

## Hubungan filogenetik spesies *Garcinia* menggunakan penanda *matK* (Phylogenetic relationship on *Garcinia* species using *matK*)

Zulhairil Ariffin, Azuan Amron dan Nuradni Hashim

### Pengenalan

*Garcinia* tergolong dalam famili Guttiferae (Clusiaceae) yang mempunyai 35 genera dan lebih daripada 800 spesies. Ia merupakan genus yang terbesar kerana mempunyai lebih kurang 400 spesies dan kebanyakannya berasal dari Timur India, Semenanjung Malaysia dan Asia Tenggara. Namun, dianggarkan hanya 200 – 250 spesies *Garcinia* dengan mengambil kira beberapa spesies yang belum dikenal pasti. Pada masa ini terdapat 49 spesies *Garcinia* telah direkodkan di Semenanjung Malaysia.

Pokok *Garcinia* bersaiz kecil hingga sederhana dengan batangnya yang tegak dan boleh mencapai 50 m tinggi. Pokoknya juga didapati mengeluarkan rembesan cecair berwarna kuning atau putih krim jika dipotong pada dahan atau ranting. Kebanyakan spesies ini boleh menghasilkan buah dan ada yang boleh dimakan seperti manggis (*Garcinia mangostana*) yang merupakan salah satu spesies *Garcinia* yang paling popular. Buah manggis dapat dimakan terus dan kerana kelazatannya ia digelar sebagai 'ratu buah tropika' (*Queen of tropical fruits*). Kini, hanya pokok manggis sahaja ditanam secara komersial dan meluas di Malaysia. Buah manggis telah menjadi salah satu komoditi eksport yang memberikan pulangan yang lumayan kepada industri buah tropika negara. Selain manggis, terdapat banyak spesies *Garcinia* liar seperti asam gelugur (*G. atroviridis*), beruas (*G. hambronia*), cempurah/tengkawang (*G. bancana*), kandis (*G. cowa*), mundu (*G. dulcis*) dan kecupu/cerapu (*G. prainiana*). Spesies ini amat kurang dikenali, ditanam dan jarang dieksplotasi. Kebiasaannya, spesies ini boleh ditemui di kawasan tepi pantai, tanah rendah sehinggalah kawasan hutan di pergunungan. Namun, ada juga yang ditanam di kebun-kebun, halaman rumah dan dijadikan sebagai tanaman hiasan di tepi jalan seperti pokok beruas. Selain itu, ia juga ditanam untuk mendapatkan buahnya. Manakala, daun mudanya pula boleh dimakan mentah sebagai sayuran atau ulam dan turut digunakan dalam perubatan tradisional. Namun, masih terdapat banyak maklumat yang kurang diketahui terutamanya mengenai kegunaan lain spesies liar ini.

Kajian terdahulu telah menjalankan pencirian secara morfologi terhadap tiga spesies *Garcinia* iaitu, *G. mangostana*, *G. malacensis* dan *G. hambronia*. Berdasarkan beberapa ciri persamaan yang ada antara ketiga-tiga spesies ini, didapati bahawa *G. mangostana* merupakan hibrid yang berasal daripada *G. hambronia* dan *G. malacensis*. Selain itu, terdapat kajian

yang menumpukan kepada ciri morfologi bunga dan buah ke atas enam spesies *Garcinia* di Thailand dan mendapati saling kaitan antara *G. mangostana* dengan *G. speciosa* yang berpotensi untuk biak baka. Hubungan ini disokong pula oleh kaedah sokongan akar yang menggalak pertumbuhan awal manggis oleh *G. speciosa*. Namun spesies ini mempunyai keupayaan yang rendah sebagai pokok kacukan untuk tanaman manggis. Wujudnya variasi terhadap ciri morfologi yang terdapat pada buah *G. atroviridis* dan *G. mangostana* yang menunjukkan jelas ketara, tidak ketara dan hampir tidak kelihatan dapat digunakan sebagai perbandingan antara kedua spesies tersebut. Walau bagaimanapun, kadang kala perbezaan antara spesies amat sukar dikenal pasti berdasarkan ciri morfologi terutamanya bagi individu yang kurang mahir dalam bidang taksonomi. Tambahan pula, penggunaan data morfologi masih kurang mencukupi untuk menentukan hubungan genetik spesies *Garcinia*. Penilaian fenotipik juga hanya menerangkan sebahagian kecil maklumat kepelbagaian genetik yang hadir dalam satu spesies.

Kajian penanda molekul telah digunakan untuk mengenal pasti germplasma dan amat berguna untuk menentukan hubungan genetik tumbuhan. Terdapat pelbagai teknik penanda molekul yang telah digunakan untuk pencirian pokok berkayu. Antaranya ialah Polimorfisme DNA Teramplifikasi Rawak (RAPD), Polimorfisme Panjang Jalur Teramplifikasi (AFLP), Polimorfisme Panjang Jalur Tersekat (RFLP), Polimorfisme Nukleotida Tunggal (SNP) dan Jujukan Ringkas Berulang (SSR). Kini, terdapat kaedah alternatif yang boleh digunakan untuk mengenal pasti spesies tumbuhan melalui teknologi kod bar DNA. Teknologi kod bar DNA sering kali digunakan oleh saintis dan penyelidik untuk mengenal pasti dan klasifikasi sesuatu organism atau spesies. Pengekodan kod bar DNA adalah bergantung kepada genom yang mempunyai kawasan perubahan yang tinggi dan pendek. Analisis molekul adalah berdasarkan jujukan kawasan *Maturase K (matK)* untuk memperincikan hubungan filogenetik spesies *Garcinia* menurut kod bar bagi tumbuhan darat.

### **Penyediaan sampel**

Sembilan spesies *Garcinia* dan empat spesies yang tidak dikenali telah disampelkan dari bank gen ladang, Institut Penyelidikan dan Kemajuan Pertanian Malaysia (MARDI), Serdang, Selangor. Keseluruhan sampel mengandungi 82 individu yang terdiri daripada *G. cowa* (17 akses), *G. cambogiana* (tujuh akses), *G. xanthocymus* (dua akses), *G. atroviridis* (10 akses), *G. mangostana* (sembilan akses), *G. hambroiana* (sembilan akses), *G. bancana* (lima akses), *G. parvifolia* (tiga akses), *G. prainiana* (16 akses) diikuti dengan empat akses yang dinamakan sebagai kandis ros, gelugur, gelugur paya dan munda bulat dalam koleksi bank gen ladang MARDI.

## Pemencilan DNA

Kaedah CTAB dengan sedikit perubahan telah digunakan untuk proses pemencilan DNA. Beberapa potongan daun yang telah dibersihkan dengan larutan etanol 70% dikisar di dalam lesung yang berisi larutan nitrogen sehingga menjadi serbuk halus. Lebih kurang 100 mg serbuk daun dipindahkan ke dalam tiub mikro 1.5 mL menggunakan spatula kecil dan ditambah dengan 1 mL larutan 2X CTAB (2% [w/v] CTAB, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1.4 M NaCl, 1% PVP-40 dan 0.2 dan  $\beta$ -mercaptoetanol) dan dieram pada suhu 65 °C selama 30 minit. Tiub digoncang pada setiap 10 minit agar campuran menjadi sebati dan sekata. Tiub dikeluarkan dan 200  $\mu$ L kloroform-isoamil alkohol (CIA; 24:1) dicampurkan ke dalam larutan, digoncang dan diemparkan dengan kelajuan 13,000 rpm pada suhu bilik selama dua minit. Tiga lapisan terbentuk dan bahagian paling atas yang dipanggil supernatan dipindahkan ke dalam tiub baharu dan dicampur sekali lagi dengan larutan CIA, digoncang dan diemparkan pada kelajuan 13,000 rpm pada suhu bilik selama dua minit. Supernatan dipindahkan keluar dan ditambah dengan 600  $\mu$ L isopropanol sejuk (-20 °C), digoncang untuk dibiarkan selama 15 minit pada suhu bilik. Campuran larutan diemparkan pada 13,000 rpm selama dua minit pada suhu 4 °C. Supernatan dibuang dan pelet pada dasar tiub dicuci dengan 1 mL larutan penimbal pencuci (76% etanol dan 10 mM ammonium asetat). Pelet dibiarkan kering selama 10 – 15 minit dan dilarutkan di dalam 100 – 200  $\mu$ L penimbal TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.4) dan disimpan pada suhu 4 °C.

## Amplifikasi PCR

Proses amplifikasi telah dijalankan dengan menggunakan penanda *matK* yang berasal daripada genom plastid. Jujukan penuh penanda adalah seperti dalam *Jadual 1*.

Jadual 1. Jujukan penuh penanda *matK*

Nama	Jujukan penuh penanda
<i>matK-390f</i>	5'-CGATCTATTCATTCAATATTTC-3'
<i>matK-1326r</i>	5'-TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT-3'

Tindak balas polimerase berantai (PCR) *matK* dijalankan menggunakan kuantiti yang kecil iaitu sebanyak 7.5  $\mu$ L dengan program ditetapkan pada fasa pradenaturasi 94 °C selama satu minit; 94 °C untuk 30 saat, 50 °C untuk 40 saat, 72 °C untuk 40 saat bagi 35 kitaran dan fasa akhir pemanjangan pada 72 °C selama lima minit.

### **Penulenan produk PCR**

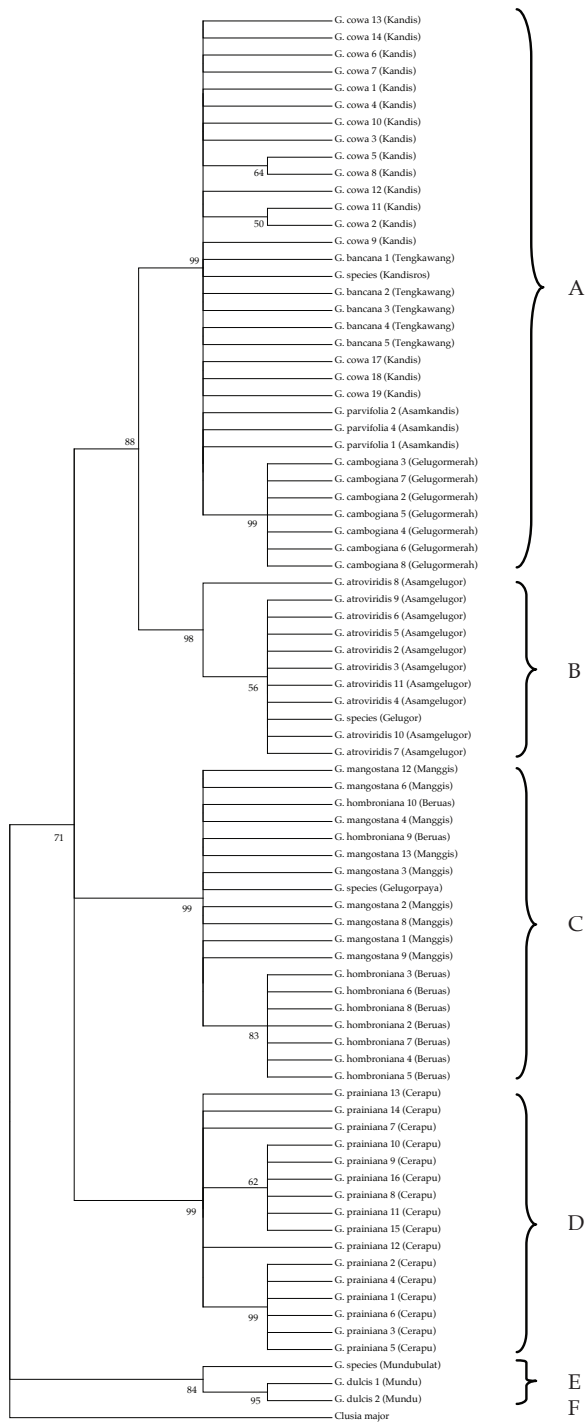
Produk PCR diceraup melalui elektroforesis gel agaros 1% selama satu jam. Selesai proses elektroforesis gel, sasaran jalur amplifikasi dipotong menggunakan pisau di bawah cahaya LED. Potongan gel tersebut dicampurkan dengan lima kali isi padu penimbal PCR dan digoncang. Sebanyak 5  $\mu\text{L}$  3 M ammonium asetat akan ditambah kepada campuran jika ia berubah kepada warna oren/pink/merah dan digoncang kembali. Larutan berwarna kuning dipindahkan kepada bekas yang diletakkan di dalam tiub pengumpulan dan diemparkan pada 10,000 rpm selama satu minit. Larutan terempap dibuang dan larutan tertinggal diemparkan sekali lagi. Bekas dicuci dengan 650  $\mu\text{L}$  penimbal pencuci dan diemparkan pada 10,000 rpm selama satu minit. Larutan terempap diemparkan sekali lagi pada 10,000 rpm untuk membuang sisa etanol. Bekas diletakkan pada tiub baharu dan sebanyak 30 – 200  $\mu\text{L}$  penimbal elusi dimasukkan dan dibiarkan selama 2 – 10 minit. Tiub diemparkan pada 10,000 rpm untuk elut DNA. Tiub yang mengandungi asid nukleik disimpan pada suhu 4 °C atau -20 °C. Proses penulenan ini dijalankan menggunakan kit GF-1 PCR Clean-up.

### **Penjujukan DNA**

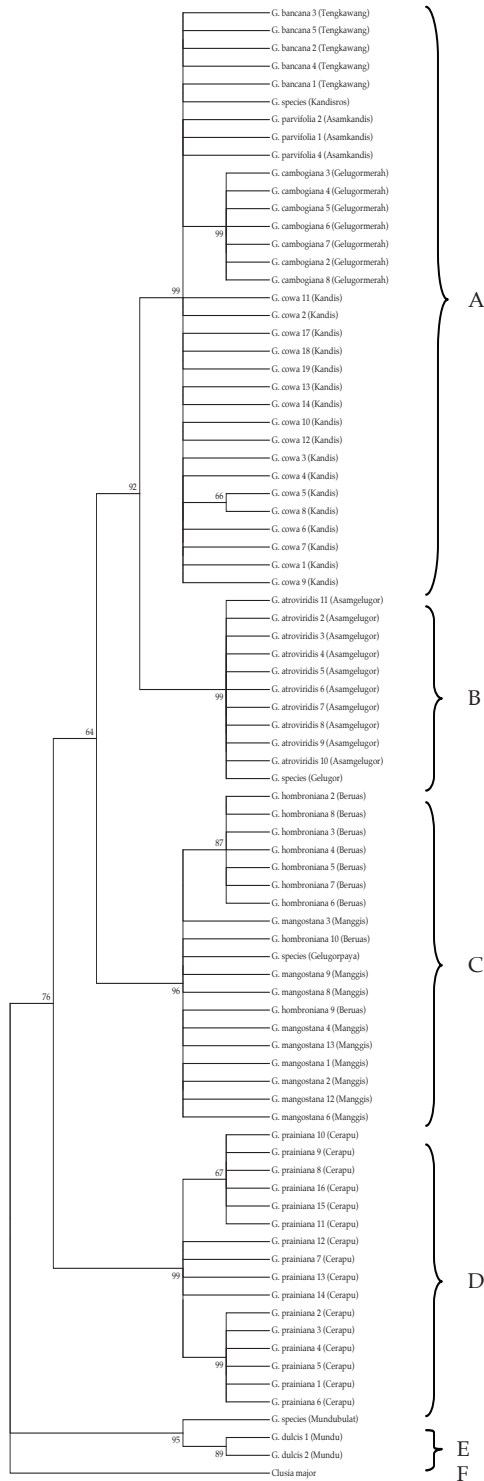
Produk PCR yang ditulenan akan diproses untuk penjujukan bagi kedua-dua arah iaitu hadapan dan bertentangan. Kedua-dua jujukan DNA ini diproses untuk mendapatkan jujukan penuh DNA dan dianalisis menggunakan program *Molecular Evolutionary Genetic Analysis* (MEGA 7). Selain itu, jujukan penuh DNA ini juga diperiksa menggunakan aplikasi BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) yang terdapat di laman sesawang *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI) untuk menentukan identiti kesamaan jujukan. Analisis filogenetik juga dijalankan ke atas jujukan penuh DNA menggunakan tiga algoritma iaitu *Neighbor-joining* (NJ), *Maximum Parsimony* (MP) dan *Maximum Likelihood* (ML).

### **Analisis pohon filogeni**

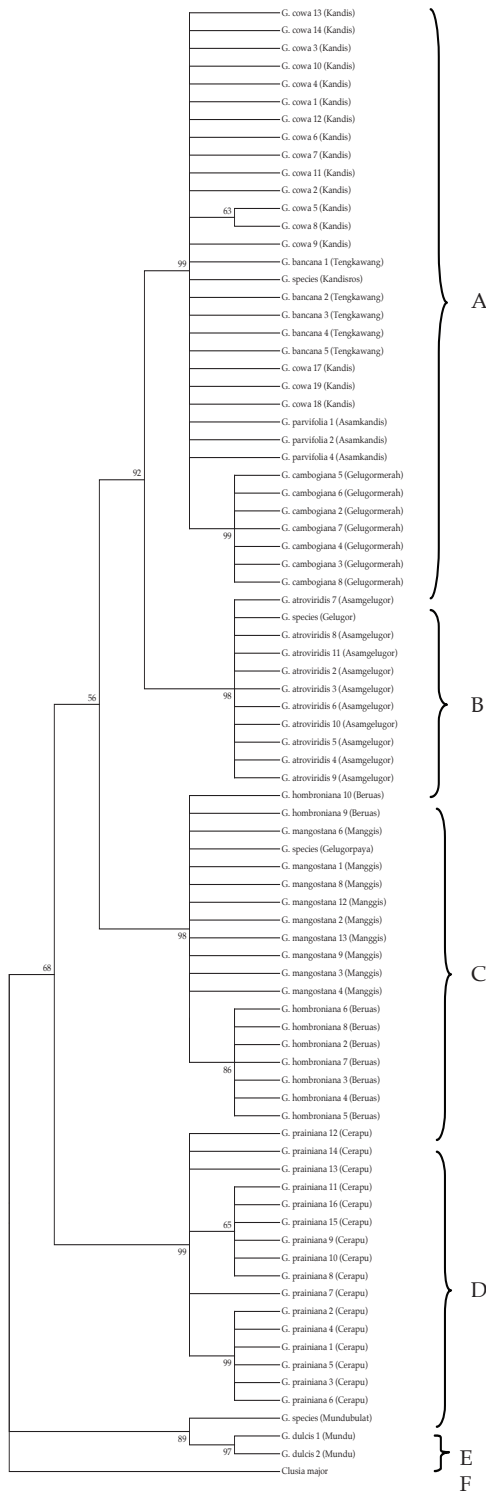
Hasil pemeriksaan jujukan penuh DNA menggunakan BLAST mendapati kesemua 82 sampel mempunyai nilai kesamaan yang tinggi (95 – 99%) dengan jujukan lain spesies *Garcinia* yang terdapat di dalam pangkalan data NCBI. Ini menunjukkan bahawa kesemua sampel termasuk empat aksesori iaitu kandis ros, gelugur, gelugur paya dan munda bulat tergolong dalam genus *Garcinia*. Pohon filogenetik bagi 82 aksesori *Garcinia* juga telah berjaya dihasilkan menggunakan tiga jenis algoritma iaitu *Neighbor-joining* (NJ), *Maximum Likelihood* (ML) dan *Maximum Parsimony* (MP) dengan *Clusia major* (GenBank: HQ331581.1) sebagai kumpulan luar (*Rajah 1 – 3*). Berdasarkan topologi pepohon filogenetik yang diperolehi, adalah amat jelas dan nyata kesemua 82 aksesori *Garcinia* ini dapat dipecahkan kepada



Rajah 1. Pohon filogenetik menggunakan algoritma Neighbor-joining menunjukkan hubungan 82 akses *Garcinia* berdasarkan jujukan matK dengan *Clusia major* sebagai kumpulan luar



Rajah 2. Pohon filogenetik menggunakan algoritma Maximum Parsimony menunjukkan hubungan 82 aksesi *Garcinia* berdasarkan jujukan matK dengan *Clusia major* sebagai kumpulan luar



Rajah 3. Pohon filogenetik menggunakan algoritma Maximum-likelihood menunjukkan hubungan 82 aksesori *Garcinia* berdasarkan jujukan matK dengan *Clusia major* sebagai kumpulan luar

enam kluster utama iaitu A, B, C, D, E dan F. Kluster A terdiri daripada kandis, tengkawang, asam kandis, gelugur merah dan kandis ros. Manakala, kluster B pula ialah asam gelugur dan gelugur. Manggis, beruas dan gelugur paya pula tergolong dalam kluster C. Kluster D hanya terdiri daripada cerapu. Kluster E mempunyai tiga aksesori sahaja iaitu dua aksesori munda dan satu aksesori munda bulat. Kluster yang terakhir atau kluster F ialah *Clusia major* yang digunakan sebagai kumpulan luar untuk analisis filogenetik spesies *Garcinia* ini. Maka, 82 aksesori *Garcinia* telah berjaya diletakkan dalam kluster yang dihasilkan mengikut nama spesies yang diberikan. Aksesori yang dinamakan sebagai kandis ros, gelugur, gelugur paya dan munda bulat juga telah berjaya dihimpunkan di dalam kluster yang berbeza dan terpisah antara satu sama lain. Oleh itu, empat aksesori ini mempunyai hubungan genetik yang lebih rapat dengan ahli kluster tersebut berdasarkan pohon filogenetik yang dibina.

Konsortium Kod Bar Kehidupan (*The Consortium for the Barcode of Life*) telah mengesyorkan dua lokusi iaitu *rbcL* dan *matK* sebagai kod bar teras untuk projek pengekodan tumbuhan darat. Hasil kajian menunjukkan bahawa penanda *matK* amat efisien untuk mengenalpasti dan mengklasifikasi spesies *Garcinia*. Penanda *matK* telah dipilih kerana mempunyai faktor diskriminasi yang tinggi, daya pemulihan yang konsisten dan kualiti jujukan yang sempurna. Oleh itu, penanda *matK* selalu digunakan sebagai penanda dalam kajian filogenetik bagi mengenal pasti dan pengelasan tumbuhan.

Mengikut rekod saintifik, terdapat 49 spesies yang terdapat di Malaysia. Namun, kajian ini hanya melibatkan sembilan spesies sahaja yang diperolehi di bank gen ladang. Oleh itu, masih ada spesies *Garcinia* yang tidak dapat dikumpulkan, belum dijumpai di dalam hutan atau kemungkinan sudah pupus. Sebanyak 21 spesies *Garcinia* telah dikategori sebagai terancam, rentan dan berisiko dalam senarai merah (*Red list*) oleh *International Union for Conservation of Nature*. Oleh itu, amat penting agar spesies *Garcinia* terutamanya spesies liar ini dinilai dan dipelihara untuk kegunaan generasi akan datang. Kemungkinan besar spesies liar ini mempunyai maklumat atau ciri khusus yang dapat digunakan dalam proses pembiakbakaan manggis seperti rintang terhadap penyakit atau perosak.

### **Kesimpulan**

Penanda *matK* berjaya mengenal pasti dan mengelaskan 82 aksesori *Garcinia* kepada enam kluster utama (A, B, C, D, E dan F) mengikut nama spesies masing-masing. Sehubungan itu, penanda *matK* ini amat berupaya dan mempunyai kemampuan yang tinggi untuk menyelesaikan hubungan evolusi dan genetik pada tumbuhan pada semua peringkat taksonomi termasuk spesies *Garcinia*.



## Bibliografi

- Abdullah, N. (2012). Molecular evidence in identifying parents of *Garcinia mangostana* L. *Pertanika J. Trop. Agric.* 35(2): 257 – 270
- Doyle, J. dan Doyle, J. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13 – 15
- Hollingsworth, P.M., Graham, S.W. dan Little, D.P. (2011). Choosing and using a plant DNA barcode. *PLoS ONE* 6(5)
- IUCN (2020). The IUCN Red List of Threatened Species Version 2016-3. Diambil dari [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)
- Knebelberger, T. dan Stöger, I., 2012. DNA Barcodes. , 858, pp.311–338. Diambil dari <http://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-591-6>.
- Liu, Z., Ni, Y. dan Liu, B.O. (2016). Genetic Relationships of Several *Garcinia* Species (Clusiaceae) Revealed by ITS Sequence Data. m.s. 11 – 15
- Nazre, M. (2014). New evidence on the origin of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) based on morphology and ITS sequence. *Genetic Resources and Crop Evolution*
- Yapwattanaphun, C. (2004). Phylogenetic relationship of mangosteen (*Garcinia mangostana*) and several wild relatives (*Garcinia* spp.) revealed by ITS sequence data. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 129 (3): 368 – 373

## Ringkasan

Genus *Garcinia* merupakan spesies penting yang terdapat di beberapa jenis habitat dari laman rumah, kebun sehingga bukit tinggi / gunung dan hutan belantara. Manggis (*Garcinia mangostana*) ialah spesies paling popular kerana boleh dimakan dan ditanam secara komersial. Kajian ini bertujuan untuk mengenal pasti hubungan genetik spesies liar *Garcinia* dan yang ditanam di bank gen ladang menggunakan kawasan kod plastid iaitu *Maturase K gene (matK)*. Gen *matK* telah disyorkan sebagai teras kod bar untuk projek pengkodan tumbuhan darat oleh CBOL untuk pengenalpastian spesies. Teknik ini amat dipercayai dan tidak bergantung kepada faktor luaran seperti iklim, umur atau bahagian tumbuhan. Keputusan menunjukkan 82 jujukan spesies *Garcinia* mempunyai kesamaan kepada spesies *Garcinia* dalam pangkalan data NCBI. Pohon filogenetik berdasarkan jujukan *matK* juga telah berjaya dibina menggunakan tiga algoritma *Neighbor-Joining* (NJ), *Maximum Parsimony* (MP) dan *Maximum Likelihood* dengan *Clusia major* sebagai kumpulan luar. Enam kluster utama iaitu A, B, C, D, E dan F telah dibina untuk menunjukkan hubungan genetik 82 akses *Garcinia* termasuk kerabat liar. Kepelbagaian inter dan intra yang tinggi ditunjukkan oleh akses *Garcinia* ini dapat digunakan secara efektif untuk menambah baik pemuliharaan spesies *Garcinia* secara in situ.

## Summary

The genus *Garcinia* is considered as an important species which can be found in Malaysia from a wide range of habitats, from home gardens or orchards to the high hills / mountains and deep inside of wild forest. Mangosteen (*Garcinia mangostana*) is the most well-known edible fruit species and popular in the genus of *Garcinia* and they have been cultivated commercially. This study aims to identify and investigate the genetic relationship of selected wild and cultivated *Garcinia* species available in the field genebank using plastid coding region, Maturase K gene (*matK*). *MatK* gene was recommended for core-barcode on barcoding project on land plants by CBOL Plant Working Group for species identification. This technique is reliable and is not affected by external factors such as climates, age, or plant part. Results showed that all 82 sequences of *Garcinia* species

on *matK* regions were similar to other *Garcinia* species based on BLAST's screening on NCBI website. Phylogenetic tree based on *matK* sequences was constructed using three algorithms, Neighbor-Joining (NJ), Maximum Parsimony (MP) and Maximum Likelihood method with *Clusia major* as an outgroup. Six main clades, A, B, C, D, E and F were generated to show the genetic relationship of 81 accessions of wild and cultivated *Garcinia* species. The high level of inter and intra specific variations displayed within the *Garcinia* accessions and its wild relatives obtained in this study could be effectively used in order to improve the *in situ* conservation of *Garcinia* species.

**Pengarang**

Zulhairil Ariffin

Pusat Penyelidikan Agrobiodiversiti dan Persekitaran

Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM

43400 Serdang, Selangor

E-mel: hairi@mardi.gov.my

Azuan Amron dan Nuradni Hashim

Pusat Penyelidikan Agrobiodiversiti dan Persekitaran

Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM

43400 Serdang, Selangor