

PENANDA SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS (SNPS) UNTUK IDENTIFIKASI GENETIK DI SENGON (*FALCATARIA MOLUCCANA*) DAN *ACACIA* HIBRIDA

Vivi Yuskianti
Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan
(B2PBTH)
Yogyakarta

Pendahuluan

Banyak teknologi dan penanda DNA tersedia saat ini, seperti: DNA fingerprinting, mtDNA, RAFLP, AFLP dan microsatelite/SSR

Telah digunakan untuk berbagai tujuan, tetapi umumnya ada masalah:

- technical (biaya, akurasi, efisiensi, repeatability, transferability dll)
- analytical (variabilitas di pola dan tingkat mutasi, pewarisannya dll)

Contoh microsatelit:

Masalah dioperasional dan aplikasi rutin:

- Sizing alleles secara akurat karena PCR dan elektroforesis artifact
- Meningkatnya null alleles akibat tingginya mutasi pada priming site primer
- Size homoplasy

Apa itu Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)

SNP adalah sebuah perubahan komposisi nukleotida di sekuens DNA pada satu posisi tertentu

```

GTGATAACCGATTGATACGGTAATAGCGATAGCGATAGACTCGATACTCGGAAG
GTGATAACCGATTGATACGGTAATAGCGATAGCGATAGACTCGATACTCGGAAG
GTGATAACCGATTGATACGGTAATAGCGATAGCGATAGACTCGATACACCGAAG
GTGATAACCGATTCATACGGTAATAGCGATAGCGATAGACTCGATACTCGGAAG
GTGATAACCGATTGATACGGTAATAGCGATAGCGATAGACTCGATACTCGGAAG
GTGATAACCGATTCATACGGTAATAGCGATAGCGATAGACTCGATACACCGAAG
GTGATAACCGATTCATACGGTAATAGCGATAGCGATAGACTCGATACTCGGAAG
GTGATAACCGATTGATACGGTAATAGCGATAGCGATAGACTCGATACTCGGAAG
  
```

Keberadaan SNPs

SNPs telah banyak dideteksi di: manusia, hewan dan tanaman khususnya tanaman pertanian

Frekuensi SNPs

- Diperkirakan 90% variasi genetik di manusia dalam bentuk SNPs
- Dolphin: 254 bp
- Mamalia (simpanse): 400 bp
- Barley (11 varietas): 131 bp
- Jagung: 28-124 bp
- Ubi : 62 bp
- Kentang: 21 bp

Penggunaan SNPs

Telah digunakan untuk berbagai tujuan genetika seperti:

- Pemetaan penyakit kompleks dan asosiasinya, forensik dan inference sejarah populasi pada manusia
- Identifikasi individu hewan dan analisa tetuanya
- Identifikasi hibrid, cth: spruce (*Picea glauca*, *P. mariana* dan *P. rubens*): 2-4 SNPs, 96-100% mampu membedakan antar ketiga spruce
- ketahanan terhadap patogen, cth: pada kentang
- asosiasinya dengan karakter ekonomis seperti gen yang terkait dengan pembentukan pati pada padi, kentang dll.

Keunggulan penanda SNPs

- Direct marker
 - Potensinya untuk membuat peta genetika yang mempunyai density yang tinggi (very high-density genetic maps)
 - Tingkat mutasi yang rendah (10^{-8} - 10^{-9})
 - Lebih stabil dan pewarisannya lebih tinggi dibandingkan SSR dan AFLP
 - Nomenklatur alel yang sederhana
 - Kemudahan untuk membaca datanya
 - Kemungkinan untuk otomatisasi analisisnya
- Tipikal nya: bialelic marker sehingga individu lokus informasinya rendah
Dikompetasi dengan banyak SNP
- Sebagai contoh untuk analisa tetua dan identifikasi individu
- Untuk 10-15 mikrosatelit lokus dibutuhkan 30-50 SNPs tergantung dari banyaknya allele atau
 - $\pm 3 \times$ SNPs dibutuhkan untuk setiap lokus mikrosatelit

Perbandingan mikrosatelit dan SNPs

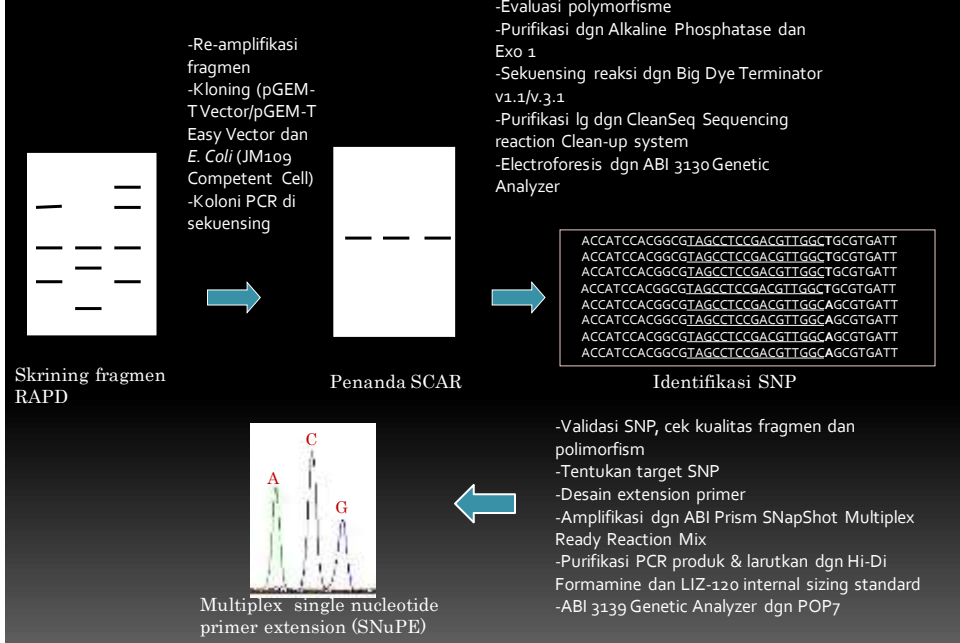
Penelitian di jagung (58 galur murni dan 4 hibrida)

	Microsatelit	SNPs
Jumlah allele	2-11 (rata-rata=5,1)	2
Expected heterozygosity	0,62	0,43 (pre-selected)/0,26
Missing data	13,8%	2,1-3,1%
Data repeatability	91,7%	98,1-99,3%
Deteksi parental alleles in hybrid	81,9%	95,5-97,0%
Non-Mendelian inheritance	18,1%	3-4,5%
Pool sampel dgn banyak allele	Sulit deteksi allele di freq yang rendah	Lebih baik untuk deteksi allele di freq. rendah

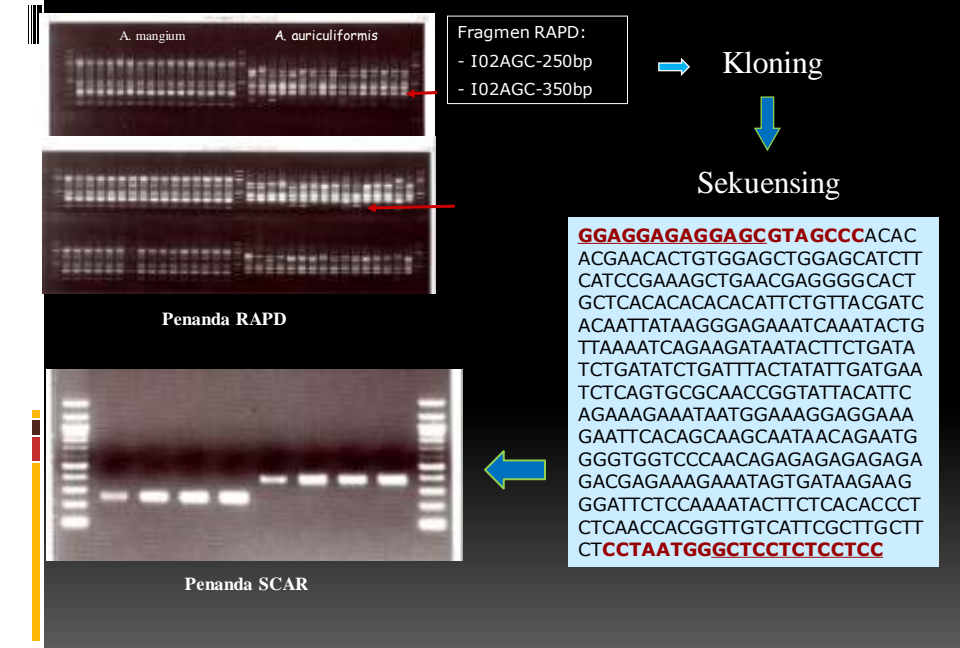
- Biaya yang lebih rendah (5 sampai 10 x lebih rendah dibanding mikrosatelit)
- Volume, *repeatability* dan akurasi yang lebih tinggi dibandingkan mikrosatelit
- Meningkatkan kesempatan membuat *database germplasm* antar berbagai organisasi di dunia

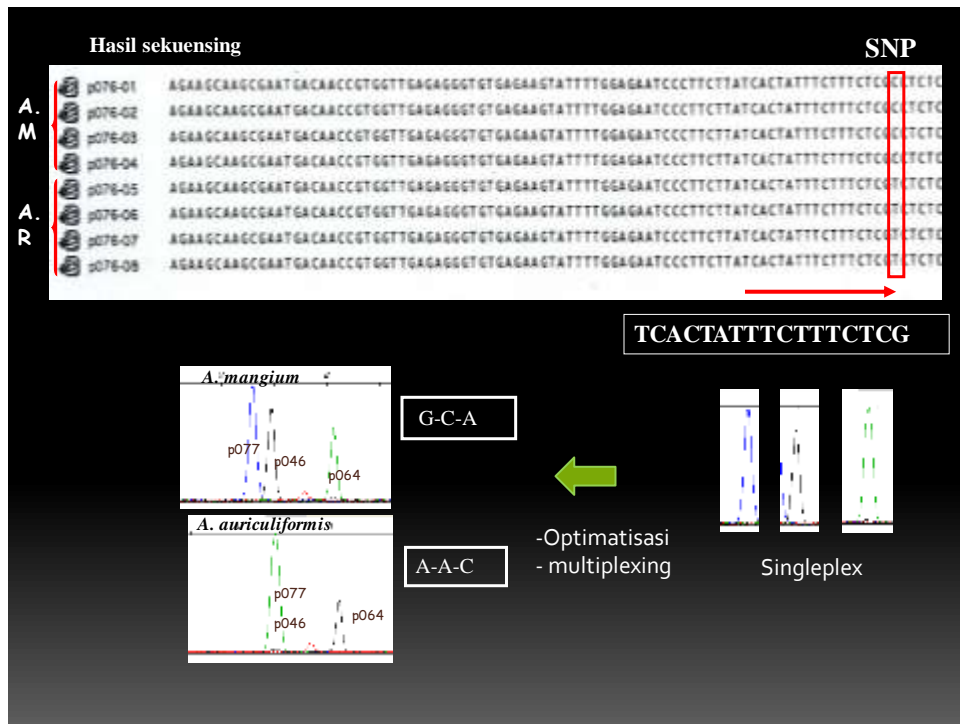
Pengembangan penanda SNPs di sengon dan Acacia hibrida

Prosedur:



Contoh:





Efisiensi analisis (multiplex)

- Memiliki banyak informasi dalam satu unit waktu
- Mengurangi volume sampel yang dibutuhkan untuk analisis
- Menghemat bahan kimia: enzim, buffer, dll
- Mengurangi biaya dan tenaga kerja

Kesulitannya:

- Hanya tersedia guidelines untuk multiplex
- Banyak penanda=meningkatkan kompleksitas
- Testing robust multiplex

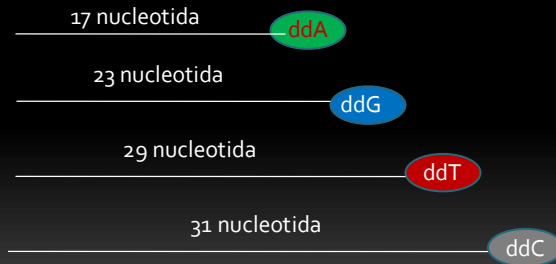
1. Polymerase Chain Reaction (PCR): amplifikasi specific region di genom
2. Primer Extension Reaction: untuk identifikasi penanda SNPs

1. Multiplex PCR

- Menargetkan lebih dari satu specific site di strand DNA
- Memungkinkan dengan adanya primer yang compatible dan cocok

2. Extension reaction (SNaPShot Reaction Mix)

Memungkinkan dengan adanya perbedaan panjang primer



Poly-T ditambahkan untuk membantu separasi

Adanya Poly-T memungkinkan untuk multiplexing SNaPShot analisis

Sekuens untuk 5 SNP primer

CATGGCTTCTGCATTAC	17
TTTTTTAGCTCGCTATATATGTT	17/23
TTTTTTTTTTTTGGTTCGAGCTTGAATC	17/29
TTTTTTTTTTTTTTAGCCTCCGACGTTGGC	17/31
TTTTTTTTTTTTTTTTTCACTATTCTTTCTCG	17/35

Warna putih-primer

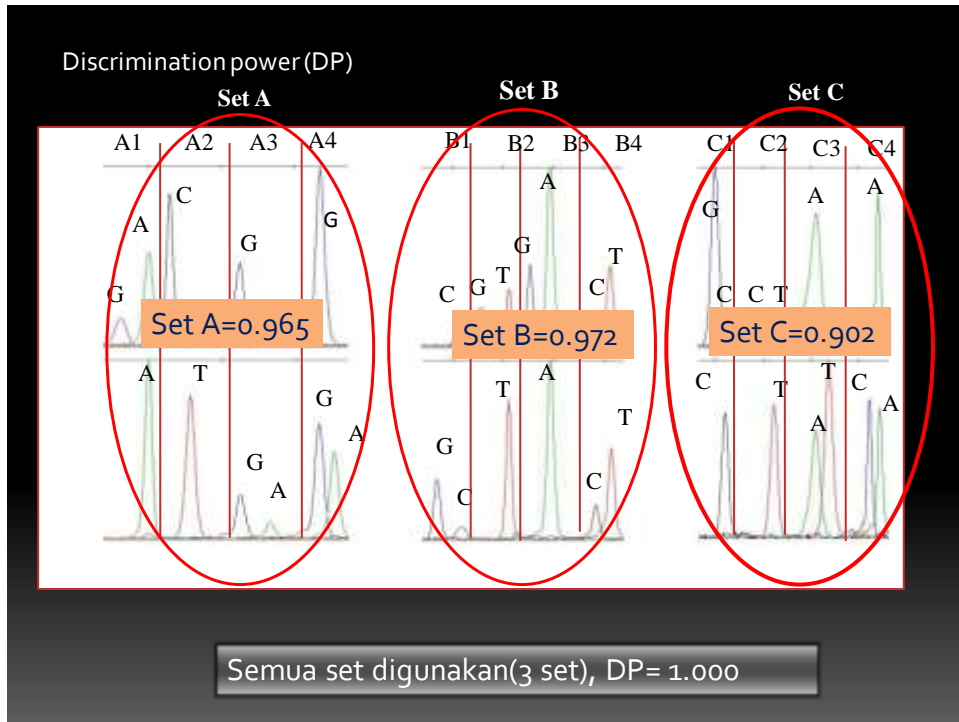
Warna kuning-poly T untuk pemisahan ukuran/size

Pengembangan penanda SNPs di sengon (*Falcataria moluccana*)

-16 sampel sengon untuk skrining fragmen RAPD
 -76 sampel untuk konfirmasi primer SCAR, deteksi SNP dan juga mengevaluasi kemampuan analisis multiplex SNUPE.

- 48 fragmen RAPD diperoleh
- 46 SCARs berhasil dikembangkan
- Identifikasi SNP dengan cara sekuensing di 8 sampel sengon menggunakan 31 primer SCARs
- 17 SCAR menghasilkan informatif data
- 12 SNPs di 12 SCARs dipilih
- Kemudian dimultiplex menjadi 3 set multiplex SNUPE analisis

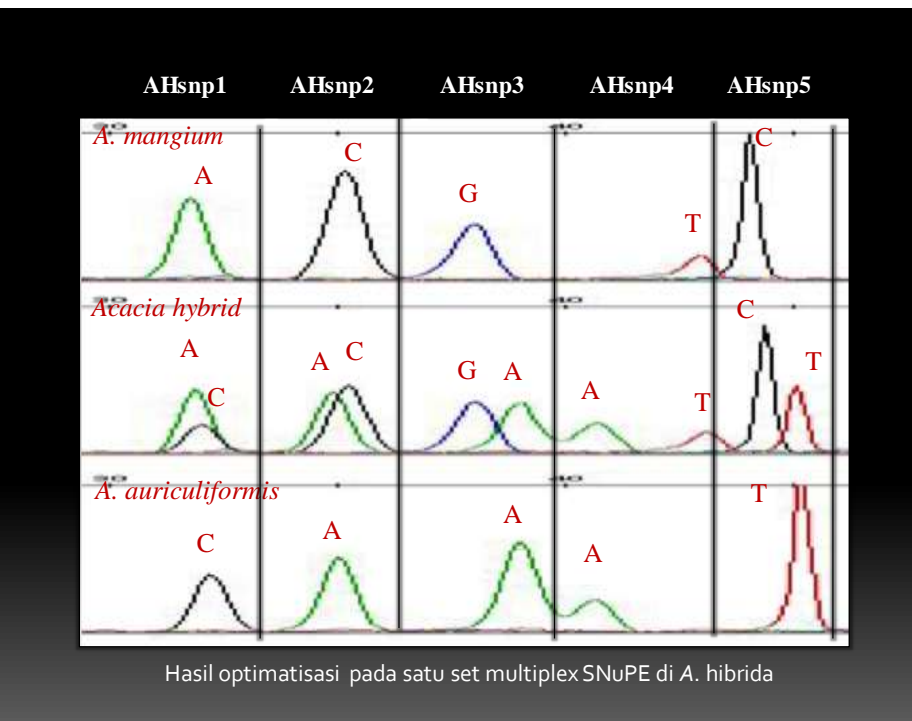
Set	Marker	SCAR		SNP					
		Seq.	Conc	Seq.	Conc	Allele 1 Base	Allele 1 Length	Allele 2 Base	Allele 2 Length
A	A1	F: CAC... R: TGG..	0.20	T(9)-ATC..	1.0	G	33.2	A	35.0
	A2	F: CTC... R: TTG..	0.16	T(11)-CTT..	1.0	C	36.4	T	37.8
	A3	F: CAT... R: AAC..	0.16	T(21)-CAC..	1.0	G	41.3	A	43.3
	A4	F: CAG... R: TAG..	0.16	T(23)-TTA..	1.0	G	46.7	A	47.7
B	B1	F: AAG... R: AGA..	0.20	AGAAGACACGTCACCC T	1.0	G	28.4	C	30.8
	B2	F: GAA... R: TCG..	0.16	T(3)-CCA..	1.0	G	32.8	T	35.6
	B3	F: GGA... R: GAG..	0.16	T(12)-GGT..	1.0	G	37.7	A	39.7
	B4	F: GGA... R: GAG..	0.14	T(18)-GGG..	1.0	C	44.1	T	45.7
C	C1	F: GAT... R: ACT..	0.12	ATAACTAGGCATCGAC	1.0	G	29.8	C	30.7
	C2	F: ATT... R: CGG..	0.16	T(5)-CAA..	1.0	C	34.1	T	35.8
	C	F: TAT... R: CAC..	0.18	T(13)-GCG..	1.0	A	38.6	T	39.5
	C4	F: TGT... R: ACT	0.20	T(23)-GGA..	1.0	G	45.5	A	46.9



Pengembangan penanda SNP di *Acacia hibrida*

- 48 fragmen RAPD diperoleh melalui skrining di 64 primer RAPD
- 44 penanda SCAR markers berhasil dikembangkan
- Identifikasi SNP menggunakan 28 SCARs dengan 4 sampel dari tiap *A. mangium* dan *A. auriculiformis*
- 15 SCARs yang mempunyai polimorfisme yang baik kemudian diamplifikasi untuk verifikasi keberadaan fragmen tersebut pada semua sampel.
- Lima SCARs akhirnya terpilih dan dikembangkan menjadi extension primer

Marker	SCAR		SNP					
	Seq	Conc	Seq	Conc	Allele M		Allele A	
					Base	Size	Base	Size
AHsnp1	F:ACG.. R:GTG..	0.06	CATGGCTTCTGCA TTAC	1.0	A	33.2	C	33.3
AHsnp2	F:GTC.. R:GTC..	0.20	T(6)- AGCTCGCTATATA TGTT	1.0	C	36.2	A	35.8
AHsnp3	F:GGA.. R:GGA..	0.12	T(12)- GGTTCGAGCTTG GAATC	0.7	G	38.5	A	39.4
AHsnp4	F:GGA.. R:GGA..	0.12	T(14)- TAGCCTCCGACG TTGGC	0.8	T	42.6	A	40.6
AHsnp5	F:GGA.. R:GGA..	0.20	T(18)- TCACTATTCTTT CTCG	1.0	C	44.8	T	46.3



Discrimination power

Marker	<i>A. mangium</i> (40)		<i>A. auriculiformis</i> (40)		<i>A. hybrid</i> (16)	
	Allele M	Allele A	Allele M	Allele A	Allele M	Allele A
AHsnp1	1.00	0.00	0.00	1.00	1.00	1.00
AHsnp2	1.00	0.00	0.00	0.95	1.00	1.00
AHsnp3	1.00	0.08	0.00	1.00	1.00	1.00
AHsnp4	1.00	0.00	0.00	1.00	1.00	1.00
AHsnp5	1.00	0.00	0.00	1.00	1.00	0.94

AHsnp1 and AHsnp4: 100% berhasil mendeteksi spesifik alel

AHsnp3 alel A juga ada disampel *A. auriculiformis* diduga karena adanya *common alleles* antara *A. mangium* dan *A. auriculiformis*

Tidak terdeteksinya alel diduga karena *A. auriculiformis* kadang-kadang memiliki null alleles

Aplikasi

- 3 set multiplex SNUPE di sengon dapat digunakan sebagai alat identifikasi antar genotip sengon
- Satu set multiplex SNUPE di *Acacia* hibrida dapat digunakan untuk berbagai tujuan seperti konfirmasi identitas hibrida, sertifikasi hibrida dan seleksi hibrida unggulan. Selain itu, untuk klarifikasi produk hibrida pada pengembangan kebun benih dua spesies (bi-parental seed orchard) dari *A. mangium* dan *A. auriculiformis*

Dengan keunggulannya, disertai dengan kemudahan membaca data dan otomatisasi analisisnya, penanda SNP akan sangat berguna untuk membuat *genetic data-base*



Terima kasih