

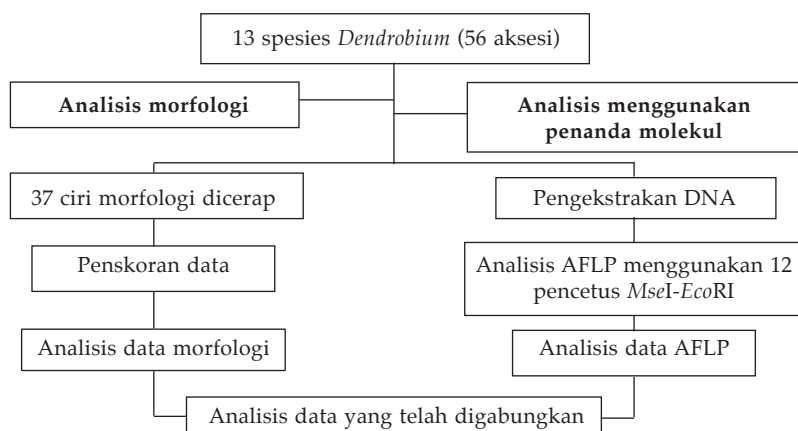
Pengelasan spesies *Dendrobium* menggunakan kaedah penanda molekul AFLP

(Classification of *Dendrobium* species using molecular markers, AFLP)

Nor Hazlina Mat Sa'at dan Wickneswary Ratnam

Pengenalan

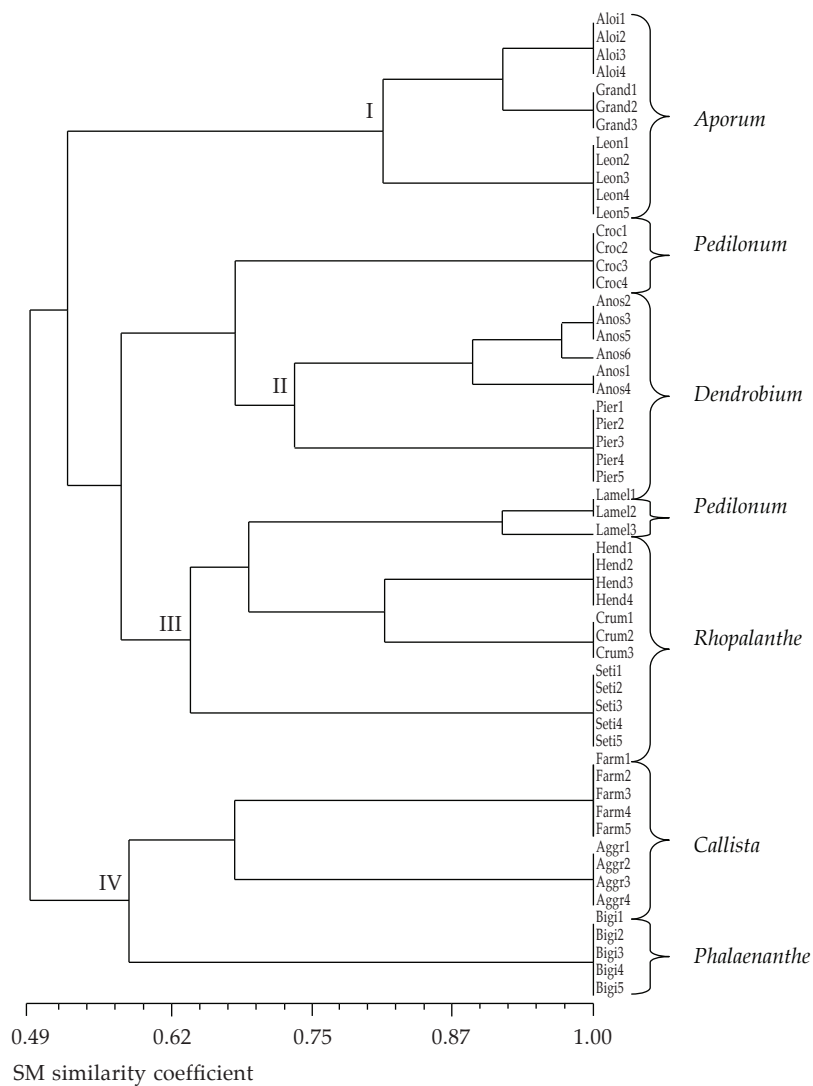
Orkid tergolong dalam famili Orchidaceae dan merupakan antara kumpulan tumbuhan berbunga terbesar di dunia. Industri orkid di Malaysia mula berkembang pada tahun 1974 dengan nilai eksport bunga keratan menghampiri RM170 juta pada tahun 2006. Pengeluaran tanaman orkid tertumpu di kawasan Johor, Perak, Selangor, Kelantan dan Pahang dan dianggarkan sebanyak 1,855 hektar tanaman orkid terdiri daripada pelbagai hibrid orkid komersial terutama dari genus *Dendrobium*, *Oncidium*, *Aranda*, *Mokara* dan *Holttumara*. Orkid *Dendrobium* mempunyai bunga yang menarik, sifat bunga berjambak, mudah berbunga dan bersifat tidak bermusim menyebabkan permintaan terhadap bunga ini semakin meningkat dari tahun ke tahun. Ia sering digunakan sebagai orkid komersial sama ada sebagai bunga keratan mahupun tanaman berpasu. Bagi mereka yang kurang mahir dalam taksonomi orkid, perbezaan antara spesies sukar dikenal pasti dan hanya dikenali berdasarkan ciri morfologi sahaja. Oleh itu, penentuan hubungan genetik antara aksesori dan antara spesies sangat diperlukan dalam aktiviti pembiakbakaan tanaman orkid terutamanya dalam menentukan induk yang sesuai dalam penghibridan. Kombinasi antara ciri morfologi dan data molekul dapat menentukan hubungan antara spesies dengan mudah dan tepat.



Rajah 1. Gabungan analisis menggunakan data morfologi dan penanda molekul AFLP

Gabungan ciri morfologi dan penanda molekul

Kaedah bagi analisis ini ditunjukkan seperti *Rajah 1*. Berdasarkan data morfologi yang dicerap, rajah dendrogram (*Rajah 2*) mengumpulkan spesies kepada empat kluster utama iaitu *Den. aloifolium*, *Den. grande* dan *Den. leonis* tergolong dalam kumpulan pertama; *Den. crocatum*, *Den. anosmum* dan *Den. pierardii* dalam kumpulan kedua; *Den. lamellatum*, *Den. hendersonii*, *Den. crumenatum* dan *Den. setifolium* kumpulan ketiga; dan *Den. farmeri*, *Den. aggregatum* dan *Den. bigibbum* membentuk kumpulan keempat. Purata indeks kesamaan *Simple Matching* (SM) antara aksesori ialah 0.59 dan julatnya berada antara 0.35 hingga 1.00. Merujuk pada hubungan aksesori dalam spesies, kebanyakan aksesori



Rajah 2. Dendrogram yang dijanakan oleh kaedah UPGMA berdasarkan data morfologi menggunakan indeks kesamaan Simple Matching bagi spesies Dendrobium

adalah berhubung rapat antara satu sama lain. Perbezaan aksesori dikenal pasti berlaku dalam koleksi spesies *Den. anosmum* yang membentuk tiga subkumpulan berbeza. Keadaan ini disebabkan terdapatnya variasi aksesori dalam spesies *Den. anosmum* iaitu berbunga putih, *Den. anosmum* berbunga merah jambu dan *Den. anosmum* berbunga merah ungu.

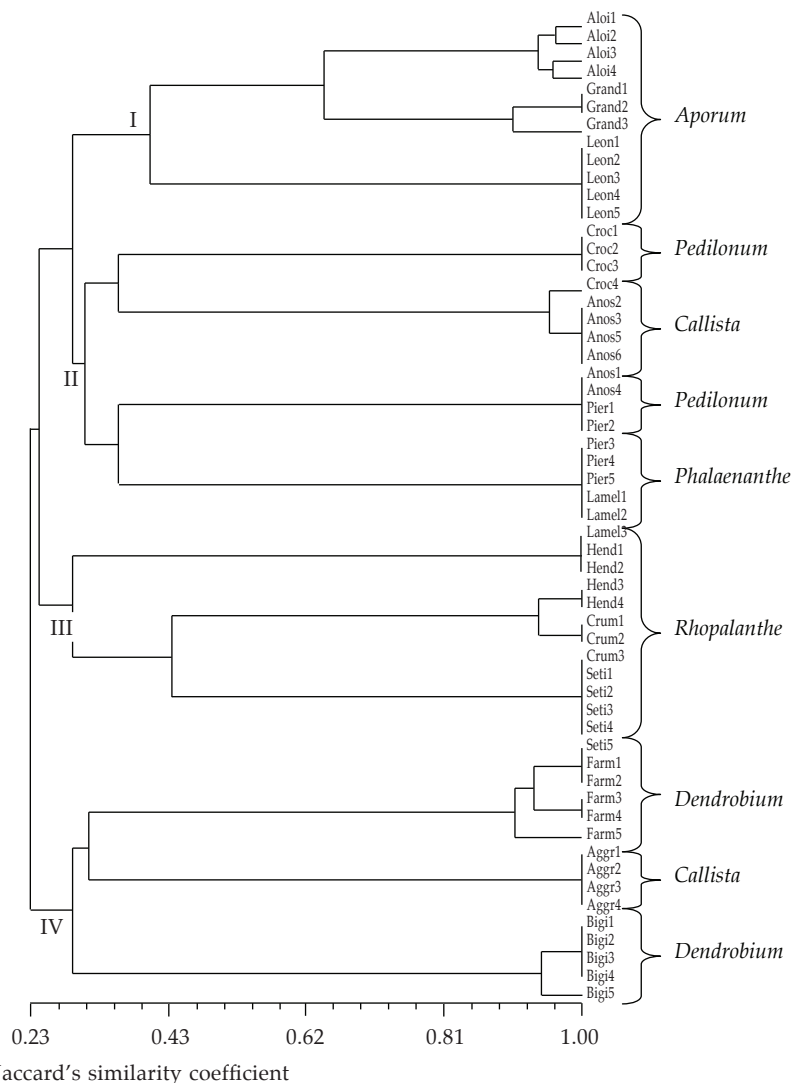
Bagi data AFLP, sebanyak 2,701 puncak AFLP diskor dan digunakan dalam kajian hubungan genetik (Jadual 1). Hubungan genetik bagi setiap aksesori dan spesies ditentukan melalui nilai indeks kesamaan koefisien Jaccard (J). Indeks kesamaan Jaccard antara spesies berjulat daripada 0.14 hingga 1.00 menunjukkan pangkalan genetik spesies adalah lebih luas. Dendrogram (Rajah 3) membentuk empat kumpulan kluster berbeza apabila *Den. aloifolium*, *Den. grande* dan *Den. leonis* dikumpulkan dalam satu kumpulan yang sama dan ini menunjukkan ia berhubung rapat dan memenuhi pengelasan terhadap seksyen *Aporum*. Selain itu, *Den. lamellatum*, *Den. farmeri*, *Den. crocatum* dan *Den. bigibbum* dikumpulkan dalam satu kumpulan dan berhubung rapat antara satu sama lain; *Den. crumenatum*, *Den. hendersonii* berhubung rapat bersama *Den. setifolium* manakala *Den. anosmum* dan *Den. aggregatum* berhubung rapat bersama *Den. pierardii*.

Dendrogram yang terbentuk berdasarkan data morfologi dan AFLP menunjukkan bahawa spesies tidak dapat dipisahkan dengan baik dan pengelasan seksyen tidak dapat dipenuhi dengan jelas. Walau bagaimanapun, melalui analisis gabungan data morfologi dan AFLP hubungan antara spesies dapat ditentukan dan pengelasan yang telah dibuat oleh saintis terdahulu dapat disokong secara tidak langsung. Seperti contoh, *Den. aloifolium*, *Den. grande* dan *Den. leonis* berhubung rapat dan dikumpulkan

Jadual 1. Dua belas kombinasi pencetus bersama jumlah bilangan puncak terhasil, bilangan puncak polimorfik dan peratus puncak polimorfik terhadap spesies *Dendrobium* dan hibrid interspesifik

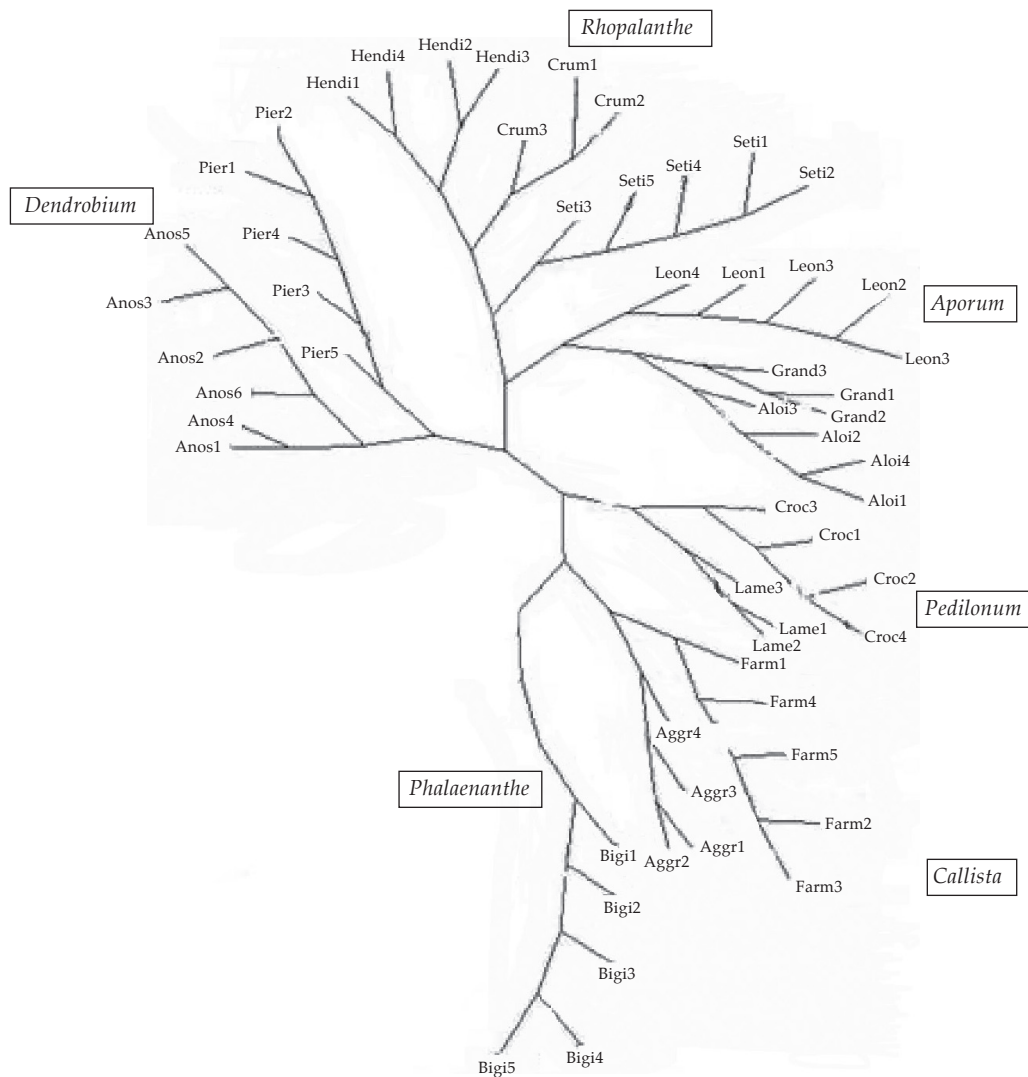
Bil.	Kombinasi pencetus	Bilangan puncak	Bilangan puncak polimorfik	Peratus puncak polimorfik (%)
1	E-AAC/M-CAA (NED)	246	210	85
2	E-ACA/M-CAA (FAM)	226	103	46
3	E-ACC/M-CAA (NED)	251	229	91
4	E-ACT/M-CAA (FAM)	248	189	76
5	E-AGC/M-CAA (NED)	284	284	100
6	E-AAC/M-CAC (FAM)	196	196	100
7	E-ACA/M-CAC (NED)	176	119	68
8	E-ACC/M-CAG (NED)	207	178	86
9	E-AGC/M-CAT (NED)	288	80	28
10	E-ACT/M-CTA (FAM)	187	156	83
11	E-AGC/M-CTC (NED)	284	284	100
12	E-ACT/M-CTA (NED)	108	87	81
Jumlah		2701	2115	78

Purata saiz: 70–500 bp
Saiz puncak: >600



Rajah 3. Dendrogram yang dijanakan oleh kaedah UPGMA berdasarkan data AFLP menggunakan indeks kesamaan Jaccard bagi spesies **Dendrobium**

bawah seksyen *Aporum*; *Den. crocatum* dan *Den. lamellatum* berhubung rapat dan dikumpulkan bawah seksyen *Pedilonum*; *Den. setifolium*, *Den. crumenatum* dan *Den. hendersonii* berhubung rapat dan dikumpulkan bawah seksyen *Rhopalanthe*; *Den. anosmum* dan *Den. pierardii* berhubung rapat dan dikumpulkan bawah seksyen *Dendrobium* manakala *Den. farmeri* dan *Den. aggregatum* berhubung rapat dan dikumpulkan bawah seksyen *Callista*. Pengelasan dan hubungan yang dibentuk berjaya memenuhi pengelasan yang telah dibuat oleh Dressler (1993) di mana analisis gabungan ini berjaya menyokong pengelasan spesies dengan tepat dan hubungan antara aksesori dan spesies dapat ditentukan dengan mudah.



Rajah 4. Gambar rajah pokok yang dijanakan oleh kaedah Neighbour Joining menggunakan data morfologi dan AFLP yang telah digabungkan berdasarkan nilai jarak genetik bagi 56 aksesi spesies *Dendrobium*

Kesimpulan

Hubungan genetik antara 56 aksesi *Dendrobium* yang mewakili 13 spesies daripada koleksi orkid MARDI ditentukan dengan mudah menggunakan gabungan ciri morfologi dan penanda AFLP. Dua belas kombinasi pencetus *EcoRI* dan *MseI* dipilih dan menghasilkan 2,701 puncak AFLP pada ketinggian sama dan melebihi 600 unit bersaiz antara 70 bp dan 500 bp di mana 2115 (78%) daripadanya adalah polimorfik. Indeks kesamaan Jaccard antara spesies berjulat antara 0.14 hingga 1.00 menunjukkan pangkalan genetik bagi koleksi spesies ini adalah tinggi.

Analisis gabungan membuktikan bahawa pengelasan spesies dilakukan dengan tepat (Rajah 4). *Den. aloifolium*, *Den. grande* dan

Den. leonis berhubung rapat dan dikumpulkan bawah seksyen *Aporum*; *Den. crocatum* dan *Den. lamellatum* berhubung rapat dan dikumpulkan bawah seksyen *Pedilonum*; *Den. setifolium*, *Den. crumenatum* dan *Den. hendersonii* berhubung rapat dan dikumpulkan di bawah seksyen *Rhopalanthé*; *Den. anosmum* dan *Den. pierardii* berhubung rapat dan dikumpulkan bawah seksyen *Dendrobium*, *Den. bigibbum* di bawah kumpulan *Phalaenanthe*. Manakala *Den. farmeri* dan *Den. aggregatum* berhubung rapat dan dikumpulkan bawah seksyen *Callista*.

Kombinasi antara data morfologi dan AFLP menunjukkan hubungan aksesori dan spesies ditentukan dengan mudah dan tepat. Hasil daripada kajian ini menunjukkan bahawa analisis morfologi sesuai digunakan dalam menentukan hubungan dan pengecaman spesies *Dendrobium*, tetapi kurang sesuai untuk memahami pengelasan manakala penanda AFLP sesuai digunakan dalam mengecam spesies dan mengenal pasti variasi yang wujud dalam aksesori spesies.

Bibliografi

- Anon. (2008). Pelan pemasaran komoditi orkid 2003–2010. Diperoleh dari www.pico.neofission.com/websites/agribdcom/index.php
- Dressler, R.L. (1993). *Phylogeny and classification of the orchid family*, m.s. 59–83. Cambridge: Cambridge University Press
- Hatipah, A. (2006). Eksport bunga negara terus meningkat. Diperoleh dari www.famaxchange.org/index.php/www.moh.gov.my.fqc/index.php/index.php?ch=emedia&pg=hmetro&ac=1095
- Neyland, R. dan Urbatsch, L. (1995). A terrestrial origin for the Orchidaceae suggested by a phylogeny inferred from *ndhF* chloroplast gene sequences. *Lindleyana* 11: 47–53

Ringkasan

Hubungan genetik 13 spesies *Dendrobium* daripada koleksi orkid MARDI ditentukan menggunakan gabungan ciri morfologi dan penanda Polimorfisme Panjang Fragmen Teramplifikasi (AFLP). Hubungan kait antara individu bagi setiap spesies (atau lebih dikenali sebagai aksesori) dianggarkan melalui indeks koefisien Jaccard dan analisis pengelompokan UPGMA (*unweighted pair group method*). Indeks kesamaan Jaccard antara spesies berjulat antara nilai yang rendah (0.14) hingga tinggi (1.00) menunjukkan pangkalan genetik bagi koleksi spesies ini adalah tinggi dan dendrogram yang dijana menghasilkan lima kluster berbeza. Hasil daripada kajian ini menunjukkan bahawa analisis morfologi sesuai digunakan dalam menentukan hubungan dan pengecaman spesies manakala penanda AFLP sesuai digunakan dalam pengecaman spesies dan mengenal pasti variasi yang wujud dalam aksesori spesies *Dendrobium*. Maklumat pencapaian AFLP ini berupaya membantu ahli biak baka dan ahli taksonomi dalam mengenal pasti sesuatu kultivar, memulihara janaplasma dan memilih induk terbaik bagi menghasilkan hibrid yang bermutu.

Summary

Genetic relationship among 13 *Dendrobium* species from MARDI orchid collections were investigated using morphological characters and amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. The relatedness among the collection of the species (or accessions) was determined using Jaccard coefficient index and UPGMA grouping analysis (*unweighted pair group method*). Jaccard similarity coefficients ranged from 0.14 to 1.00 among accessions indicating a diverse gene pool in the species which produced five clusters. Results from these studies showed the efficiency of using morphological analysis for identification and determination of variation among species while AFLP markers were very useful in the identification of variation among *Dendrobium* accessions and species. The information from AFLP markers can help breeders and taxonomists in the identification of cultivars, conservation of germplasm, development of new cultivars and protection for new plant varieties.

Pengarang

Nor Hazlina Mat Sa'at
Pusat Penyelidikan Hortikultur, Ibu Pejabat MARDI, Serdang,
Peti Surat 12301, 50774 Kuala Lumpur

Wickneswary Ratnam
Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia,
43600 UKM Bangi, Selangor