

VARIASI NUKLEOTIDA PADA PADI *JAPONICA* BERDASARKAN *PHOSPHOSERINE PHOSPHATASE* DAN *OSMADS20* UNTUK PENGEMBANGAN MARKA MOLEKULER

Puji Lestari*, Sustiprijatno, dan Nurul Hidayatun

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar No. 3A Bogor 16111

*Korespondensi: plestari129@yahoo.com

ABSTRAK

Phosphoserine phosphatase (PSP) merupakan protein yang terlibat dalam *pathway* fosforilasi dalam biosintesis serin yang mengontrol polen dan sterilitas. *OsMADS20* diduga terlibat dalam pembungaan, pemasakan biji dan aspek perkembangan/pertumbuhan tanaman padi. Studi lebih lanjut diperlukan terhadap gen-gen pada posisi QTL untuk mutu rasa dan pembungaan terutama PSP dan *OsMADS* pada padi *japonica*. Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis variasi genetik varietas padi *japonica* berdasarkan PSP dan famili gen *OsMADS20 box*, dan verifikasi marka molekuler hasil pengembangannya. Total 22 varietas padi *japonica* diamplifikasi menggunakan primer STS pada sekuen parsial PSP dan *OsMADS20*, sekuennya disejajarkan dengan kultivar rujukan dan dikembangkan marka molekulernya berdasarkan varian terpilih. Sejumlah SNP dan indel diidentifikasi lebih banyak pada *OsMADS20* daripada PSP. SNP G/A di 110 bp pada PSP dan indel 7 bp (AAATTTT) pada *OsMADS20* menunjukkan variasi pada varietas padi *japonica* dan didesain primernya yaitu CAPS-PP2/MseI dan indel-MAD masing-masing untuk PSP dan *OsMADS20*. Analisis filogeni menunjukkan bahwa tanpa mempertimbangkan negara asal, 2 kluster utama dibentuk yang terdiri dari 17 (kluster I) dan 5 varietas (kluster II). Varietas pada kluster II dicirikan dengan alel "A" pada situs 110 bp di PSP. Hasil filogenetik ini juga membuktikan bahwa alel spesifik yang hanya ditemukan pada varietas tertentu berpengaruh terhadap jarak genetik yang berimplikasi pada kedekatan antara varietas padi *japonica*. Secara umum variasi genetik dan marka molekuler yang dikembangkan untuk gen PSP dan *OsMADS20* akan bermanfaat sebagai informasi dasar program pemuliaan padi tidak hanya *japonica* namun juga subspecies lainnya dan penting untuk evaluasi plasma nutfah padi.

Kata kunci: marka molekuler, phosphoserine phosphatase, *OsMADS20*, variasi nukleotida

ABSTRACT

Phosphoserine phosphatase (PSP), a protein involved in the phosphorylation pathway of serine biosynthesis, controls pollen and sterility. *OsMADS20* is allegedly involved in flowering, seed ripening and aspects of development/growth

of the rice plant. Further study of these genes within the QTLs related to eating quality and days to heading, particularly, PSP and OsMADS20 on japonica rice is needed. This study aimed at analyzing the genetic variation of japonica rice varieties based on PSP and OsMADS20, and verification of molecular markers developed. A total of 22 japonica varieties was amplified using STS primers for partial sequences of PSP and OsMADS20, aligned their resulting sequenced with the reference cultivar and developed molecular markers for selected variants. A number of SNPs and Indels were identified higher on OsMADS20 than those on PSP. SNP G/A at 110 bp on PSP and Indel of 7 bp (AAATTTT) showed variation among japonica rice varieties, consequently we developed the corresponding markers namely CAPS-PP2/*Mse*I and Indel-MAD, respectively. Phylogenetic analysis showed that regardless of the variety origin, two main clusters were generated and consisted of 17 (cluster I) and five varieties (cluster II). Varieties on cluster II were characterized by allele "A" at 110 bp in PSP. Furthermore, the phylogenetic tree proved that specific alleles only found in certain varieties influenced the different genetic distance that implied for the relatedness among japonica rice varieties. Taken together, genetic variation and molecular markers developed for PSP and OsMADS20 genes will be useful as a basic information for not only japonica rice breeding but also other subspecies and is important for evaluation of rice germplasm.

Key words: molecular marker, phosphoserine phosphatase, OsMAD20, nucleotide variation

PENDAHULUAN

Phosphoserine phosphatase (PSP) merupakan protein yang terlibat dalam *pathway* fosforilasi dalam biosintesis serin, terutama sebagai katalisator pada tahap akhir biosintesis. Biosintesis serin sebenarnya merupakan proses esensial fase reproduksi tanaman khususnya saat formasi biji polen matang. Fosforilasi yang menghasilkan serin menjadi jembatan antara metabolisme dan perkembangan tanaman (Ros *et al.* 2014). PSP ini juga berperan pada perkembangan embrio dan pertumbuhan akar tanaman (Munoz-Bertomeu *et al.* 2013). PSP diketahui homolog pada tanaman padi dan *Arabidopsis thaliana*. Mutasi pada daerah promotor gen PSP berpengaruh pada sterilitas dan bentuk polen pada *A. thaliana* (Flores-Tornero *et al.* 2015).

MADS box merupakan motif sekuen *conserve* dalam famili gen MADS box. Fungsi famili gen ini beragam tergantung aspek perkembangan dan pertumbuhan tanaman yang meliputi identitas meristem, pembungaan, identitas organ bunga, pemasakan buah, perkembangan embrio, perkembangan organ vegetatif pada akar dan daun. Di padi, gen OsMADS kemungkinan berperan pada karakter percabangan malai (Furutani *et al.* 2006) dan perkembangan reproduktif lainnya serta sistem pertahanan terhadap cekaman (Arora *et al.* 2007). OsMADS yang merupakan bagian faktor transkripsi menunjukkan homologi di beberapa spesies tanaman dengan fungsi yang mirip. Di padi OsMADS20 merupakan salah satu

gen diantara famili gen MADS box (OsMADS14, OsMADS15 dan OsMADS18) yang homolog dengan *API*. Ke-4 gen tersebut kemungkinan besar berperan dalam pembungaan tanaman padi (Lee et al. 2003; Fornara et al. 2004).

Variasi genetik pada sejumlah gen penting di padi berkontribusi pada elusidasi evolusi gen-gen tersebut. Variasi nukleotida pada PSP dan OsMADS20 yang diobservasi pada padi *japonica* penting untuk menelusuri hubungan kekerabatan atau variasi genetik antara varietas. Analisis filogeni pada 107 gen MADS box menunjukkan kemungkinan nenek moyang secara umum antara padi dan Arabidopsis dan terjadi ekspansi secara independen setelah divergensi antara dikotil dan monotoktil (Arora et al. 2007). Analisis filogeni sekuen deduksi asam amino gen PSP membuktikan adanya kedekatan antara Arabidopsis dengan manusia (Ho et al. 1999). Selain itu, variasi dalam gen atau genom pada padi *japonica* dan *indica* telah membantu dalam pengembangan marka molekuler (Lestari et al. 2009; 2015).

Marka molekuler untuk gen-gen penting diharapkan dapat membantu program pemuliaan dan pengelolaan plasma nutfah padi serta studi genetik (Becker and Theissen 2003; Lestari et al. 2011). Beberapa marka molekuler telah dikembangkan berdasarkan gen PSP khususnya pada manusia untuk deteksi penyakit (Strunck et al. 2001; Shimomura et al. 2004) namun sangat terbatas pada padi. Sementara studi gen OsMADS banyak dititik beratkan pada analisis fungsionalnya terkait pembungaan, namun marka molekuler berdasarkan gen OsMADS belum banyak dikembangkan pada tanaman (Lee et al. 2004).

Studi QTL untuk mutu biji padi telah dilakukan pada berbagai populasi persilangan padi *japonica* (Kwon et al. 2007; Wada et al. 2008). Khusus QTL terkait mutu biji padi dan mutu rasa beras *japonica* telah diidentifikasi sebelumnya di kromosom 12. Sebuah marka SSR yang terkait karakter di padi tersebut menjadi petunjuk untuk mengidentifikasi gen-gen terkait karakter penting termasuk PSP dan OsMADS20 (Wada et al. 2008). Untuk itu studi lebih lanjut terhadap gen-gen pada posisi QTL tersebut perlu dilakukan. Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis variasi genetik varietas padi *japonica* berdasarkan sekuen parsial PSP dan OsMADS20, dan verifikasi marka molekuler hasil pengembangannya.

BAHAN DAN METODE

Materi tanaman

Sebanyak 22 varietas padi *japonica* yang digunakan dalam studi ini terdiri dari 19 varietas dari Korea Selatan (Gopum, Samgwang, Ilpum, Chucheong, Dongjin, Sinkeumo, Hwaseong, Hwacheong, Dobong, Samnam, Palkong, Baekjinju, Seonong4, Onnuri, Manmi, Giho, Geuman, Nakdong, dan Samdeok), dua varietas dari Jepang (Koshihikari dan Hitomebore) dan satu dari Cina (Hexi41). Benih padi ditanam sekitar 4-5 minggu di rumah kaca, kemudian dipilih daun sehat dan muda untuk diekstraksi DNA totalnya. Daun yang dipanen dibekukan

dalam nitrogen cair, kemudian disimpan pada suhu -80°C sampai dilakukan isolasi DNA-nya.

Isolasi DNA genomik

Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan *cetyltrimethylammonium bromide* (CTAB) menurut protokol dari Murray dan Thompson (1980). DNA hasil purifikasi dilarutkan dalam 50 µl bufer TE. Kualitas dan kuantitas DNA ditetapkan menggunakan Nano Drop[®] ND-1000 Spektrofotometer (Nano Drop, Willington, Delaware, USA) dan juga dimigrasikan melalui elektroforesis gel agarose 0.8%. DNA divisualisasikan di atas transiluminator UV. Selanjutnya DNA diencerkan dengan air distilata untuk analisis PCR berdasarkan konsentrasi DNA stok.

Polymerase Chain Reaction (PCR), TA kloning dan sekuensing

Sekuen gen target sesuai posisi fisik marka terkait QTL untuk mutu rasa beras dieksplorasi dan diambil dari database sesuai laporan sebelumnya (Lestari *et al.* 2011) berdasarkan selang posisi fisik marka SSR RM1246 di kromosom 12 (Wada *et al.* 2008). Desain primer menggunakan program PRIMER3 yang tersedia online di <http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3> (Rozen and Skaletsky 2000). Komposisi PCR dilakukan dalam total volume 50 µl yang terdiri dari 2 µl DNA 20 ng/µl, 10X bufer mengandung 25 mM MgCl₂, 1 µl 2.5 mM dNTPs, 1 U Ex Takara Taq Polymerase (Takara Bio, Inc. Jepang) dan masing-masing 1 µl primer *forward* dan *reverse* (10 uM). Reaksi PCR dilakukan menggunakan mesin PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Inc. USA) dengan program sebagai berikut: denaturasi awal pada 95 °C selama 4 menit; total 35 siklus (95 °C selama 10 detik, 55 °C selama 30 detik dan 72 °C selama 1 menit) dan perpanjangan akhir 72 °C selama 5 menit. Pita tunggal produk PCR dipurifikasi, di-TA kloning ke dalam vektor pGEM-TEasy dan selanjutnya dilakukan transformasi ke dalam sel kompeten *Escherichia coli* DH5α (Sambrook dan Russell 2001). Plasmid diisolasi menggunakan kit DNA-spin Plasmid DNA Purification (Intron Biotechnology, Korea) dan disekuensing dengan mesin Sequencer ABI3700 (Applied Biosystem, Inc).

Analisis data

Sekuen hasil amplifikasi primer STS pada sekuen pengapit gen target yang dipilih pada varietas padi *japonica* masing-masing disejajarkan dengan BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioEdit/nioedit.html>) untuk mengetahui variasi nukleotidanya. Variasi nukleotida digunakan sebagai dasar parameter jarak genetik untuk analisis filogenetik diantara varietas padi *japonica* menggunakan *neighbor joining* dengan fasilitas program MEGA 4.0. *Multiple bootstrap* hasil penjajaran sekuen dilakukan dalam 1000 ulangan untuk meningkatkan presisi (Ching *et al.* 2002; Tamura *et al.* 2007).

Desain primer

Berdasarkan hasil identifikasi variasi nukleotida pada sekuen parsial gen kandidat selanjutnya didesain primer baru sesuai jenis variasinya. SNP yang diidentifikasi akan didesain primer CAPS atau dCAPS mengikuti instruksi online dCAPS Finder 2.0 (<http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html>). Sedangkan indel yang teridentifikasi digunakan sebagai dasar desain primer Indel menggunakan PRIMER3.

HASIL DAN PEMBAHASAN

QTL terkait mutu rasa (qOE12.1) dan *glossiness* (qGL12.1) telah diidentifikasi pada populasi RILs persilangan padi *japonica* antara Moritawase dan Koshihikari. Variasi fenotip pada QTL tersebut cukup tinggi khususnya qOE12.1 (28.7%) dan sekitar 9.8% pada qGL12.1. Hal menarik adalah pada posisi marka tersebut juga dekat dengan QTL putatif terkait waktu pembungaan. Karena itulah marka SSR RM1246 terkait QTL tersebut yang terletak di kromosom 12 (Wada *et al.* 2008) digunakan sebagai dasar untuk identifikasi kandidat gen yang diobservasi variasi nukleotidanya dan sebagai sumber marka molekuler baru. Dua kandidat gen, *phosphoserine phosphatase* (PP, clone AL731752) dan *MADS box family -OsMAD20* (MAD, clone AL731752) dipilih untuk diamplifikasi sekuen parsialnya pada 22 varietas padi *japonica*. Daerah PSP dan OsMADS20 yang diamplifikasi masing-masing pada selang 19,118,818-19,122,389 bp dan 19,077,506-19,086,702 bp (Tabel 1).

Analisis penjajaran sekuen kedua gen tersebut dilakukan merujuk pada sekuen dari kultivar rujukan (Nipponbare) dan berhasil mendeteksi *single nucleotide polymorphism* (SNP) dan insersi/delesi (indel) yang polimorfik diantara padi *japonica*. Variasi lebih banyak ditemukan di daerah non-koding daripada daerah koding. Pada PSP ditemukan jumlah SNP seperti A/G sebanyak dua dan G/A (satu) yang total terletak di tiga situs. Sedangkan pada OsMADS20, ditemukan beberapa indel dengan panjang masing-masing 7 bp (AAATTTT) dan 8 bp (ACGTTAAA) dan lebih banyak SNP (G/A, G/T, T/C, A/T, C/T, C/A) yang polimorfik diantara varietas padi *japonica* dibandingkan pada PSP (Gambar 1).

Berdasarkan varian tersebut, sebuah marka CAPS didesain untuk alel spesifik “A” pada SNP G/A seperti ditunjukkan dalam kotak di Gambar 1. Alel A pada situs SNP tersebut terlihat sebagai alel inferior pada varietas *japonica* yang hanya ditemukan pada 5 varietas yaitu Gopum, Sinkeumo, Hwaseong, Onnuri, dan Manmi (Tabel 2). Untuk memudahkan deteksi alel, primer CAPS didesain khusus alel “A” dengan memanfaatkan potongan situs enzim restriksi *MseI*. Amplikon hasil primer CAPS/*MseI* menunjukkan 935 bp, dan ukuran fragmen hasil pemotongan yang polimorfik ditunjukkan pada 388 dan 335 bp untuk varietas Koshihikari, Samgwang, Ilpum, Chucheong dan Hwacheong yang merefleksikan alel “G”. Sedangkan ukuran fragmen 335 dan 280 bp hasil *MseI* ditujukan untuk alel “A” pada PSP di situs 110 bp. Contoh hasil pemotongan amplikon yang

dihasilkan oleh primer CAPS-PP2 dengan enzim *MseI* ditunjukkan pada Gambar 2. *Genotyping* dengan primer PP2/*MseI* juga menunjukkan adanya variasi pada varietas padi indica Indonesia dan menjadi bagian dalam set marka untuk evaluasi mutu rasa beras *indica* (Lestari et al. 2015). Pada gandum, variasi dalam PSP ternyata telah dijadikan sebagai salah satu marka SNP dalam set marka seleksi dan uji variasi genetik kultivar dan *landrace* untuk membantu pengembangan *platform genotyping* skala lebih besar (Ren et al. 2013).

Inseri 7 bp (AAATTTT) pada OsMADS20 menjadi dasar untuk didesain primer indelnya (MAD) dan menunjukkan polimorfisme pada varietas padi *japonica* (Gambar 2) namun monomorfisme pada 24 varietas *indica* dari Indonesia (data tidak dipublikasi). Inseri 7 bp menyebabkan ukuran sekuen parsial menjadi 194 bp yang dominan pada varietas *japonica* (Tabel 2). Sebagai informasi penting, varietas yang memiliki alel “A” pada PSP diketahui cenderung mengalami inseri “AAATTTT” pada OsMADS20, kecuali varietas Samdeok. Penemuan ini perlu dikaji lanjut dan diobservasi lebih luas pada plasma nutfah padi *japonica* dan diamati korelasinya antara kedua tipe mutasi pada PSP dan OsMADS20 tersebut, mengingat gen-gen tersebut dieksplorasi berdasarkan marka terkait QTL yang sama. Karena fungsi gen OsMADS20 juga terkait pembungaan yang sesuai dengan QTL untuk karakter pembungaan yang dideteksi (Wada et al. 2008), maka pemanfaatan marka indel MAD mungkin dapat diarahkan tidak hanya untuk mutu rasa beras tetapi untuk membantu evaluasi varietas terkait waktu pembungaan atau karakter penting morfo-agronomi lainnya.

Analisis filogeni berdasarkan variasi SNP (G/A) pada PSP dan indel 7 bp pada OsMADS20 dibuat untuk mengetahui kekerabatan genetik antara 22 varietas padi *japonica* (Gambar 3). Tanpa mempertimbangkan negara asal, 2 klaster dibentuk dengan komposisi 17 varietas pada klaster I, dan klaster II yang mengelompokkan 5 varietas seperti Gopum, Sinkeumo, Hwaseong, Onnuri, dan Manmi yang memiliki khusus alel “A” pada situs 110 bp di PSP. Hasil filogenetik ini semakin membuktikan bahwa alel spesifik yang hanya ditemukan pada varietas tertentu berpengaruh terhadap jarak genetik yang berimplikasi pada kedekatan antara varietas padi *japonica*. Informasi variasi genetik dan marka molekuler untuk gen PSP dan OsMADS20 hasil pengembangan tersebut akan bermanfaat untuk dasar program pemuliaan padi tidak hanya *japonica* namun juga subspecies lainnya dan evaluasi plasma nutfah padi. Marka molekuler hasil pengembangannya terkait karakter fenotip target, dapat dianalisis melalui *linkage disequilibrium* antara situs marka dengan domain fungsional dari gen target (Bao et al. 2006). Dengan demikian, marka hasil pengembangan dalam studi ini dapat diaplikasikan baik dalam bentuk formulasi set marka berbasis PCR seperti laporan sebelumnya (Lestari et al. 2015) ataupun dicoba sebagai marka tunggal.

KESIMPULAN

Berdasarkan QTL untuk mutu rasa dan waktu pembungaan, PSP dan OsMADS20 pada kromosom 12 dipilih untuk diobservasi variasi genetiknya diantara varietas

padi japonica. Varian yang diidentifikasi pada PSP adalah SNP A/G (dua) dan G/A (satu). Pada OsMADS20 ditemukan dua indel yaitu 7 bp (AAATTT) dan 8 bp (ACGTTAAA) dan SNP (G/A, G/T, T/C, A/T, C/T, C/A). Varietas yang memiliki alel “A” pada PSP diketahui cenderung mengalami insersi “AAATTTT” pada OsMADS20, kecuali varietas Samdeok. Primer PP2/*Mse*I spesifik alel “A” berhasil dikembangkan untuk SNP G/A pada situs 110 bp dan primer indel-MAD untuk indel “AAATTTT” yang menunjukkan polimorfisme pada varietas japonica. Analisis filogeni berdasarkan variasi SNP (G/A) pada PSP dan indel 7 bp pada OsMADS20 menggambarkan kekerabatan genetik antara 22 varietas padi japonica.

DAFTAR PUSTAKA

- Arora R, Agarwal P, Eay S, Singh AK, Sing VP, Tyagi A, and Kapoor S. 2007. MADS-box gene family in rice: genome-wide identification, organization and expression profiling during reproductive development and stress. *BMC Genomics*. 8: 242.
- Bao JS, Corke H, and Sun M. 2006. Nucleotide diversity in starch synthase IIa and validation of single nucleotide polymorphisms in relation to starch gelatinization temperature and other physicochemical properties in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 113: 1171-1183.
- Becker A and Theissen G. 2003. The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants. *Mol. Phylogenet Evol.* 29(3):464-489.
- Ching A, Caldwell KS, Jung M, Dolan M, Smith OS, Tingey S, Morgante M, and Rafalski A. 2002. SNP frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines. *BMC Genet.* 3:1-14.
- Flores-Torneri M, Anoman AD, Rosa-Tellez S, and Ros R. 2015. Lack of phosphoserine phosphatase activity alters pollen and tapetum development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.* 235: 81-88.
- Fornara F, Parenicova L, Falasca G, Pelucchi N, Masiero S, Ciannamè S, Lopez-Dee Z, Altanura MM, Colombo L, and Kater MM. 2004. Functional characterization of OsMADS18, a member of the API1/SQUA subfamily of MADS box genes. *Plan Physiol.* 135:2207-2219.
- Furutani I, Sukegawa S, and Kyojima J. 2006. Genome-wide analysis of spatial and temporal gene expression in rice panicle development. *Plant J.* 46 (3): 503-511.
- Ho CL, Noji M, and Saito K. 1999. Plastidic pathway of serine biosynthesis: molecular cloning and expression of 3-phosphoserine phosphatase from *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry.* 274, 11007-11012.

- Kwon SW, Cho YC, Lee JH, Suh JP, Choi IS, Oh MK, Kim YG, Kim MK, Koh HJ, and Yang SJ. 2007. Linkage map construction and QTL analysis in the cross between two *japonica* cultivars. Korean J. Breed. Sci. 39: 94.
- Lee S, Kim J, Son JS, Nam J, Jeong DH, Lee K, Jang S, Yoo J, Lee J, Lee DY et. 2003. Systematic reverse genetic screening of T-DNA tagged genes in rice for functional genomic analyses: MADS box genes as a test case. Plant Cell Physiol. 44:1403-1411.
- Lee S, Kim J, Ham JJ, Han MJ, and An G. 2004. Functional analyses of the flowering time gene OsMADS50 the putative SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1/AGAMOUS-LIKE 20 (SOC1/AGL20) ortholog in rice. The Plant J. 38: 754-764.
- Lestari P, Ham TH, Lee HH, Woo MO, Jiang W, Chu SH, Kwon SW, Ma K, Lee JH, Cho YC, and Koh HJ. 2009. PCR marker-based evaluation of the eating quality of *japonica* rice (*Oryza sativa* L.). J. Agric. Food Chem. 57:2754-2762.
- Lestari P, Lee G, Ham TH, Reflinur, Woo MO, Piao R, Jiang W, Chu SH, Lee J, and Koh HJ. 2011. Single nucleotide polymorphisms and haplotype diversity in rice sucrose synthase 3. Journal of Heredity 2011:102(6):735-746.
- Lestari P, Jiang W, SH Chu SH, Reflinur, Sutrisno, Kusbiantoro B, Kim B, Piao R, Cho YC, Luo Z, Chin JH, and Koh HJ. 2015. DNA markers for eating quality of indica rice in Indonesia. Plant Breed. 134:40-48.
- Munoz-Bertomeu J, Anoman AD, Flores-Tornero M, Toujani W, Rosa-Tellez S, Fernie AR, Roje S, Segura J, and Ros R. 2013. The essential role of the phosphorylated pathway of serine biosynthesis in Arabidopsis. Plant Signal Behav. 8: e27104.
- Murray MG and Thompson WF. 1980. Rapid isolation of high molecular weight DNA. Nucleic Acids Res. 8: 4321-4325.
- Ren J, Sun D, Chen L, You FM, Wang J, Peng J, Nevo E, Sun D, Luo MC, and Peng J. 2013. Genetic diversity revealed by single nucleotide polymorphism markers in a worldwide germplasm collection of durum wheat. Int. J. Mol. Sci. 14:7061-7088.
- Ros R, Munoz-Bertomeu J, Krueger S. 2014. Serine in plants: biosynthesis, metabolism and functions. Serine in plants: biosynthesis, metabolism and functions. Trends in Plant Science. 19: 564-569.
- Rozen S and Skaletsky HJ. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Methods Mol. Biol. 132:365-386.
- Sambrook J and Russell DW. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shimomura K, Sakakura C, Takemura M, Takagi T, Fukuda K, Kin S, Nakase Y, Miyagawa K, Ohgaki M, Fujiyama J, Fujita Y, Nakanishi M, Hagiwara

- A, Shirane M, Okazaki Y, Hayashizaki Y, Yamagishi H. 2004. Combination of L-3-phosphoserine phosphatase and CEA using real-time RT-PCR improves accuracy in detection of peritoneal micrometastasis of gastric cancer. *Anticancer Res.* 24: 1113-1120.
- Strunck E, Frank K, Tan MI, and Vollmer G. 2001. Expression of l-3-phosphoserine phosphatase is regulated by reconstituted basement membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281(3):747-53.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, and Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24:1596-1599.
- Wada T, Ogata T, Tsubone M, Uchimura Y, and Matsue Y. 2008. Mapping of QTLs for eating quality and physicochemical properties of the *japonica* rice “Koshihikari”. *Breeding Sci.* 58:427-235.

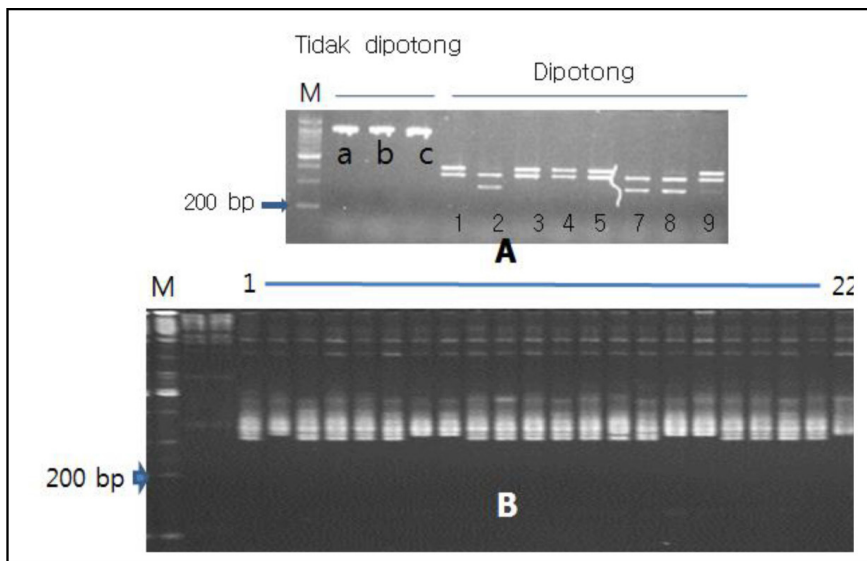
Tabel 1. Informasi gen yang dipilih berdasarkan marka SSR RM1246 di kromosom 12 dari QTL untuk mutu rasa dan pembungaan ^a

Daerah di genom (bp)	Gen kandidat	Posisi (bp)	Sekuen primer untuk sekuensing	Jenis-nama primer	Sekuen primer hasil pengembangan
19,086,651-19,086,837	Phosphoserine phosphatase	19,118,818-19,122,389	F: TTTGAATAGGTCCACTGCTTTAG R: CATGCAITCTCATTAGTCAAAGT	CAPS-PP2/MseI	F: TTTGAATAGGTCCACTGCTT R: CCATGCAITCTCATTAGTCAA
	OsMAD20	19,077,506	F: TTTGAATAGGTCCACTGCTT	Indel-	F:TAACAACCCAGGCCGAGAA
	MADS box family	-19,086,702	R:CCATGCAITCTCATTAGTCAA	MAD-	R: GAGCGTCTTTTCTTTCGGTGA

^aWada et al (2008)



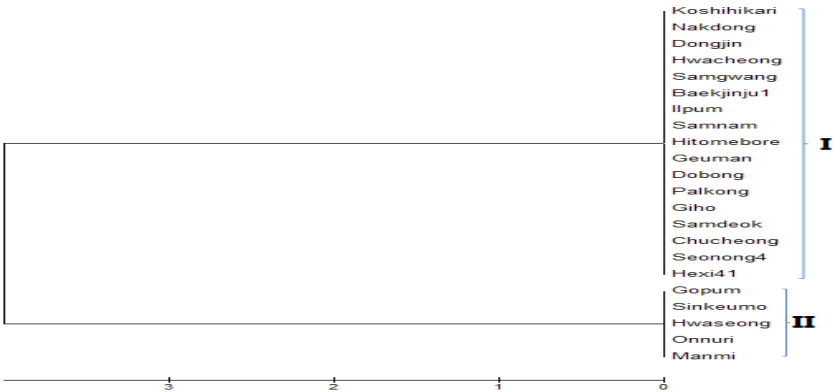
Gambar 1. Alignmen sekuen parsial *Phosphoserine phosphatase* dan *MADS box family gene -OsMAD20* di kromosom 12 dengan ClustalW yang menunjukkan variasi nukleotida. A) SNP A/G pada *phosphoserine phosphatase* kotak hitam, yang merupakan kandidat marka CAPS, B) Indel (delesi) 7 bp pada gen *OsMAD20* dalam kotak hitam yang merupakan sumber marka indel.



Gambar 2. Pola pita hasil amplifikasi primer yang didesain berdasarkan SNP pada gen *phosphoserine phosphatase* dan indel pada OsMAD20. A) Pola produk target alel (G/A) yang dideteksi dengan primer CAPS-PP2/*MseI*; keterangan a-c: produk PCR sebagai kontrol yang belum dipotong dengan *MseI* dengan ukuran produk 935 bp dan 1-9: amplikon varietas padi yang telah dipotong dengan *MseI* yang menghasilkan produk 388 dan 335 bp; sumur 2,7,8: amplikon varietas dengan ukuran 335 dan 280 hasil pemotongan. Keterangan sumur 1. Koshihikari, 2. Gopum, 3. Samgwang, 4. Ilpum, 5. Chucheong, 7. Sinkeumo, 8. Hwaseong, 9. Hwacheong. B) Polimorfisme pada 22 varietas padi *japonica* menggunakan primer indel-MAD dengan ukuran 187 bp dan insersi 7 bp dengan ukuran amplikon 194 bp. Keterangan sumur 1-22: 22 varietas *japonica* mengacu urutan pada Tabel 2, M. DNA ladder 100 bp.

Tabel 2. Genotyping 22 varietas japonica menggunakan primer MAD dan PP2

Variety	MAD (bp)	PP2
Koshihikari	187	G
Gopum	194	A
Samgwang	187	G
Ilpum	187	G
Chucheong	187	G
Dongjin	187	G
Sinkeumo	194	A
Hwaseong	194	A
Hwacheong	187	G
Dobong	187	G
Samnam	187	G
Palkong	187	G
Hitomebore	187	G
Baekjinju1	187	G
Seonong4	187	G
Onnuri	194	A
Manmi	194	A
Giho	187	G
Geuman	187	G
Nakdong	187	G
Hexi41	187	G
Samdeok	194	G



Gambar 3. Pohon filogeni UPGMA dari 22 varietas padi *japonica* berdasarkan variasi nukleotida pada sekuen parsial gen *phosphoserine phosphatase* (PP, clone AL731752) dan OsMAD20 (MAD, clone AL731752) menggunakan perangkat lunak MEGA 4.0.