & Watanabe, A. (1995). Identification of chloroplast genome between *Pinus densiflora* Sieb et Zucc and *P. thumbergii* Parl based on the polymorphism in rbcL gene. *Journal of Japanese Forestry Society*, 77, 429–436.
- Song, J., Ratcliffe, B., Kess, T., S.Lai, B., Korecky, J., & El-Kassaby, Y. A. (2018). Temporal quantification of mating system parameters in a coastal Douglas-fir seed orchard under manipulated pollination environment. *Scientific Reports*. <https://doi.org/DOI:10.1038/s41598-018-30041-4>
- Torokeldiev, N., Ziehe, M., Gailing, O., & Finkeldey, R. (2019). Genetic diversity and structure of natural *Juglans regia* L. populations in the southern Kyrgyz Republic revealed by nuclear SSR and EST-SSR markers. *Tree Genetics & Genomes*, 15(5). <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11295-018-1311-8>
- Zobel, B., & Talbert, J. (1991). *Applied forest tree improvement*. U.S.A: Waveland Press, Inc.

