

Pembaikbakaan berbantuan penanda molekul dalam menambah baik kerintangan varieti MR 219 terhadap penyakit karah padi

(Marker assisted breeding for improvement of MR 219 resistance against blast disease)

Mohd Shahril Firdaus Ab Razak, Muhammad Bahagia Ab Ghaffar, Siti Norsuha Misman, Siti Norhayati Ismail, Muhammad Fairuz Mohd Yusof dan Nor Helwa Ezzah Nor Azman

Pengenalan

Padi merupakan tanaman makanan terpenting di dunia. Lebih satu pertiga daripada populasi dunia bergantung kepada padi sebagai sumber makanan utama. Unjuran statistik di Malaysia menunjukkan penggunaan beras dijangka meningkat daripada 2.30 juta tan metrik pada tahun 2010 kepada 2.69 juta tan metrik pada tahun 2020 iaitu pertumbuhan sebanyak 1.6% setahun selaras dengan pertambahan penduduk. Manakala, pengeluaran padi dijangka meningkat daripada 2.55 juta tan metrik pada tahun 2010 kepada 2.91 juta tan metrik pada tahun 2020 iaitu dengan pertumbuhan sebanyak 1.3% setahun. Bagi memastikan pengeluaran padi dapat menampung populasi negara, penyelidikan yang mampan berkaitan padi perlu dijalankan terutamanya dalam bidang pembaikbakaan padi bagi menghasilkan varieti superior yang berhasil tinggi dan rintang serta tahan terhadap serangan penyakit, perosak dan cuaca ekstrim.

Tekanan biotik seperti serangan penyakit dan serangga perosak merupakan salah satu faktor yang mengehadkan pengeluaran padi negara. Penyakit karah padi merupakan salah satu tekanan biotik utama yang menyerang pokok padi. Penyakit ini disebabkan oleh fungus *Magnaporthe oryzae* yang boleh menyerang tanaman padi hampir pada semua peringkat pertumbuhan padi. Oleh itu, adalah amat penting masalah ini dapat dikawal bagi memastikan isu jaminan keselamatan makanan negara ditangani. Kaedah yang terbaik dalam menangani masalah ini adalah dengan menanam varieti padi yang rintang terhadap penyakit karah. Pembaikbakaan berbantuan penanda molekul (MAB) merupakan kaedah terbaik untuk membangunkan varieti yang rintang terhadap penyakit karah.

Sehingga kini, lebih daripada 100 gen R (*Resistance gene*) dan lebih daripada 350 QTL (*lokus trait kuantitatif*) bagi ciri kerintangan terhadap penyakit karah padi telah dikenal pasti. Daripada itu, sebanyak 27 gen telah diklon dan dicirikan. Dalam kajian ini, gen Pi9 yang telah dipetakan pada kromosom 6 dalam genom padi akan dipindahkan daripada varieti penderma, IRTP21683 ke dalam genom induk penerima MR 219 menggunakan salah satu pendekatan MAB iaitu kacuk balik berbantuan penanda molekul

(MABC). Kaedah ini sangat sesuai untuk menambah baik varieti komersial yang kekurangan gen tertentu dengan memasukkan gen tersebut (*introgression*) ke dalam varieti komersial daripada induk penderma. Kaedah ini akan mempercepatkan proses pemuliharaan genom induk rekuren (*recurrent*) dalam progeni. Melalui kaedah ini, pembaik baka dapat mengenal pasti progeni yang mempunyai persamaan genom yang paling tinggi dengan induk kacuk balik. Hanya individu yang mempunyai peratusan persamaan genom yang paling tinggi dan mempunyai gen kerintangan karah sahaja yang akan dikacuk balik dengan induk kacuk balik. Proses ini berulang sehingga BC2 atau BC3 sebelum dikacuk dalam bagi memperoleh progeni yang stabil dan seragam.

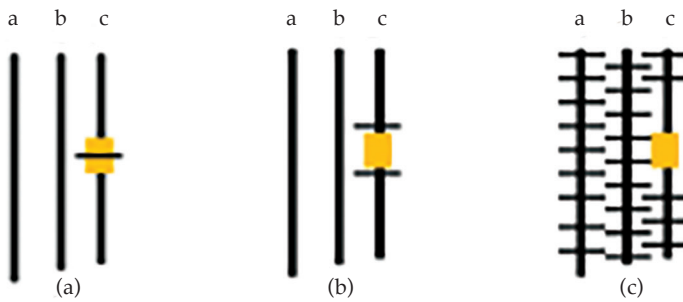
Keperluan teknologi MAB dalam membangunkan varieti yang rintang terhadap karah

Pembaikbakaan berbantuan penanda molekul merujuk kepada aplikasi penanda molekul dalam menambah baik tumbuhan dengan bantuan asai penganotipan. Penganotipan merupakan proses penentuan alel setiap progeni yang diuji. Terma pembaikbakaan berbantuan penanda molekul kerap kali diguna pakai dalam menggambarkan strategi pembaikbakaan moden seperti pemilihan berbantuan penanda molekul (MAS) dan kacuk balik berbantuan penanda molekul (MABC). Namun begitu, beberapa perkara perlu dititikberatkan bagi menjamin program pembaikbakaan berbantuan penanda molekul yang efisien:

Kesesuaian dan kebolehbergantungan penanda molekul yang digunakan

Perkara yang paling penting dalam menjalankan MAB adalah kesesuaian dan kebolehbergantungan sesuatu penanda molekul itu untuk diaplikasikan dalam program pembaikbakaan. Penanda molekul tersebut mestilah berada sangat rapat pada gen/lokus trait kuantitatif (QTL) yang dikehendaki. Sekiranya penanda molekul tersebut terletak jauh daripada gen/QTL [>2 centiMorgan (cM)], proses pemilihan berkemungkinan akan terarah kepada pemilihan yang tidak tepat atau positif palsu kerana rekombinasi antara penanda molekul dengan gen/QTL tersebut adalah sangat tinggi. Secara umumnya, penanda dalam MAB boleh dikategorikan kepada tiga (*Rajah 1*) iaitu:

- i) Penanda molekul latar depan/berfungsi
Penanda ini sangat rapat atau wujud di dalam kawasan gen/QTL yang mana proses genotip akan mengesan secara langsung polimorfisme berfungsi iaitu polimorfisme pada penanda itu yang mengawal sesuatu ciri. Dalam kajian ini, penanda berfungsi gen Pi9 iaitu Pi9Prom telah digunakan. Penanda ini digunakan dalam pemilihan latar hadapan [*Foreground selection (FS)*] bagi mengenal pasti progeni yang membawa gen kerintangan Pi9.



Rajah 1. (a) Penanda berfungsi, (b) Penanda pengapit dan (c) Penanda latar belakang pada tiga kromosom/kumpulan rantaian. Kawasan kuning merupakan kedudukan relatif gen yang disasarkan

ii) Penanda pengapit

Penanda ini wujud di kawasan hulu dan hiliran gen/QTLs. Untuk meningkatkan kadar efisien aktiviti MAB, penanda pengapit hendaklah berjarak kurang daripada 5 cm. Penggunaan penanda pengapit yang rapat dan berdekatan dengan gen/QTL yang dikehendaki juga boleh mengurangkan fenomena *linkage drag*. Fenomena ini merujuk kepada gen lain yang tidak dikehendaki yang berada bersebelahan dengan gen yang disasarkan. Penanda pengapit ini digunakan untuk pemilihan rekombinasi [*Recombinant selection (RS)*].

iii) Penanda latar belakang

Penanda latar belakang adalah penanda yang berada selain daripada kawasan gen yang disasarkan. Penanda ini bertujuan untuk menilai dan mentaksir genom daripada induk penerima. Penanda ini digunakan dalam pemilihan latar belakang [*Background selection (BS)*].

Pengekstrakan dan penentuan bertruput tinggi

Program pembaikan selalunya menghasilkan ratusan atau ribuan progeni untuk disaring dengan menggunakan penanda molekul. Jadi, teknologi yang bertruput tinggi untuk pengekstrakan DNA dan penentuan. Makmal CMDV mempunyai kemampuan untuk mengekstrak 1,000 sampel bagi setiap kelompok. Di samping itu, makmal CMDV juga dilengkapi dengan peralatan penentuan bertruput tinggi seperti ABI3730 x 1 bagi penentuan SSR dan AFLP dan Agena MassArray dan Illumina Iscan bagi penentuan SNP berskala besar.

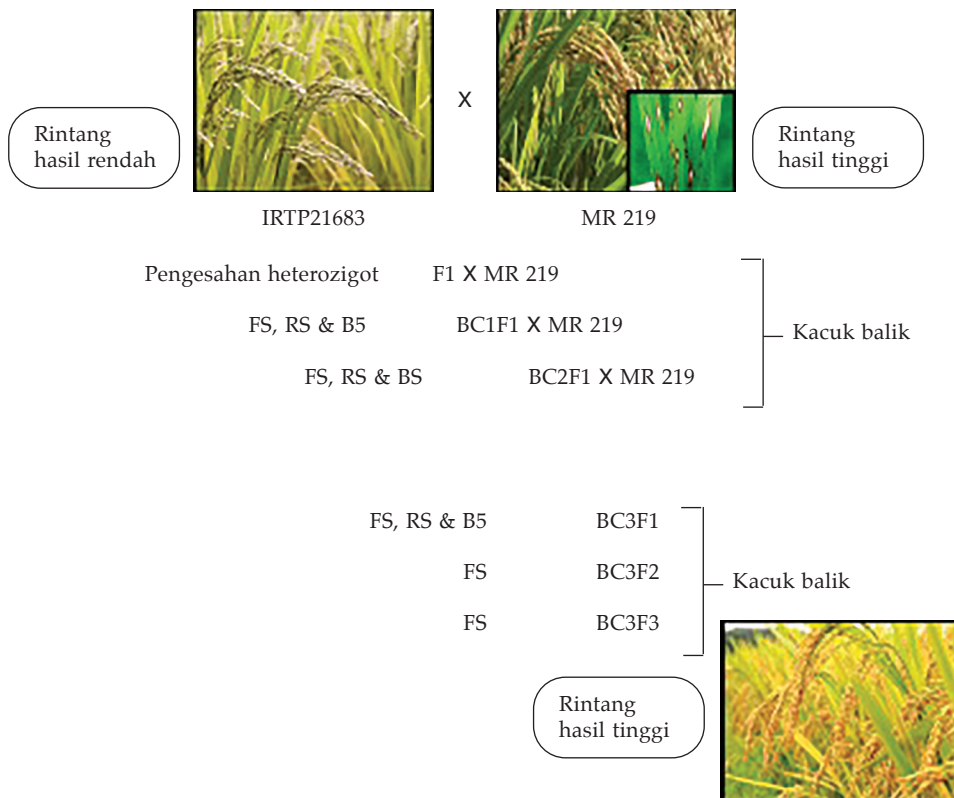
Pengetahuan berkaitan asosiasi penanda:trait

Kejituan dan ketepatan proses pemilihan dalam program pembaikan bergantung kepada pengetahuan atau maklumat perkaitan antara penanda dengan ciri yang dikehendaki. Hanya penanda yang sangat rapat dengan gen/QTL yang dikehendaki atau penanda berfungsi dapat menjamin kejayaan dalam MAB. Maklumat berkaitan penanda yang berkait dengan ciri yang dikehendaki dapat dilombong dan ditemui melalui beberapa

kaedah seperti peta rangkaian dan QTL, peta perkaitan atau *Genome Wide Association Studies* (GWAS), analisis segregasi pukal [*Bulk Segregant Analysis* (BSA)] dan banyak lagi. Set penanda perlu dipilih berdasarkan kedudukan relatifnya dengan kedudukan gen kerintangan yang disasarkan untuk diwarisi (*Rajah 2*).

Di MARDI, teknologi ini telah diaplikasi dalam menambah baik kerintangan terhadap penyakit karah bagi varieti komersial MR 219. Varieti MR 219 merupakan varieti komersial yang berhasil tinggi tapi rentan terhadap isolat karah terkini. Bagi menambah baik varieti, gen kerintangan karah, Pi9 daripada induk IRTP21683 akan dimasukkan ke dalam progeni hasil kacukan dan kacuk balik dengan varieti MR 219. *Rajah 3* merupakan skema MAB yang diaplikasi dalam kajian ini.

Dalam pendekatan ini, hanya progeni yang mempunyai persamaan genom yang tertinggi dengan induk rekuren sahaja yang akan dikacuk balik dengan induk rekuren bagi mempercepatkan pemulihan genom induk rekuren dalam komposisi genetik progeni. Secara tidak langsung, ini dapat mempercepatkan proses pembaikbakaan. Titisan BC1F1 dan BC2F1 yang mempunyai persamaan genom yang tinggi dengan genom MR 219 telah digunakan untuk dikacuk balik dengan induk MR 219 untuk mempercepatkan proses pemulihan genom titisan

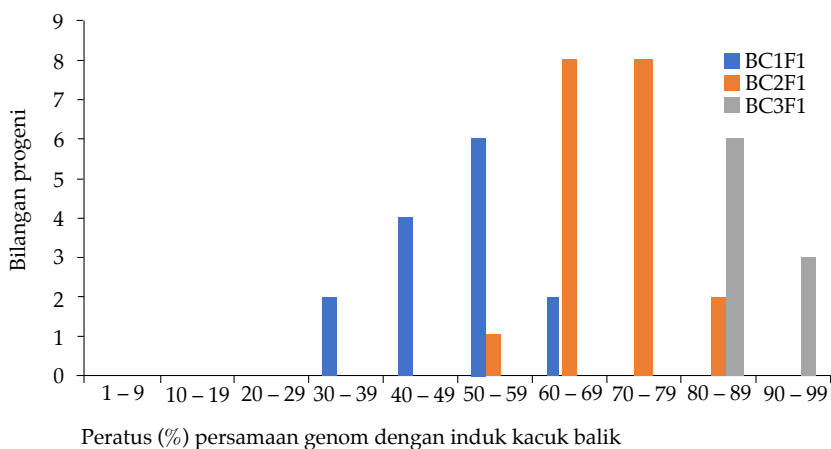


Rajah 2. Program kacuk balik berbantuan penanda molekul yang telah diaplikasi dalam mengintrogesi gen kerintangan Pi9 ke dalam varieti komersial

yang dihasilkan. Manakala, bagi titisan BC3F1, individu yang menunjukkan persamaan yang tinggi dengan genom MR 219 akan dikacuk dalam sehingga memperoleh BC3F3. Analisis penanda latar belakang menunjukkan peratusan persamaan dengan induk rekuren berjalat daripada 33.3 – 63.3% bagi populasi BC1F1, 58.0 – 89.1% bagi populasi BC2F1 dan 80.4 – 97.1% bagi populasi BC3F1 (Rajah 3).

Penilaian awal ciri hasil dan morfologi juga menunjukkan titisan termaju MR 219-Pi9 berjaya memulihkan ciri dan karakter morfologi dengan potensi hasil daripada 6.5 – 8.0 t/ha. Ciri hasil dan morfologi bagi titisan termaju MR 219-Pi9 tidak menunjukkan perbezaan yang signifikan dengan ciri MR 219 kecuali pada ciri kerintangan terhadap penyakit karah. Hasil kajian ini menunjukkan kacuk balik berbantuan penanda molekul merupakan satu kaedah yang efektif dan efisien dalam menambah baik varieti sedia ada melalui intrograsi gen yang dikehendaki dalam induk rekuren. Sehingga kini, beberapa kajian telah mengaplikasikan kacuk balik berbantuan penanda molekul dalam menambah baik varieti bagi ciri ketahanan terhadap banjir, kerintangan terhadap penyakit karah, hawar daun bakteria dan banyak lagi.

Kelebihan teknologi MAB dalam aktiviti pembaikbakaan teknologi MAB menawarkan satu teknologi yang lebih tepat, efisien dan efektif semasa proses pemilihan progeneri yang mewarisi gen kerintangan terhadap karah berbanding dengan kaedah konvensional yang mana mungkin pemilihan dipengaruhi oleh faktor persekitaran. Proses pemilihan juga dapat dijalankan walaupun pokok masih di peringkat anak pokok. Hanya pokok yang mempunyai gen yang dikehendaki sahaja akan dipilih dan ditanam, manakala pokok yang tidak mempunyai gen yang dikehendaki akan dibuang. Jadi secara tidak langsung, kos penanaman seperti tenaga buruh, keluasan penanaman, baja dan racun serangga perosak dan yang berkaitan akan berkurang.



Rajah 3. Peratusan persamaan genom bagi individu bagi populasi BC1F1, BC2F1 dan BC3F1 dengan induk rekuren MR 219 yang diperolehi hasil kajian di MARDI

Melalui kaedah ini juga, pembaik baka dapat memilih ciri yang dikawal oleh gen resesif. Ciri yang dikawal oleh gen resesif tidak akan diekspresikan apabila progeneri dalam keadaan heterozigot. Progeneri yang dalam keadaan homozigot resesif sahaja akan mengekspresi ciri tersebut. Progeneri tersebut hanya dapat ditentukan melalui teknologi MAB sahaja.

Walaupun penyakit karah dalam padi yang mempunyai lebih daripada 100 gen kerintangan, namun ekspresi pokok terhadap inokulasi adalah sama iaitu lecur pada daun atau tangkai. Jadi pembaik baka tidak dapat mengenal pasti secara tepat gen yang beroperasi dalam kerintangan tersebut. Oleh itu, proses pemiramidan gen (*gene pyramiding*) dalam memastikan pokok tersebut lebih teguh dan tahan lama (*durable*) dari aspek kerintangan dapat dijalankan. Pemiramidan gen hanya dapat dijalankan dengan menggunakan teknologi pembaikbakaan berbantuan penanda molekul.

Kesimpulan

Sektor pertanian merupakan salah satu sektor penting dalam pembangunan ekonomi Malaysia. Seiring dengan peningkatan penduduk negara yang dijangka mencapai 32.4 juta pada tahun 2020, adalah amat penting untuk sektor pertanian negara dimajukan bagi meningkatkan pengeluaran hasil pertanian serta memastikan bekalan makanan negara adalah mencukupi dan tidak bergantung kepada sumber eksport. Antara strategi yang boleh diaplikasikan dalam meningkatkan produktiviti hasil pertanian negara adalah penggunaan kaedah moden seperti teknologi penanda molekul dalam program pembaikbakaan di Malaysia. Teknologi ini terbukti satu teknologi yang lebih tepat, efisien dan efektif semasa proses pemilihan berbanding dengan kaedah pembaikbakaan konvensional.

Penghargaan

Penulis ingin mengucapkan jutaan terima kasih kepada kerajaan Malaysia kerana memberi peruntukan bawah NKEA EPP14- Pembangunan industri benih. Penulis juga ingin mengucapkan terima kasih bagi sesiapa yang terlibat secara tidak langsung dalam menjayakan projek dan penulisan ini.

Bibliografi

- Chen, X., Jia, Y., Jia, M.H., Pinson, S.R., Wang, X. dan Wu, B.M. (2018). Functional interactions between major rice blast resistance genes, *pi-ta* and *pi-b*, and minor blast resistance quantitative trait loci. *Phytopathology* 108(9): 1,095 – 1,103
- Dasar Agromakanan Negara 2010 – 2020, Kementerian Pertanian dan Industri Asas Tani
- Hasan, M.M., Rafii, M.Y., Ismail, M.R., Mahmood, M., Rahim, H.A., Alam, M.A., Ashkani, S., Malek, M.A. dan Latif, M.A. (2015). Marker-assisted backcrossing: a useful method for rice improvement. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 29(2): 237 – 254

- Liu, G., Lu, G., Zeng, L. dan Wang, G.L. (2002). Two broad-spectrum blast resistance genes, Pi9 (t) and Pi2 (t), are physically linked on rice chromosome 6. *Molecular Genetics and Genomics* 267(4): 472 – 480
- Miah, G., Rafii, M.Y., Ismail, M.R., Puteh, A.B., Rahim, H.A. dan Latif, M.A. (2015). Recurrent parent genome recovery analysis in a marker-assisted backcrossing program of rice (*Oryza sativa* L.). *Comptes Rendus Biologies* 338(2): 83 – 94
- Miah, G., Rafii, M.Y., Ismail, M.R., Puteh, A.B., Rahim, H.A., Islam, K. dan Latif, M.A. (2013). A review of microsatellite markers and their applications in rice breeding programs to improve blast disease resistance. *International Journal of Molecular Sciences* 14(11): 22,499 – 22,528
- Neeraja, C.N., Maghirang-Rodriguez, R., Pamplona, A., Heuer, S., Collard, B.C., Septiningsih, E.M., Vergara, G., Sanchez, D., Xu, K., Ismail, A.M. dan Mackill, D.J. (2007). A marker-assisted backcross approach for developing submergence-tolerant rice cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 115(6): 767 – 776
- Ribaut, J. M., de Vicente, M. C. dan Delannay, X. (2010). Molecular breeding in developing countries: challenges and perspectives. *Current Opinion in Plant Biology* 13(2): 213 – 218

Ringkasan

Penyakit karah padi yang disebabkan oleh *M. oryzae* merupakan salah satu penyakit utama yang telah menyebabkan pengurangan hasil pengeluaran padi. Penanaman varieti yang rintang terhadap penyakit karah merupakan kaedah yang terbaik dari segi persekitaran dan ekonomi bagi menangani masalah ini. Sehingga kini, lebih daripada 100 gen major yang rintang terhadap penyakit karah telah dikenal pasti. Kajian terdahulu mencadangkan bahawa induk yang membawa gen Pi9 menunjukkan kerintangan spektrum luas terhadap isolat *M. oryzae* di Malaysia. Tujuan kajian ini adalah untuk mengintrogresikan gen Pi9 daripada induk IRTP21683 ke dalam varieti komersial MR 219 yang rentan terhadap penyakit karah dengan menggunakan teknologi pembaikbakaan berbantuan penanda molekul. Teknologi MAB ini terbukti sebagai satu kaedah yang efektif dalam membangunkan varieti yang rintang terhadap tekanan biotik dan abiotik.

Summary

Blast disease caused by *M. oryzae* is one of the major rice diseases which result in significant yield losses. Cultivation of blast disease resistant rice variety proved to be the best approach to overcome this problem in term of environment and economic values. To date, more than 100 major blast resistant gene have been identified. Previous study suggested variety harbouring Pi9 gene showed broad spectrum resistant against Malaysian *M. oryzae* isolates. Present study aims to introgress Pi9 gene from IRTP21683 to commercial susceptible MR 219 using marker assisted breeding approach. This technology proved to be effective in developing biotic and abiotic tolerant rice variety.

Pengarang

Mohd Shahril Firdaus Ab Razak

Pusat Penyelidikan Bioteknologi dan Nanoteknologi, Ibu Pejabat MARDI
Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor

E-mel: shahrilf@mardi.gov.my

Muhammad Bahagia Ab Ghaffar

Pusat Penyelidikan Tanaman Industri, MARDI Seberang Perai
13200 Kepala Batas, Pulau Pinang

Siti Norsuha Misman

Pusat Penyelidikan Padi dan Beras, MARDI Seberang Perai
13200 Kepala Batas, Pulau Pinang

Siti Norhayati Ismail, Muhammad Fairuz Mohd Yusof dan
Nor Helwa Ezzah Nor Azman

Pusat Penyelidikan Bioteknologi dan Nanoteknologi, Ibu Pejabat MARDI
Persiaran MARDI-UPM 43400, Serdang, Selangor