

Identifikasi dan isolasi promotor gen pembungaan kakao *TcLFY*

Identification and isolation for promoter of TcLFY cacao flowering gene

Djoko SANTOSO¹⁾, Agustina A. HANDAYANI²⁾ & Sukarti MOELJOPAWIRO³⁾

¹⁾ Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Bogor 16151, Indonesia

²⁾ Pascasarjana, Program Studi Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta 55281, Indonesia

³⁾ Laboratorium Biokimia, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta 55281, Indonesia

Summary

Promoter is a regulator of gene expression for a phenotype or trait carried by the gene. In the structure, a promoter located beyond the 5' end of the open reading frame of the gene on which its expression is regulated. This research aimed to isolate the DNA fragment flanking TcLFY at the 5' end and to analyze whether the fragment has characteristics of the promoter, primarily the core motifs of promoter. Using Genome Walking technique, DNA fragments flanking the TcLFY gene at its 5' end was isolated. Analysis of the DNA sequence was done using online computer software accessible through web site www.softberry.com and an entry sequence of the flanking DNA fragment along with the 2.5 kb TcLFY sequence. The result indicated that the flanking fragment has core motifs for a promoter at proper positions, which are TATA box at position -80, CAT boxes (CCAAT) at -387 and -626, and GC boxes that are known as UAS were found at the -323 and -537 positions. To obtain a conclusive result, this promoter sequence needs to be further examined to confirm its function.

[Key words: *Theobroma cacao* L., promoter sequence, TcLFY, bioinformatics, genome walking]

Ringkasan

Promoter merupakan pengendali ekspresi gen untuk memunculkan fenotipe atau karakter yang dibawa oleh gen tersebut. Di dalam strukturnya, promotor umumnya terletak di daerah ujung 5' gen yang dikendalikan ekspresinya. Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan fragmen DNA yang mengapit gen pengendali pembungaan kakao (*TcLFY*) dan menganalisisnya apakah memiliki karakteristik promotor, yaitu mengandung motif-motif inti (*core motifs*) dari promotor. Dengan teknik *Genome Walking*, fragmen DNA pengapit gen *TcLFY* di ujung 5' dapat diisolasi. Analisis sekuen menggunakan perangkat lunak komputer *online* (www.softberry.com) dengan input data fragmen tersebut ditambah gen *TcLFY* 2,5 kb di bawahnya, mengindikasikan adanya beberapa motif inti promotor pada posisi yang sesuai, yaitu kotak TATA pada lokasi -80, kotak CAT (CCAAT) di posisi -387 dan -626, dan kotak GC yang merupakan UAS dijumpai pada lokasi -323 dan -537. Untuk memperoleh hasil yang bersifat konklusif, sekuen promotor ini masih perlu diuji fungsinya.

Pendahuluan

Usaha peningkatan produktivitas perkebunan kakao melalui perbaikan perkembangan organ reproduktif termasuk pembungaan, telah mendorong riset induksi pembentukan atau perkembangannya. Pembungaan tanaman secara genetik dikendalikan sedikitnya oleh ekspresi gen *LEAFY (LFY)*, *APETALAI (API)* dan *AGAMOUS (AG)* (Levy & Dean, 1998). Gen *LFY* merupakan pengendali utama pembungaan, sedangkan *API* dan *AG* lebih merupakan gen identitas pembungaan. Ketiga gen tersebut sudah berhasil diisolasi dari tanaman kakao (*Theobroma cacao*) oleh tim penelitian BPBPI, Bogor (Santoso *et al.*, 2004; Samanhudi, 2006; Chaidamsari *et al.*, 2006).

Ekspresi gen dikendalikan melalui promoter, sekuen DNA regulator yang umumnya terletak di ujung 5' dari gen yang dikendalikannya. DNA promoter ini memiliki motif-motif inti tertentu dan menurut konsensus dinamakan kotak TATA (*TATA box*), kotak CAT dan kotak GC. Sekuen dan motif-motif ini merupakan *cis-acting element* yang berinteraksi dengan *trans-acting elements* yang berupa protein regulator. Pada sel eukariotik, interaksi ini diperlukan untuk terbentuknya kompleks inisiasi yang memfasilitasi penempelan polimerase RNA pada gen yang akan diekspresikan. Setelah penempelan ini terjadilah transkripsi, biosintesis RNA (Santoso, 1995).

Tulisan ini menguraikan hasil penelitian yang bertujuan untuk mendapatkan promoter gen *LFY* dari tanaman kakao. Fragmen DNA genomik yang posisinya di ujung 5' dari gen *TcLFY* berhasil diisolasi dengan prosedur *Genome Walking* sedangkan identitas sebagai fragmen

regulator atau promoter gen tersebut, diperoleh melalui analisis sekuen tersebut dengan program bioinformatika yang dapat diakses *online* melalui situs web www.softberry.com.

Bahan dan Metode

Preparasi DNA genomik dari jaringan daun kakao

Preparasi DNA murni dari jaringan kakao sebelumnya adalah sulit karena kandungan senyawa *mucilagenya* sangat tinggi. DNA genomik berkualitas bagus dapat diisolasi dari inti sel (*nuclei*) yang dipreparasi mengikuti Couch & Fritz (1990). DNA diisolasi dari inti sel daun kakao dengan metode Khanuja, *et al.* (1999). Setelah sentrifugasi selama 10 menit pada 2000xg dan suhu 4 °C, endapan inti sel yang diperoleh dari satu gram jaringan tanaman, disuspensikan dalam 1-2 mL medium lisis dengan cara membolak-balik tabung selama tiga sampai lima menit hingga campuran menjadi kental. Medium lisis mengandung 100mM Tris-Cl pH 8.0, 25mM EDTA, 1.5M NaCl, 2.5% CTAB, 0.2% (v/v) 2-merkaptotanol, 1% (w/v) PVP. Dua komponen terakhir ditambahkan sesaat sebelum pemakaian.

Setelah inkubasi pada suhu 60 °C selama satu jam, suspensi diekstraksi dua kali dengan kloroform:isoamilalkohol (24:1). Ekstraksi dilakukan dengan inversi lima menit yang diikuti sentrifugasi 10 menit pada 10000xg dengan suhu 4 °C. Lapisan berair dicampur perlahan dengan 0,5 volume NaCl 5M dan 0,6 volume isopropanol, kemudian diinkubasi selama satu jam pada suhu 4 °C. DNA serat dapat dipancing (*hooked*) dengan batang gelas dan dicuci 2-3 kali dengan memasukkan

Identifikasi dan isolasi promoter gen pembungaan kakao *TcLFY*

nya ke dalam tabung mikro yang berisi etanol 80% dingin. Setelah dikering-anginkan selama sekitar 10 min, endapan DNA dilarutkan dalam 200 – 500 μ L bufer TE [Tris-Cl pH 8 + 0,2mM EDTA]. Kuantitas dan kualitas larutan DNA ditentukan dengan spektrofotometer dan elektroforesis.

PCR Genome Walking

Prosedur *Genome Walking* dilakukan untuk memperoleh fragmen pengapit sekuen DNA, yang sekuennya telah diketahui. Dalam hal ini fragmen DNA yang telah diketahui sekuennya adalah gen *TcLFY* (Santoso *et al.*, 2004) sedangkan yang dicari adalah pengapit di ujung 5'. Melalui pendekatan ini diharapkan diperoleh promoter gen *TcLFY*. Oleh karenanya primer spesifik gen (GSP1 dan GSP2) dirancang pada posisi nukleotida ke 100 hingga 200 pb dari ujung 5' gen *TcLFY*. Pustaka genomik dibuat dengan prosedur sebagaimana diuraikan dalam buku manual kit *Universal Genome Walking* (Clontech, CA - USA). Dalam beberapa hal, PCR utama (*primary*) dilakukan menggunakan polymerase DNA Pfu sedangkan PCR sekunder dikerjakan dengan polymerase DNA yang umum seperti SuperTaq. Fragmen teramplifikasi yang dihasilkan dapat langsung disekuen tanpa harus diklon di vektor pGEM-T, menggunakan primer sekuensing internal yang telah digunakan juga dalam amplifikasi terdahulu. Suhu penempelan dari program termalnya sekitar 5°C dibawah titik leleh (*melting points*) teoritis. PCR sekunder dilakukan dengan 25 hingga 35 siklus.

Sekuensing DNA

Produk PCR *Genome Walking* langsung disekuen dengan kondisi berikut. Untuk itu primer sekuensing yang digunakan adalah primer GSP sebagaimana yang digunakan dalam PCR *Genome Walking*. Reaksi sekuensing dilakukan sebagai berikut:

1. Dibuat campuran reaksi di dalam tabung mikro 250 μ L yang mengandung 2 μ L BigDye, 2 μ L bufer, 1 μ L primer sekuensing internal, 200-500 ng sample DNA, dan air MQ hingga volume total reaksi 10 μ L .
2. PCR 35 siklus dilakukan dengan program termal sebagai berikut: 94°C 30", 50°C 15", 60°C 4", dan 10°C HOLD
3. Sampel hasil reaksi tersebut selanjutnya dianalisis sekuen DNANYa dengan mesin *Sequencer* otomatis yang prinsip kerjanya didasarkan pada dideoksi nukleotida untuk menghentikan reaksi sekuensing.

Analisis sekuen DNA

Sekuen nukleotida dari fragmen-fragmen DNA genomik hasil PCR dianalisis untuk menentukan identitas dan kemungkinan adanya karakteristik sekuen regulator atau promotor gen *LFY*. Analisis dilakukan dengan program bioinformatika yang dapat diakses melalui situs NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) atau EBI (<http://www.ebi.ac.uk>). Analisis BlastX dilakukan pertama untuk menentukan homologi dengan gen-gen yang ada di bank gen situs tersebut. Output analisis yang mencantumkan nilai E (*E value*) lebih kecil dari e-4 memberikan arti kemiripan yang signifikan dengan sekuen input

(Claveri & Notredame, 2003). Parameter lainnya adalah *bit score*. Penjajaran majemuk (*multiple alignments*) adalah prosedur analisis *online* lainnya yang dapat membandingkan atau mengelompokkan gen-gen ortologs berdasarkan kedekatan atau kemiripan genetik yang dalam hal ini atas dasar sekuen DNA ataupun proteinnya. Hal ini dapat dilakukan juga dengan program yang tersedia *offline* seperti MegAlign dari DNA Star atau BioEdit. Output dari analisis ini dapat dibuat berupa pohon filogenetik (*phylogenetic tree*) atau matriks jarak (*distance matrix*).

Penentuan identitas elemen regulator dilakukan menggunakan program bio-informatika yang dapat diakses *online* melalui situs web <http://www.softberry.com/>

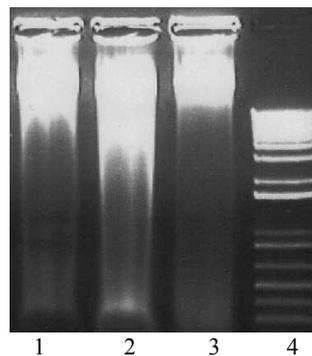
Hasil dan Pembahasan

PCR Genome Walking

DNA genomik yang dihasilkan dengan metode sebagaimana diuraikan dalam Bahan dan Metode, ditampilkan pada Gambar 1. Profil elektroforesis mengindikasikan bahwa DNA genomik tersebut utuh tidak mengalami degradasi. Data spektrofotometri (Tabel 1) menunjukkan kemurnian DNA cukup baik, DNA tersebut relatif murni dari kontaminan jenis protein (rasio serapan $260/280 \geq 1,6$) (Sambrook *et al.*, 1989), demikian juga terhadap kontaminan polisakarida atau polifenol, rasio serapan $260/230 > 1$ (Lewinsohn *et al.*, 1994). Data ini membuktikan bahwa prosedur preparasi dapat digunakan untuk isolasi DNA genomik dari jaringan kakao yang memiliki kandungan senyawa *mucilage* yang relatif sangat tinggi. Dalam percobaan berikutnya terbukti bahwa hasil yang baik

ini konsisten. DNA genomik berkualitas baik, dapat digunakan dalam reaksi PCR maupun untuk percobaan membuat pustaka genomik.

DNA genomik hasil di atas digunakan untuk membuat pustaka *genome walking*, yang kemudian diamplifikasi dengan pasangan primer spesifik gen dan spesifik adaptor. Hasil amplifikasi ditampilkan pada Gambar 2. Data ini menunjukkan bahwa telah terjadi amplifikasi baik yang spesifik gen maupun spesifik adaptor, yang diinginkan dalam prosedur *Genome Walking* adalah yang spesifik gen. Diantaranya adalah pasangan pita DNA yang berpotensi spesifik gen *TcLFY* adalah yang dilingkari dengan garis putih, yaitu pasangan produk dari PCR utama dan PCR sekunder. Terjadinya amplifikasi yang spesifik adaptor merupakan hasil yang tidak diinginkan namun dapat terjadi karena di dalam proses pembuatan pustaka, ligasi yang dilakukan sebenarnya menyambungkan antara adaptor dengan fragmen DNA genomik hasil digesti



Gambar 1. Profil gel elektroforesis DNA genomik daun kakao. Lajur 1, 2 dan 3 adalah dari percobaan ulangan 1, 2 dan 3

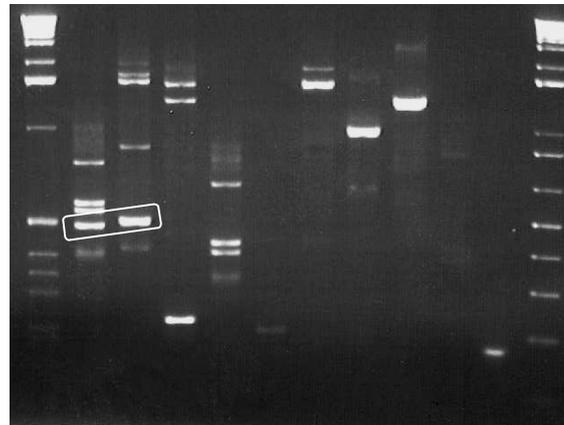
Figure 1. Electrophoretic profile of genomic DNA of cacao leaves. Lanes 1, 2 and 3 are prepared from experimental trials 1, 2, and 3.

Identifikasi dan isolasi promotor gen pembungaan kakao TcLFY

Tabel 1. Data spektrofotometri DNA genomik daun kakao.

Table 1. Spectrophotometric data of cacao leaves genomic DNA.

Ulangan <i>Trial</i>	A260/A280	A260/A230	DNA, $\mu\text{g/g}$ sampel
1	1,60	1,21	100
2	1,68	1,41	120
3	2,33	1,75	150



Gambar 2. Profil elektroforesis dari produk PCR *Genome Walking*. Pita DNA yang dilingkari adalah kandidat kuat untuk “walking” gen/DNA spesifik *TcLFY*.

Figure 2. Electrophoretic profile of the products Genome Walking PCR. Boxed DNA bands are candidates for walking DNA specific to TcLFY.

enzim restriksi. Dengan demikian pada saat PCR, kemungkinan terjadinya amplifikasi oleh pasangan primer adaptor saja tidak dapat dihindari. Namun demikian amplifikasi spesifik gen oleh pasangan primer spesifik gen dengan primer spesifik adaptor tetap terjadi. Oleh karenanya jumlah molar penggunaan primer adaptor di dalam reaksi PCR tidak boleh terlampaui banyak.

Pita DNA hasil amplifikasi spesifik gen tersebut kemudian diekstraksi dari gel agarosa. Apabila jumlah yang diperoleh dari ekstraksi ini mencukupi, maka dapat langsung digunakan dalam reaksi sekuensing. Namun apabila jumlahnya terlalu sedikit, maka dapat direamplifikasi dengan menggunakannya sebagai templat dalam reaksi PCR. Kondisi reamplifikasi sama dengan kondisi PCR standar.

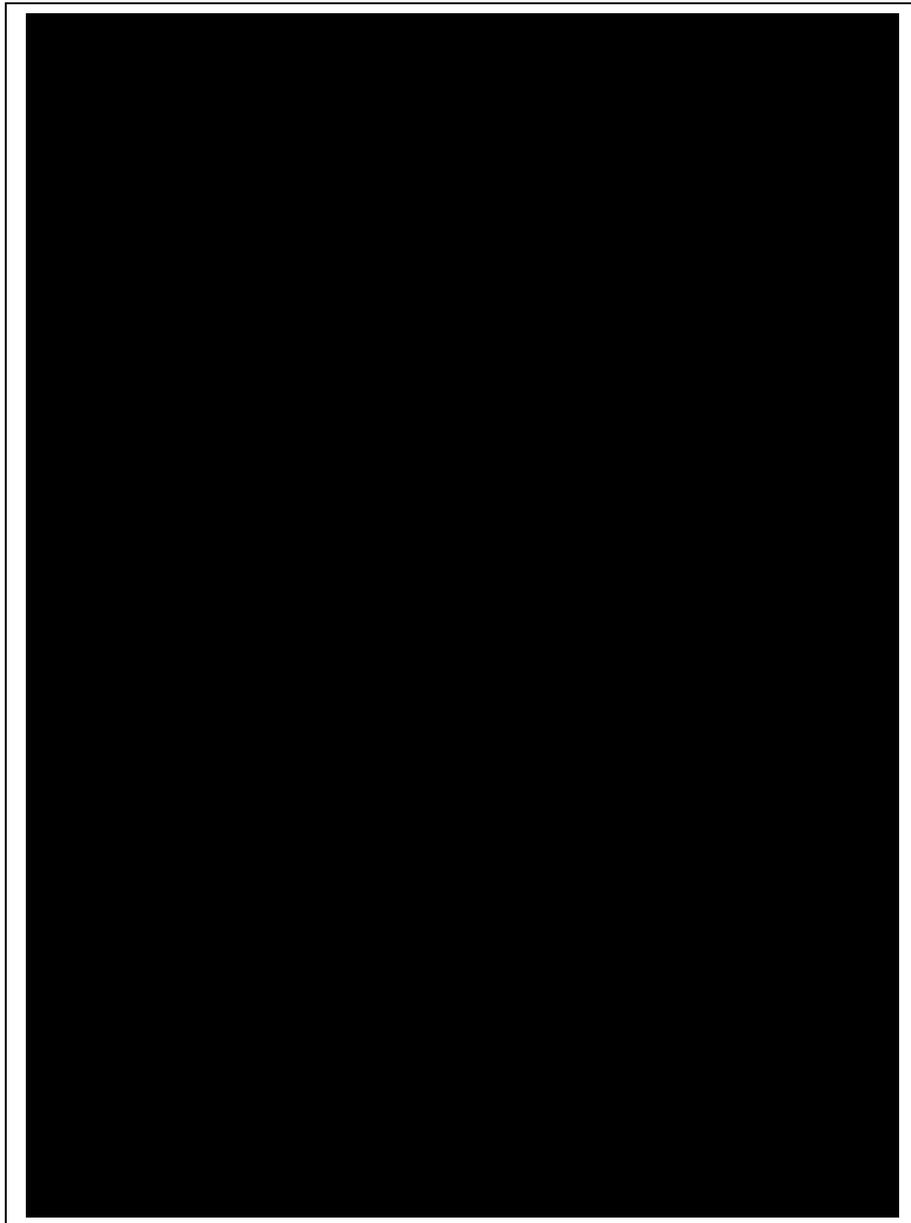
Sekuen DNA dan analisis untuk identitas sekuen regulator LEAFY

Analisis daerah pengapit gen *TcLFY* ini dilakukan dalam rangka memperoleh promoter gen tersebut. Dengan prosedur *Genome Walking* telah diperoleh gen *TcLFY full-length* dari sekuen fragmen gen tersebut di ujung 3' yang merupakan daerah terkonservasi (Santoso *et al.*, 2004). *Genome Walking* lanjutan berhasil mendapatkan sekitar 700 pasangan basa (pb) fragmen pengapit gen *TcLFY* dari ujung 5'. Analisis 700 pb daerah di ujung 5' tersebut tidak memberikan output yang menunjukkan adanya promoter. Hal ini kemungkinan ukuran sekuen *entry*-nya terlalu pendek. Demikian juga apabila *entry*-nya ditambah beberapa ratus pb lagi di ujung 3' fragmen 700 pb tersebut, output analisis juga tidak memberikan identitas adanya promoter (data tidak ditunjukkan). Namun apabila sekuen *entry*-nya ditambah klon genomik gen *TcLFY* yang berukuran sekitar 2,5 kb atau dengan total *entry* sekuen 3415 pb, output analisisnya menunjukkan adanya promoter yang ditandai dengan terdapatnya kotak TATA dan motif lainnya (Gambar 3).

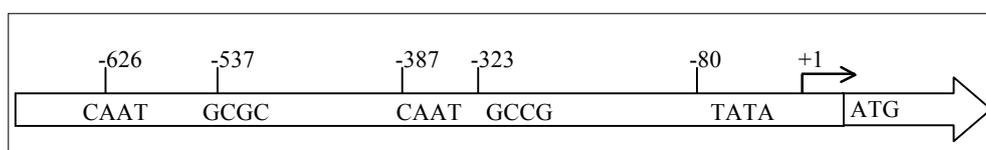
Pada sekuen *entry* dijumpai dua daerah promoter, yaitu di daerah 592 dan 2642. Karena promoter umumnya terletak di daerah ujung 5' dari gen yang dikontrolnya, daerah pertama menjadi lebih menarik. Analisis lebih lanjut mengindikasikan bahwa daerah pada posisi 592 adalah promoter gen *TcLFY*, mengingat posisi dan adanya sekuen motif lainnya. Di daerah hulu (ujung 5') dapat dijumpai dua motif yaitu dua kotak CAT(CCAAT) yang terletak pada posisi -387 dan -626, dengan asumsi posisi kotak tata terletak di -80. Motif lain adalah UAS (*upstream activating sequence*) kotak GC yang dijumpai pada posisi -323 dan -537.

Motif-motif inti daerah promoter ini dan posisinya diilustrasikan pada Gambar 4. Ilustrasi ini dibuat dari data output program analisis www.softberry.com (Gambar 3). Meskipun hasil analisis dengan program bioinformatika mengindikasikan kuat adanya promoter *TcLFY* pada daerah 700 pb di ujung 5' gen tersebut, kepastiannya dapat diperoleh dari pengujian fungsional, misalnya dengan menggunakan gen reporter, sebagaimana dilakukan pada promoter kulit buah kakao (Chaidamsari, 2005). Pendekatan dengan PCR spesifik semacam ini juga dilaporkan berhasil untuk mengisolasi promoter pada tanaman yang memiliki karakteristik yang mirip yaitu kaya akan kandungan motif GC (Michiels *et al.*, 2003).

Diperolehnya promoter gen *TcLFY* ini memberikan implikasi terapan yang prospektif. Salah satu diantaranya adalah terbukanya peluang untuk mengembangkan ke arah peningkatan produktivitas melalui pengaturan waktu berbuah ataupun perpendekan masa TBM (tanaman belum menghasilkan atau *juvenile*) tanaman tahunan. Peluang ini mungkin diraih melalui pemuliaan ataupun kultur teknis persisi (molekuler). Dengan promoter tersebut dapat diseleksi induksi pembungaan yang efektif dan ekonomis. Penelitian pada tanaman model yang mendukung pemikiran ini dilaporkan untuk *AtLFY* pada tanaman *Arabidopsis*. Gen *LEAFY* (*LFY*) yang merupakan *switch* untuk transisi pertumbuhan vegetatif ke generatif atau pembungaan (Levy & Dean, 1998) telah dibuktikan secara empiris dan meyakinkan, antara lain oleh Nilsson *et al.* (1998) dan Putterill *et al.* (2004). Dengan promoter *AtLFY* juga telah dibuktikan bahwa gibberellin, baik dengan ataupun tanpa sukrosa, dapat menginduksi pembungaan pada tanaman tersebut (Blázquez *et al.*, 1998)



Gambar 3. Output analisis promoter dengan bioinformatika (www.softberry.com).
Figure 3. Output of promoter analysis with bioinformatics (www.softberry.com).



Gambar 4. Posisi komponen/motif inti pada daerah promoter gen *TcLFY*.

Figure 4. Positions of the core motifs on the promoter region of *TcLFY* gene.

Kesimpulan

Fragmen DNA pengapit gen *TcLFY* di ujung 5' dapat diisolasi dengan teknik *Genome Walking*. Analisis melalui bio-informatika (www.softberry.com) mengindikasikan bahwa fragmen tersebut adalah promoter gen *TcLFY*. Untuk memperoleh hasil yang lebih pasti, sekuen promoter ini masih perlu diuji fungsinya.

Daftar Pustaka

- Blázquez, M.A., R. Green, O. Nilsson, M.R. Sussman & D. Weigel (1998). Gibberellins promote flowering of *Arabidopsis* by activating the *LEAFY* promoter. *Plant Cell*, **10**, 791-800.
- Chaidamsari, T. (2005). Biotechnology for cocoa pod borer resistance in cocoa. Wageningen, WUR (*PhD Dissertation*)
- Chaidamsari, T., Samanhuri, H. Sugiarti, D. Santoso, G.C. Angenent & R.A. de Maagd (2006). Isolation and characterization of an *AGAMOUS* homologue from cocoa. *Plant Sci.*, **170**, 968-975.
- Claveri, J.M. & C. Notredame (2003). *Bioinformatics For Dummies*. 2nd ed. New York, Wiley Publishing, Inc. p. 215-238.
- Couch, J.A. & P.J. Fritz (1990). Isolation of DNA from plant high in polyphenolics. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **8**, 8-12.
- Khanuja, S.P.S., A.K. Shasany, M.P. Darokar & S. Kumar (1999). Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. *Plant Mol Biol. Rep.*, **17**, 1-7.
- Levy, Y.Y. & C. Dean (1998). The transition to flowering. *Plant Cell*, **10**, 1973-1990.
- Lewinsohn E., C.L. Steele & R. Croteau (1994). Simple isolation of functional RNA from woody stems of Gymnosperms. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **12**, 20-25.
- Nilsson, O., I. Lee, M.A. Blázquez & D. Weigel (1998). Flowering-time genes modulate the response to *LEAFY* activity. *Genetics*, **150**, 403-410.
- Putterill, J., R. Laurie & R. Macknight (2004). It's time to flower: the genetic control of flowering time. *BioEssays*, **26**, 1-11.
- Samanhuri (2006). Induksi pembungaan kakao dan isolasi gen *APETALAI* dari jaringan bunga kakao. *Desertasi*. Bogor, Institut Pertanian Bogor.
- Sambrook, J.E., F. Fritsch & T. Maniatis (1989). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York, Cold Spring Harbor Lab. Press.
- Santoso D (1995). 5-Fluoroorotic acid-selected cell lines and regulation of UMP synthase gene expression in tobacco cells. *PhD Dissertation*. Ames Iowa (USA), Iowa State University.
- Santoso, D., Samanhuri, T. Chaidamsari, R. A. de Maagd & G. Angenent (2004). Study on flowering induction in cacao: Identification of the *LEAFY* homolog in cacao. In *The 3rd Indonesian Biotechnology Conference*, Sanur-Bali, Dec 1-3rd 2004.
- Michiels, A., M. Tucker, W.V.D. Ende & A.V. Laere (2003). Chromosomal walking of flanking regions from short known sequences in GC-rich plant genomic DNA. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **21**, 295-302.