

**PENGEMBANGAN MARKA MOLEKULER BERDASARKAN VARIASI
NUKLEOTIDA DI 6-PHOSPHOFRUCTOKINASE-2 DAN GLUCOSE-6-
PHOSPHATASE/PHOSPHATE TRANSLOCATOR PADA PADI JAPONICA**

**DEVELOPMENT OF MOLECULAR MARKER BASED ON NUCLEOTIDE
VARIATION OF 6-PHOSPHOFRUCTOKINASE-2 DAN GLUCOSE-6-
PHOSPHATASE/PHOSPHATE TRANSLOCATOR IN JAPONICA RICE**

Rerenstradika Tizar Terryana, Kristianto Nugroho, dan Puji Lestari

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik
Pertanian, Jl. Tentara Pelajar No. 3A Bogor 16111
Email:re2n_terryana@ymail.com

ABSTRAK

6-phosphofructokinase-2 (PFK2) merupakan protein yang terlibat dalam jalur fosforilasi dalam biosintesis pati dan diduga berkontribusi terhadap sifat fisiko-kimia yang menentukan mutu rasa beras. *Glucose-6-phosphatase/phosphate translocator* (GPT) diduga terlibat dalam tahap perkecambahan, perkembangan polen dan kantong embrio, serta pemasakan biji pada tanaman padi. Studi lebih lanjut sangat dibutuhkan terhadap gen-gen pada posisi QTL terkait mutu rasa terutama PFK2 dan GPT pada padi *japonica*. Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis variasi genetik varietas padi *japonica* berdasarkan gen PFK2 dan GPT, serta memverifikasi marka molekuler hasil pengembangannya. Sebanyak 22 varietas padi *japonica* diamplifikasi menggunakan primer STS pada sekuens parsial PFK2 dan GPT, kemudian sekuennya disejajarkan dengan kultivar rujukan dan dikembangkan marka molekulernya berdasarkan varian terpilih. Sejumlah SNP diidentifikasi pada PFK2 dan GPT. SNP G/A di 158 bp pada PFK2 dan 602 bp pada GPT menunjukkan variasi genetik pada varietas padi *japonica* dan didesain primernya yaitu PFrucl/*EcoRI* dan G6P1/*Alw26* masing-masing untuk PFK2 dan GPT. Analisis filogenetik menunjukkan bahwa tanpa mempertimbangkan asal varietas, 3 kluster utama dibentuk yang terdiri dari 2 (klaster I), 5 (klaster II) dan 15 varietas (klaster III). Varietas pada klaster III dicirikan dengan alel A baik pada PFK2 maupun GPT. Hasil analisis filogenetik 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 PFK2 dan GPT 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, 6-phosphofructokinase-2, Glucose-6-phosphatase/phosphate translocator, variasi nukleotida

ABSTRACT

6-phosphofructokinase-2 (PFK2), a protein involved in the phosphorylation pathway of starch biosynthesis and allegedly contribute to physicochemical properties, determine eating quality of rice. Glucose-6-phosphatase/phosphate translocator (GPT) is allegedly involved in seedling phase, pollen and embryo sac development and ripening of rice seed. Further study of these genes within the QTLs related to eating quality, particularly, PFK2 and GPT on *japonica* rice is needed. This study aimed at analyzing the genetic variation of *japonica* rice varieties based on PFK2 and GPT, and verifying the molecular markers developed. A total of 22 *japonica* varieties was amplified using STS primers for partial sequences of PFK2 and GPT, aligned their resulting sequenced with the reference cultivar and developed molecular markers for selected variants. A number of SNPs was identified on PFK2 and GPT. SNP G/A at 158 bp on PFK2 and 602 bp on GPT showed variation among *japonica* rice varieties, consequently we developed the corresponding markers namely PFruc1/EcoRI and G6P1/Alw26, respectively. Phylogenetic analysis showed that regardless of the variety origin, three main clusters were generated and consisted of two (cluster I), five (cluster II) and fifteen varieties (cluster III). Varieties on cluster III were characterized by allele A both in PFK2 and GPT. 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 PFK2 and GPT 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.

Keywords: molecular marker, 6-phosphofructokinase-2, Glucose-6-phosphatase/phosphate translocator, nucleotide variation

PENDAHULUAN

6-Phosphofructokinase-2 (PFK2) merupakan bagian dari famili gen *phosphofructokinase* (Mustroph *et al.*, 2013) yang terlibat dalam biosintesis pati dan metabolisme pati serta potensial berasosiasi dan berkontribusi dengan sifat fisiko-kimia yang menentukan mutu rasa nasi (Lestari *et al.*, 2015). Pati termasuk

dalam kelompok polisakarida simpanan yang penting pada tanaman padi yang didalamnya juga terdapat gula terlarut, sukrosa dan fruktosa. Fruktosa disintesis di sitosol dan merupakan salah satu bahan baku dalam biosintesis pati di amiloplas (Bahaji *et al.*, 2014). PFK2 diketahui berperan pada tahap perkecambahan dan pemasakan biji (Angelika *et al.*, 2007) serta homolog pada tanaman padi dan *Arabidopsis thaliana* (Mustroph *et al.*, 2013; Wingkler *et al.*, 2007). Mutasi gen PFK2 pada *A. thaliana* mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan tanaman yang disebabkan oleh penurunan laju fotosintesis.

Glucose-6-phosphatase/phosphate translocator (GPT) merupakan protein yang terlibat dalam jalur fosforilasi pada tahap awal biosintesis pati, yang mengkode enzim *glucose-6-phosphatase/phosphate translocator* (Noronha *et al.*, 2015) dan sangat berasosiasi dengan biosintesis pati pada tanaman padi (Masouleh *et al.*, 2012). GPT merupakan motif sekuen conserve dalam famili gen pPT (*Plastidic phosphate translocator*) (Knappe *et al.*, 2003). GPT diketahui homolog pula pada tanaman padi dan *Arabidopsis thaliana*. Pada *Arabidopsis thaliana*, GPT berperan sangat penting pada tahap perkecambahan biji (Dyson *et al.*, 2014), terlibat dalam metabolisme tahap awal perkembangan tanaman, fiksasi karbon (Kunz *et al.*, 2010; Athanasiou *et al.*, 2010) serta tahap perkembangan polen dan pembentukan kantong embrio (Niewiadomski *et al.*, 2005).

Variasi genetik pada sejumlah gen penting pada padi berkontribusi dalam perubahan serta evolusi gen tersebut. Identifikasi variasi nukleotida pada tanaman padi khususnya padi *japonica* berdasarkan gen yang terkait mutu rasa yaitu PFK2 dan GPT penting untuk studi jarak genetik atau keragaman genetik antara varietas padi *japonica*. Analisis filogenetik sekuen deduksi asam amino pada famili gen pPT yang didalamnya terdapat gen GPT membuktikan adanya hubungan kekerabatan antara tanaman padi dengan *A. thaliana* dan alga merah *Galdieria sulphuraria* (Knappe *et al.*, 2003). Informasi hasil penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Lestari *et al.*, (2009; 2015; dan 2016) terkait variasi nukleotida pada gen penting dalam genom tanaman padi *japonica* telah banyak membantu dalam pengembangan marka molekuler selanjutnya.

Pengembangan marka molekuler terkait gen penting pada padi diharapkan dapat membantu program pemuliaan tanaman, studi genetik serta pengelolaan dan preservasi plasma nutfah padi (Barcaccia, 2010; Lestari *et al.*, 2011; Lestari *et al.*, 2012). Pengembangan marka molekuler terkait gen PFK2 dan GPT masih sangat terbatas pada tanaman padi khususnya padi subspecies *japonica*, akan tetapi marka molekuler terkait gen PFK2 dan GPT telah banyak dikembangkan pada manusia untuk deteksi penyakit (Villagarcia *et al.*, 2016; Massa *et al.*, 2004). Studi QTL untuk mutu biji padi dan mutu rasa nasi telah banyak dilakukan sebelumnya pada berbagai populasi persilangan padi *japonica* (Kwon *et al.*, 2007; Yun *et al.*, 2016; Cho *et al.*, 2014). Peta QTL tersebut kemudian dikembangkan menjadi marka SSR yang terkait karakter penting pada padi, untuk kemudian menjadi

petunjuk identifikasi gen terkait karakter penting seperti PFK2 dan GPT (Wada *et al.*, 2008). Oleh karena itu penelitian lebih lanjut mengenai gen penting pada posisi QTL padi *japonica* penting untuk dilakukan. Tujuan penelitian ini ialah untuk menganalisis variasi genetik varietas padi *japonica* terkait gen PFK2 dan GPT, serta memverifikasi marka molekuler hasil pengembangannya.

BAHAN DAN METODE

Materi genetik yang digunakan dalam penelitian ini meliputi 22 varietas padi *japonica* yang terdiri atas 19 varietas asal Korea Selatan yaitu Gopum, Samgwang, Ilpum, Chucheong, Dongjin, Sinkeumo, Hwaseong, Hwacheong, Dobong, Samnam, Palkong, Baekjinju, Seonong4, Onnuri, Manmi, Giho, Geuman, Nakdong dan Samdeok, 2 varietas asal Jepang yaitu Koshihikari dan Hitomebore serta satu varietas asal Cina yaitu Hexi41. Seluruh varietas tersebut ditanam di dalam rumah kaca hingga berumur 4-5 minggu untuk kemudian diambil daun muda dan sehat untuk selanjutnya diekstraksi DNA genomiknya. Sebelum diekstraksi DNA genomiknya, daun muda dan sehat yang telah dipanen dibekukan terlebih dahulu dalam nitrogen cair dan kemudian disimpan pada suhu -80°C hingga dilakukan tahap ekstraksi DNA.

Sebanyak 0.1 g potongan daun padi digerus hingga menjadi bubuk dengan bantuan nitrogen cair, kemudian diekstraksi DNA menggunakan buffer *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB) mengacu pada metode Murray dan Thompson (1980). Pellet DNA hasil purifikasi yang telah diperoleh kemudian dilarutkan dalam 50 µl bufer TE (10 mM Tris pH 8.0 dan 1 mM EDTA). Uji kuantitas DNA dilakukan dengan menggunakan Nano Drop[®] ND-1000 Spektrofotometer (Nano Drop, Willington, Delaware, USA) pada panjang gelombang 260/280 dan 260-230, sedangkan uji kualitas DNA dilakukan dengan teknik elektroforesis pada gel agarose dengan konsentrasi 0.8%. Pita DNA hasil elektroforesis selanjutnya divisualisasi menggunakan transiluminator UV. Hasil uji kualitas dan kuantitas DNA tersebut menjadi acuan dalam pengenceran DNA stok sebelum dilakukan analisis PCR.

Sekuen gen target sesuai posisi fisik marka terkait PFK2 dan GPT yang terpetakan pada peta QTL untuk mutu rasa, dieksplorasi dan diambil dari database genom padi yang tersedia di <http://www.gramene.org/> sesuai hasil penelitian Lestari *et al.*, (2011). Marka kemudian didisain menghasilkan pita tunggal dengan menggunakan perangkat lunak PRIMER3 yang tersedia secara online pada web <http://primer3.ut.ee/>. DNA genomik pada setiap sampel diamplifikasi dalam total reaksi 50 µl mengandung 20 ng/µl DNA template sebanyak 2 µl; 25 mM MgCl₂ dalam 10X buffer; 2.5 mM dNTPs sebanyak 1 µl; 1 U Ex Takara Taq Polymerase (Takara Bio, Inc. Jepang); primer *forward* dan *reverse* dengan konsentrasi 10 uM masing-masing sebanyak 1 µl.

Reaksi PCR dilakukan dalam mesin PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Inc. USA) dengan profil PCR sebagai berikut: denaturasi awal pada suhu 95°C selama 4 menit, diikuti dengan 35 siklus denaturasi pada suhu 95°C selama 10 detik, *annealing* pada suhu 55°C selama 30 detik dan *elongation* pada suhu 72°C selama 1 menit dan *final extension* pada suhu 72°C selama 5 menit. Hasil PCR berupa pita tunggal kemudian dipurifikasi dan dikloning ke dalam vektor pGEM-Teasy dan selanjutnya ditransformasi ke dalam sel kompeten *E. coli* DH5 α mengacu pada metode kloning hasil penelitian Sambrook dan Russell (2001). Plasmid yang mengandung gen PFK2 dan GPT kemudian diisolasi menggunakan DNA-spin Plasmid DNA Purification Kit (Intron Biotechnology, Korea) dan plasmid yang mengandung gen tersebut selanjutnya disekuensing menggunakan Sequencer ABI3700 (Applied Biosystem, Inc) pada dua arah (*forward* dan *reverse*).

Data hasil amplifikasi berupa sekuen DNA selanjutnya diidentifikasi dan dipilih kemudian disejajarkan untuk mengetahui variasi nukleotidanya dengan bantuan perangkat lunak BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/Bioedit.html>) (Ching *et al.*, 2002; Tamura *et al.*, 2007). Hasil identifikasi variasi nukleotida berupa SNP pada 22 varietas padi *japonica* kemudian dianalisis filogenetik untuk mengetahui jarak genetik dan kekerabatan antar varietas padi *japonica*. Analisis filogenetik pada 22 varietas padi *japonica* dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak Tassel 3.0.

Hasil identifikasi variasi nukleotida pada sekuen terkait PFK2 dan GPT tersebut menjadi dasar dalam perancangan marka baru terkait PFK2 dan GPT. SNP hasil identifikasi menjadi dasar untuk merancang marka CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphisms*) dan SNAP (*Single Nucleotide Amplified Polymorphism*). Marka CAPS dirancang dengan menggunakan perangkat lunak dCAPS Finder 2.0 (<http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html>), serta marka SNAP dengan menggunakan perangkat lunak WebSNAPER (<https://pga.mgh.harvard.edu/cgi-bin/snap3/websnaper3.cgi>).

HASIL DAN PEMBAHASAN

QTL terkait sifat fisiko-kimia dan mutu rasa telah diidentifikasi sebelumnya oleh Wada *et al.*, (2008) pada populasi 92 tanaman RILs, F7, F8, dan F9 hasil persilangan padi Moritawase dan Koshihikari yang merupakan padi subspecies *japonica*. Marka terkait gen penting yang berimplikasi pada mutu beras terpetakan di hampir seluruh kromosom pada QTL padi *japonica*. Marka terkait gen penting tersebut digunakan sebagai dasar identifikasi variasi nukleotida pada kandidat gen penting yang terpetakan dan selanjutnya akan menjadi dasar pengembangan marka molekuler baru. Hasil sekuensing kemudian diidentifikasi berdasarkan hasil amplifikasi dua kandidat gen yaitu *6-phosphofructokinase-2* (PFK2) dan *glucose-*

6-phosphatase/phosphate translocator (GPT) pada 22 varietas padi *japonica*. Sekuen PFK2 dan GPT yang teramplifikasi pada 22 varietas padi *japonica* disejajarkan dengan sekuen varietas rujukan yaitu Nipponbare. Nipponbare banyak digunakan sebagai varietas rujukan karena merupakan varietas padi pertama yang disequensing genomnya serta telah memiliki informasi yang sangat lengkap (Toda and Toriyama 2013). Pada tahun 2002, International Rice Genome Sequence Project (IRGSP) telah mempublikasikan secara lengkap sekuen genom padi kultivar Nipponbare dengan ras *japonica* dan *indica* (Greco *et al.* 2003).

Hasil sekuensing menunjukkan gen PFK2 dan GPT teramplifikasi pada selang 4902322-4906316 bp pada kromosom 6 untuk gen PFK2 dan 5133293-5137365 bp pada kromosom 8 untuk gen GPT (Tabel 1, Gambar1). SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) yang polimorfik berhasil diidentifikasi diantara 22 padi *japonica*. SNP merupakan titik mutasi substitusi pada sekuen DNA yang dapat diikuti dengan perubahan sekuen basa asam amino yang *synonymous* dan *non-synonymous* (Jehan *et al.*, 2006). Pengembangan SNP sebagai salah satu petunjuk variasi basa nukleotida dalam studi genetika telah diinisiasi ketika proyek awal sekuensing genom pada *A. thaliana* (Neil 2007). Marka berbasis SNP telah banyak dimanfaatkan dan dikembangkan sebagai marka seleksi dan analisis kekerabatan maupun keragaman genetika pada padi, gandum, jeruk dan kentang dengan skala populasi yang lebih besar (Lestari *et al.*, 2011; Ren *et al.*, 2013; Andres *et al.*, 2013 dan Hardigan *et al.*, 2015).

Secara umum hasil penjajaran sekuen dengan *multiple alignment* menunjukkan varian basa nukleotida lebih banyak terdeteksi di daerah non-koding dibandingkan pada daerah koding. Dua SNP yaitu G/A telah terdeteksi berdasarkan hasil penjajaran sekuen parsial pada masing-masing marka terkait PFK2 dan GPT (Gambar 2). Berdasarkan SNP yang terdeteksi pada penjajaran sekuen parsial tersebut, didisain marka CAPS terkait PFK2 yaitu PFruc1 dan terkait GPT yaitu G6P1. Marka CAPS yaitu PFruc1 didisain untuk alel spesifik A pada SNP G/A. Alel spesifik A pada marka PFruc1 terdeteksi sebagai alel superior pada varietas *japonica* yang ditemukan pada hampir seluruh varietas kecuali Koshihikari, Samgwang, Seonong4, Geuman, dan Samdeok (Tabel 2). Untuk memudahkan dalam mendeteksi alel SNP A, enzim restriksi *EcoRI* digunakan pada marka PFruc1. Hasil pemotongan ampikon yang dihasilkan oleh marka CAPS terkait PFK2 dengan enzim restriksi *EcoRI* ditunjukkan pada Gambar 3. Marka PFruc1 yang tidak terpotong oleh *EcoRI* teramplifikasi pada ukuran 184 bp dan merefleksikan alel G. Sedangkan fragmen hasil pemotongan yang polimorfik dan merefleksikan alel spesifik A teramplifikasi pada ukuran 158 bp untuk varietas Gopum. Marka CAPS sebelumnya telah digunakan dalam studi diversitas genetika antar varietas padi *indica* dan telah menjadi set marka terkait mutu rasa (Lestari *et al.*, 2015 dan Lestari and Hee 2013).

Identifikasi variasi nukleotida berdasarkan polimorfisme dengan marka CAPS yang berdasarkan pada perbedaan situs restriksi runutan DNA antar individu memiliki kelemahan yaitu, marka CAPS tidak mampu mengidentifikasi polimorfisme apabila terjadi perubahan satu basa yang tidak memiliki perbedaan situs restriksi (Amar *et al.*, 2011). Pendekatan teknologi yang dapat digunakan untuk memperkecil kelemahan pada marka CAPS adalah dengan mengembangkan marka SNAP berdasarkan teknik PCR. Marka SNAP merupakan satu satunya marka yang bersifat bialel dan kodominan sehingga mampu membedakan alel homozigot dan heterozigot yang efisien (Jihong *et al.*, 2015), selain itu marka SNAP juga terbukti menghasilkan kualitas data yang lebih baik serta telah banyak dimanfaatkan dan dikembangkan untuk studi genetik karena bersifat lebih spesifik alel yang mengalami mutasi dan berimplikasi pada perubahan ekspresi gen, serta dapat digunakan secara terus menerus pada populasi yang lebih besar (Jehan *et al.*, 2016; Ren *et al.*, 2013). Berdasarkan variasi alel yang dihasilkan oleh marka PFruc1/*EcoRI* tersebut, sebuah marka SNAP terkait PFK2 yang merupakan hasil pengembangan dari marka CAPSPFruc1/*EcoRI* juga telah didisain berdasarkan alel spesifik A. Pengembangan marka SNAP terkait genPFK2 diharapkan dapat mempermudah serta mempercepat seleksi dan analisis keragaman genetik pada padi *japonica*.

Keragaman basa nukleotida yang muncul pada sekuen GPT juga menjadi dasar pengembangan marka CAPS dengan target alel spesifik A pada SNP G/A (Gambar 2). Alel spesifik A pada SNP G/A tersebut terlihat sebagai alel superior pada hampir seluruh padi varietas *japonica* kecuali pada Gopum dan Hwacheong (Tabel 2). Marka CAPS terkait GPT G6P1 memanfaatkan enzim restriksi *Alw26I* (Gambar 3). Hasil amplifikasi marka G6P1/*Alw26I* menunjukkan posisi 813 bp yang merefleksikan alel G pada varietas Gopum, sedangkan fragmen hasil pemotongan yang polimorfik berada pada posisi 602 bp untuk varietas Koshihikari, Samgwang dan Ilpum yang merefleksikan alel A. Keragaman alel terkait gen GPT telah dijadikan pula sebagai salah satu marka SNP pada tahap seleksi varietas dan analisis keragaman genetik pada padi varietas Swarna yang merupakan salah satu varietas padi *indica* (Rathinasabapathi *et al.*, 2015).

Analisis filogenetik dilakukan berdasarkan variasi SNP yang telah dideteksi merujuk pada hasil amplifikasi DNA dengan marka spesifik alel terkait PFK2 dan GPT yaitu G/A. Analisis filogenetik bertujuan untuk menganalisis keragaman genetik diantara 22 varietas padi *japonica* yang digunakan pada penelitian ini (Gambar 4). Hasil analisis filogenetik berupa dendrogram menunjukkan tiga kelompok pada klaster yang berbeda. Klaster pertama terdiri atas 2 varietas yaitu Gopum dan Hwacheong yang teridentifikasi memiliki alel G pada marka G6P serta alel A pada marka PFruc, sedangkan pada klaster kedua terdapat 5 varietas (Samdeok, Geuman, Seonong4, Koshikari dan Samgwang) yang memiliki alel A pada G6P1 dan alel A pada PFruc, serta klaster ketiga yang mengelompokkan 15

varietas yaitu Hexi41, Nakdong, Giho, Manmi, Onnuri, Baekjinju1, Hitomebore, Palkong, Samnam, Dobong, Hwaseong, Sinkeumo, Dongjin, Ilpum dan Chucheong yang memiliki alel spesifik A pada kedua marka (G6P dan PFruc).

Berdasarkan hasil analisis filogenetik, marka PFruc dan G6P dapat mengelompokkan 22 varietas padi *japonica* berdasarkan alel spesifik yang dimiliki oleh setiap varietas. Perbedaan alel spesifik pada setiap varietas akan sangat berpengaruh pada jarak genetik dan hubungan kekerabatan antar varietas padi *japonica*. Informasi terkait variasi nukleotida terkait gen PFK2 dan GPT akan sangat bermanfaat sebagai dasar pengembangan marka molekuler. Marka molekuler yang berasosiasi pada lokus yang terkait karakter spesifik tertentu akan dapat digunakan untuk seleksi varietas berdasarkan karakter yang diinginkan (Bao *et al.*, 2006). Integrasi marka molekuler kedalam program *marker assisted selection* (MAS) diketahui mampu meningkatkan efektivitas seleksi (Brumlop and Finckh 2011), oleh karena itu marka molekuler hasil pengembangan berupa marka CAPS dan SNAP terkait PFK2 dan GPT pada penelitian ini memiliki efektifitas seleksi yang cukup tinggi dan dapat dimanfaatkan dalam studi kekerabatan ataupun keragaman genetik pada padi *japonica*.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil analisis QTL untuk karakter mutu rasa, gen PFK2 pada kromosom 6 dan GPT pada kromosom 8 dipilih untuk diobservasi variasi nukleotidanya diantara 22 varietas padi *japonica*. Varian yang diidentifikasi pada masing-masing gen PFK2 dan GPT1 adalah 2 SNP G/A. Marka CAPS PFruc1/*EcoRI* dan G6P1/*Alw26I* spesifik alel A berhasil dikembangkan untuk SNP G/A. Berdasarkan variasi yang dihasilkan marka CAPS PFruc1/*EcoRI*, sebuah marka SNAP terkait PFK2 hasil pengembangan telah didisain berdasarkan alel spesifik A. Analisis filogenetik berdasarkan variasi SNP (G/A) pada PFK2 dan GPT menggambarkan hubungan kekerabatan antar 22 varietas padi *japonica* yang digunakan pada penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Amar, MH., MK. Biswas, Z. Zhang and WW. Guo. 2011. Exploitation of SSR, SRAP and CAPS-SNP markers for genetic diversity of citrus germplasm collection. *Sci Hort* 128:220-227.
- Angelika, M., S. Uwe and B. Sophia. 2007. Characterization of the ATP-dependent phosphofructokinase gene family from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS letters* 581(3):2401-2410.
- Athanasidou, K., DC. Dyson, RE. Webster and GN. Johnson. 2010. Dynamic acclimation of photosynthesis increases plant fitness in changing environments. *Plant Physiology* 60:507-518.

- Andres, GL., A. Gema, N. Luis and O. Patrick. 2013. *Citrus* (Rutaceae) SNP markers based on competitive allele-specific PCR; transferability across the Aurantioideae subfamily. *Applications in Plant Sciences* 1(4):1-6.
- Bahaji, A., J. Li, AM. Sanchez-Lopez, E. Baroja-Fernandez, FJ. Munoz, M. Ovecka, G. Almagro, M. Montero, I. Ezquer, E. Etxeberria, and RJ. Pozueta. 2014. Starch biosynthesis, its regulation and biotechnological approaches to improve crop yields. *Biotechnol Adv* 32(1):87-106.
- Bao, JS., H. Corke and M. Sun. 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.
- Barcaccia, G. 2010. Molecular markers for characterizing and conserving crop plant germplasm. In: Jain, S., D. Brar. (eds) *Molecular Techniques in Crop Improvement*. Springer, Dordrecht. pp 231-254.
- Brumlop, S., MR. Finckh. 2011. Applications and potentials of marker assisted selection (MAS) in plant breeding. Bonn, Germany: Bundensamt fur Naturschutz (BfN) Federal Agency for Nature Conservation.
- Ching, A., KS. Caldwell, M. Jung, M. Dolan, OS. Smith, S. Tingey, M. Morgante and A. Rafalski. 2002. SNP frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines. *BMC Genet.* 3:1-14.
- Cho, YC., MK. Baek, JP. Suh, YJ. Won, JH. Lee, JJ. Kim, HS. Park, WJ. Kim, SW. Kwon, YG. Cho, BK. Kim and JH. Lee. 2014. QTL detection associated with eating quality based on palatability test in *japonica* rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Breed Biotech* 2(4):342-353.
- Dyson, BC., EW. Rachel and NJ. Giles. 2014. GPT2: a glucose 6-phosphate/ phosphate translocator with a novel role in the regulation of sugar signalling during seedling development. *Annals of Botany* 113(4):643-652.
- Greco, R., PB. Ouwerkerk, RJ. DeKam, C. Sallaud, L. Colombo, E. Guiderdoni, AH. Meijer, JHD. Hoge and A. Pereira. 2003. Transpositional behaviour of an Ac/Ds system for reverse genetics in rice. *Theor Appl Genet* 108(1):10-24.
- Hardigan, MA., B. John, CB. Robin and SD. David. 2015. Taxonomy and genetic differentiation among wild and cultivated germplasm of *Solanum* sect. *Petota*. *The Plant Genome* 8(1):1-16.
- Jehan, T. and S. Lakhanpaul. 2006. Single nucleotide polymorphism (SNP) methods and applications in plant genome: a review. *Indian Journal of Biotechnology* 5:453-459.

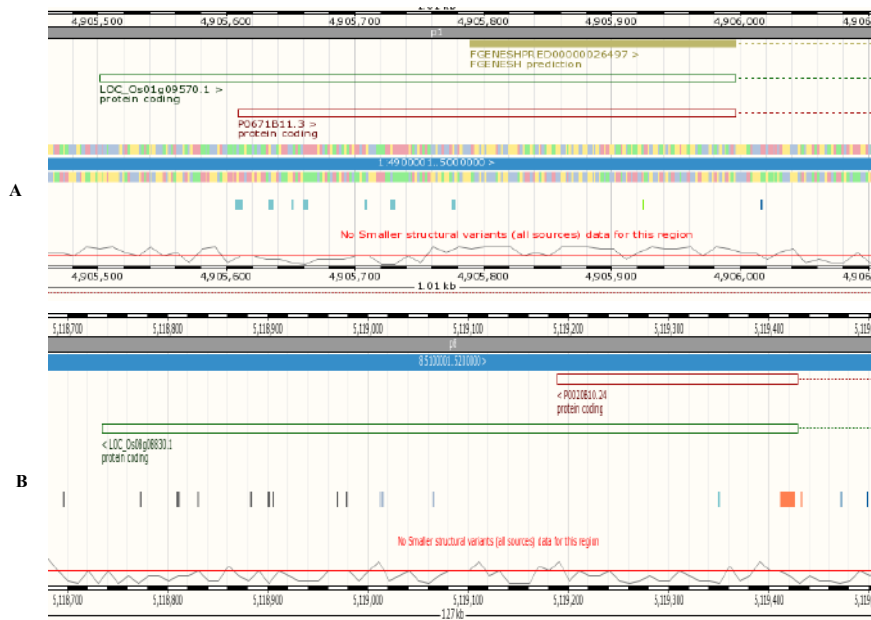
- Jihong, H., G. Songtao, Z. Zhixuan, W. Xiaolei, K. Weidong and D. Yi. 2015. Genome wide identification of SSR and SNP markers based on whole genome resequencing of a Thailand wild sacred lotus (*Nelumbo nucifera*). *Plos One* 1-17.
- Knappe, S., F. Ulf-Ingo and F. Karsten. 2003. Analysis of the plastidic phosphate translocator gene family in Arabidopsis and identification of new phosphate translocator - homologous transporter classified by their putative substrate-binding site. *Plant Physiology* 131:1178-1190.
- Kunz, HH., RE. Hausler and J. Fettke. 2010. The role of plastidial glucose-6-phosphate/phosphate translocators in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana* mutants impaired in starch biosynthesis. *Plant Biology* 12:115-128.
- Kwon, SW., YC. Cho, JH. Lee, JP. Suh, IS. Choi, MK. Oh, YG. Kim, MK. Kim, HJ. Koh and SJ. Yang. 2007. Linkage map construction and QTL analysis in the cross between two *japonica* cultivars. *Korean J. Breed. Sci.* 39: 94.
- Lestari, P., TH. Ham, HH. Lee, MO. Woo, W. Jiang, SH. Chu, SW Kwon, K. Ma, JH. Lee, YC. Cho and HJ. Koh. 2009. PCR marker-based evaluation of the eating quality of *japonica* rice (*Oryza sativa* L.). *J. Agric Food Chem* 57:2754-2762.
- Lestari, P., GA. Lee, TH. Ham, Reflinur, MO. Woo, R. Piao, W. Jiang, SH. Chu, J. Lee and HJ. Koh. 2011. Single nucleotide polymorphisms and haplotype diversity in rice sucrose synthase 3. *Journal of Heredity* 102(6):735-746.
- Lestari, P., R. Andari dan JK. Hee. 2012. Identifikasi dan aplikasi marka berbasis per untuk identifikasi varietas padi dengan palatabilitas tinggi. *AgroBiogen* 8(2):69-77.
- Lestari, P. and JK. Hee. 2013. Development of new CAPS/dCAPS and SNAP markers for rice eating quality. *Hayati* 20(1):15-23.
- Lestari, P., W. Jiang, SH. Chu, Reflinur, Sutrisno, B. Kusbiantoro, B. Kim, R. Piao, YC. Cho, Z. Luo, JH. Chin and HJ. Koh. 2015. DNA markers for eating quality of indica rice in Indonesia. *Plant Breed.* 134:40-48.
- Lestari, P. and Reflinur. 2016. Genetic diversity of *japonica* rice (*Oryza sativa* L.) based on markers corresponding to starch synthesizing genes. *Makara Journal of Science* 20(2):49-54.
- Masouleh, AK., LEW. Daniel, FR. Russell, W. Rachelle and JH. Robert. 2012. SNP in starch biosynthesis genes associated with nutritional and functional properties of rice. *Scientific Reports* 2:557.
- Massa, L., S. Baltrusch, AD. Okar, AJ. Lange, A. Lenzen and M. Tiedge. 2004. Interaction of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFK-2/FBPase-2) with glucokinase activates glucose phosphorylation and glucose metabolism in insulin-producing cells. *Diabetes* 53(4):1020-1029.

- Mustroph, A., S. Johanna, H. Natalia, A. Sophia, D. Anika and G. Bernhard. 2013. Characterization of the phosphofructokinase gene family in rice and its expression under oxygen deficiency stress. *Plant Sci.* 4(125):1-16.
- Murray, MG. and WF. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acids Res.* 8: 4321-4325.
- Neil, NO. 2007. Flower breeding and genetics: issue, challenges, and opportunities for the 21th century. Springer.
- Niewiadomski, P., K. Silke, G. Stefan, F. Karsten, S. Burkhard, SU. Ulrike, GR. Mario, A. Peter, F. Ulf-Ingo and S. Anja. 2005. The arabidopsis plastidic glucose 6-phosphate/phosphate translocator GPT1 is essential for pollen maturation and embryo sac development. *The Plant Cell* 17:760-775.
- Noronha, H., C. Carlos, D. Serge and G. Hernani. 2015. Identification and functional characterization of grapevine transporters that mediate glucose-6-phosphate uptake into plastids. *Planta* 242(4):909-920.
- Rathinasabapathi, P., P. Natarajan, VL. Ramprasad and P. Madasamy. 2015. Whole genome sequencing and analysis of Swarna, a widely cultivated *indica* rice variety with low glycemic index. *Scientific Reports* 5:11303.
- Ren, J., D. Sun, L. Chen, FM. You, J. Wang, J. Peng, E. Nevo, D. Sun, MC. Luo and J. Peng. 2013. Genetic diversity revealed by single nucleotide polymorphism markers in a worldwide germplasm collection of durum wheat. *Int. J. Mol. Sci.* 14:7061-7088.
- Sambrook, J. and DW. Russell. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24:1596-1599.
- Toda, T. and K. Toriyama. 2013. Resequencing of mitochondrial genes in a standard rice cultivar Nipponbare. *Rice* 6:2.
- Villagarcia, HG., S. Vanesa, CC. Maria, S. Guillermo, C. Daniel, S. Eduardo, LM. Maria and F. Flavio. 2016. Chronic glucocorticoid-rich milieu and liver dysfunction. *International Journal of Endocrinology* 1-12.
- Wada, T., T. Ogata, M. Tsubone, Y. Uchimura and Y. Matsue. 2008. Mapping of QTLs for eating quality and physicochemical properties of the *japonica* rice "Koshihikari". *Breeding Sci.* 58:427-235.
- Winkler, C., D. Britta, M. William and H. Katrin. 2007. Purification, microsequencing and cloning of spinach ATP-dependent phosphofructokinase link sequence and function for the plant enzyme. *FEBS Journal* 274:429-438

Yun, YT., CT. Chung, YJ. Lee, HJ. Na, JC. Lee, SG. Lee, KW. Lee, YH. Yoon, JW. Kang, HS. Lee, JY. Lee and SN. Ahn. 2016. QTL mapping of grain quality traits using introgression lines carrying *Oryza rufipogon* chromosome segments in *japonica* rice. *Rice* 9(1):62.

Tabel 1. Informasi kandidat gen yang dipilih berdasarkan marka terkait gen *6-Phosphofructokinase-2* (PFK2) dan marka terkait gen *Glucose-6-phosphatase/phosphate translocator* (GPT)

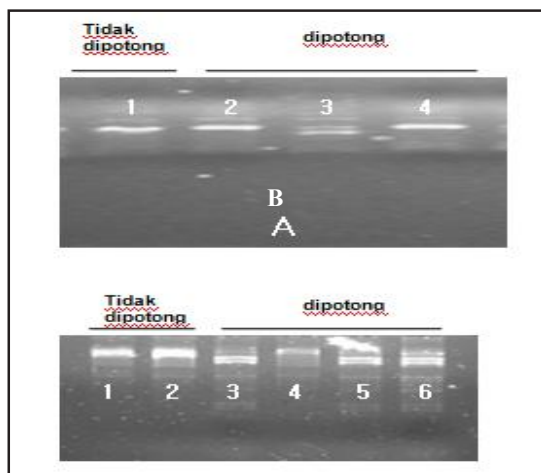
Chr	Kandidat gen	Sekuen primer untuk sekuensing	Nama Primer	Sekuen primer hasil pengembangan	
				CAPS	SNAP
6	<i>6-Phosphofructokinase2</i>	F: CTTCTTCTTCGGG TGTCTCG R: TGTTAAGTCCAGG GCAGAGG	PFruc1/ <i>EcoRI</i>	F: CTTCTTCTTCGG GTGTCCTCG R: TGTTAAGTCCAG GGCAGAGG	F: GGCCTGTGTTTG GTTCAGGTCAT CCTA R: ACGAGGAGAATT CTTACTTGACG ACTGAATAAGC
8	<i>Glucose-6-phosphatase/ phosphate translocator</i>	F: TCCAGATCAGCTT CGGTTTC R: GCATTGCGGCTAT AATGGTT	G6P1/ <i>Ahr26</i>	F: TCCAGATCAGCT TCGGTTTC R: GCATTGCGGCTA TAATGGTT	-



Gambar 1. Lokasi gen *6-phosphofructokinase-2* (PFK2) pada kromosom 6 (A) dengan *glucose-6-phosphatase/ phosphate* *glucose-6-phosphatase/ phosphate translocator* (GPT) pada kromosom 8(B)



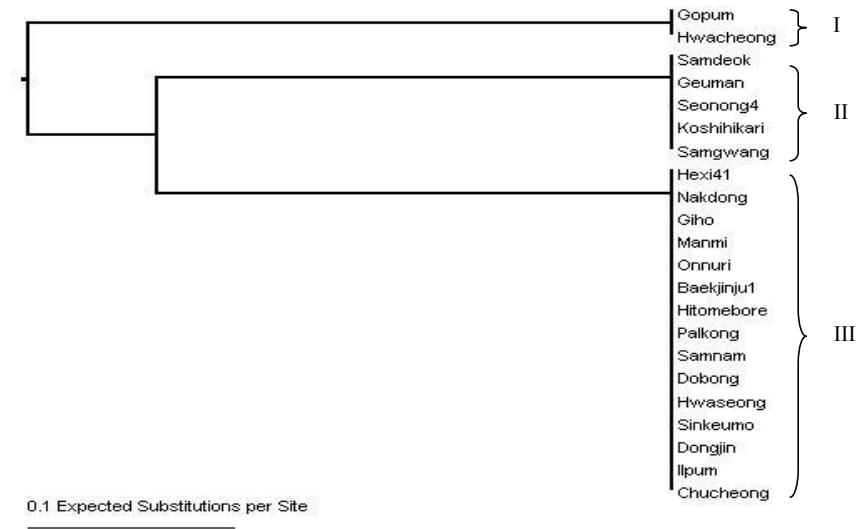
Gambar 2. Alignment sekuen parsial 6-Phosphofructokinase-2 (PFK2) pada kromosom 6 dan Glucose-6-phosphatase/ phosphate translocator (GPT) di kromosom 8 dengan perangkat lunak BioEdit yang menunjukkan variasi nukleotida. SNP A/G pada PFK2 (A) dan SNP G/A pada GPT (B) merupakan kandidat marka CAPS



Gambar 3. Pola pita DNA hasil amplifikasi marka CAPS pada gen 6-phosphofructokinase-2 (PFK2) dan glucose-6-phosphatase/phosphate translocator (GPT). A) Pola amplifikasi alel target (G/A) yang dideteksi dengan marka PFruc1/ EcoRI (CAPS); keterangan nomor 1: produk PCR varietas Koshihikari sebagai kontrol pada sampel yang belum dipotong dengan EcoRI dengan ukuran produk 184 bp, nomor 2-4: amplikon varietas padi japonica yang telah dipotong dengan EcoRI; nomor 2 (Gopum), 4 (Samgwang) dan 3 (Ilpum): amplikon hasil potongan dengan EcoRI yang menghasilkan produk masing-masing 184 bp dan 158 bp. B) Pola amplifikasi alel target (G/A) yang dideteksi dengan marka G6P1/Alw261 (CAPS); keterangan nomor 1 (Koshihikari) dan 2 (Gopum): varietas kontrol yang belum dipotong dengan Alw261 dengan ukuran produk 813 bp dan 3 (Koshihikari), 5 (Samgwang) dan 6 (Ilpum): varietas padi yang telah dipotong dengan Alw261 dan menghasilkan produk 602 bp, serta nomor 4 (Gopum): varietas padi yang tidak dipotong dengan Alw261 dan menghasilkan produk tetap pada posisi 813 bp

Tabel 3. Hasil genotyping 22 varietas padi japonica menggunakan marka G6P dan PFruc

Varietas	G6P(bp)	PFruc	Varietas	G6P(bp)	PFruc
Koshihikari	A	G	Palkong	A	A
Gopum	G	A	Hitomebore	A	A
Samgwang	A	G	Baekjinju1	A	A
Ilpum	A	A	Seonong4	A	G
Chucheong	A	A	Onnuri	A	A
Dongjin	A	A	Manmi	A	A
Sinkeumo	A	A	Giho	A	A
Hwaseong	A	A	Geuman	A	G
Hwacheong	G	A	Nakdong	A	A
Dobong	A	A	Hexi41	A	A
Samnam	A	A	Samdeok	A	G



Gambar 4. Dendrogram hasil analisis filogenetik berdasarkan metode UPGMA pada 22 varietas padi japonica berdasarkan variasi nukleotida pada sekuen parsial gen 6-phosphofructokinase-2 (PFK2) dan glucose-6-phosphatase/phosphatetranslocator (GPT) menggunakan perangkat lunak Tassel 3.0.