

Pengenalpastian jujukan unik daripada gen kloroplas bagi penentuan dan pengesahan varieti durian premium terpilih

(Identification of unique sequence from chloroplast gene for the determination and validation of selected premium *durian*)

Mohammad Malek Faizal Azizi, Lau Han Yih, Norliza Abu Bakar dan Faridah Salam

Pengenalan

Durian merupakan buah terkenal di Asia Tenggara yang termasuk dalam genus *Durio* dan famili Malvaceae, khususnya famili Bombacaceae. Durian juga dikenali sebagai “raja buah” yang mempunyai ciri buah dengan kulit berduri tajam, rasa yang kuat dan bau yang unik. Antara 30 spesies genus durian, *D. zibethinus* adalah paling bernilai sebagai tanaman buah-buahan yang penting di Asia Tenggara. Negara Thailand merupakan negara yang mempunyai tahap kemampuan tinggi bagi menjadi pengeluar durian utama untuk pasaran eksport melebihi daripada 90% ke luar negara terutama di China semenjak tahun dahulu. Di Malaysia, tanaman durian adalah antara tanaman buah bermusim yang meliputi keluasan tanah yang besar di mana pada tahun 2019 seluas 70,286 hektar tanah ditanam dengan pengeluaran sebanyak 377,251 tan metrik durian (Laporan Statistik Tanaman Buah-buahan, Jabatan Pertanian Malaysia 2019). Durian juga mempunyai nilai ekonomi yang tinggi di mana ia telah masuk ke pasaran China dengan nilai import melebihi USD600 juta pada tahun 2016. Sehingga kini, Jabatan Pertanian Malaysia telah mendaftarkan lebih daripada 200 varieti durian yang mempunyai pelbagai ciri buah, rasa dan aroma. Perbezaan aroma pada varieti durian yang berbeza telah dikaji secara biokimia. Perbezaan ini telah dikenal pasti dengan kehadiran sebatian kompleks bau aktif termasuk volatil sulfur, ester, alkohol dan asid.

Harga bahan tanaman durian dan buah untuk varieti terpilih yang disyorkan oleh Jabatan Pertanian Malaysia dan MARDI kebiasaannya lebih tinggi berbanding dengan varieti-varieti lain. Hal ini menyebabkan permintaan untuk bahan tanaman durian yang telah disahkan tulen dan berkualiti mendapat permintaan yang tinggi. Pada masa kini, pengenalpastian varieti durian lazim dilakukan melalui penilaian ciri daun dan buah termasuk bentuk daun, bentuk buah dan warna isi. Malangnya, sesetengah varieti menunjukkan ciri-ciri morfologi yang hampir sama dan sukar dibezakan. Kaedah ini memerlukan individu terlatih untuk melakukan pemerhatian serta pengenalan morfologi. Selain itu, kaedah ini juga tidak boleh digunakan untuk membezakan isi durian daripada varieti berbeza, masalah ini berlaku apabila hanya isi durian sahaja dijual di dalam bekas. Oleh yang

demikian, dalam proses pengedaran, jaminan identiti kultur durian adalah penting.

Teknik pembaikbakaan tumbuhan memerlukan kepastian identiti varieti untuk mengelakkan kekeliruan. Pembaikbakaan durian melalui lintasan tiruan memerlukan usaha besar dan mengambil masa yang lama. Pengalaman penyelidikan pembaikbakaan di Malaysia dan Thailand menunjukkan bahawa proses pembaikbakaan mengambil masa sehingga 30 tahun untuk mendapatkan varieti baharu daripada setiap satu generasi pembaikbakaan. Bagi memendekkan tempoh pemilihan dan membuat perbelanjaan kos yang efektif dalam pembaikbakaan durian, adalah penting untuk mempunyai kaedah pengenalpastian varieti durian dalam proses pemilihan induk sewaktu penyelidikan pembiakan durian.

Dengan kemunculan teknologi DNA, masalah ini dapat diselesaikan. Penentuan identiti durian dapat dilakukan secara ideal dengan integrasi pencirian morfologi dan pencirian molekul. Oleh itu, penggunaan penanda molekul atau barkod DNA menjadi pilihan bagi membezakan identiti varieti. Dalam kajian ini, penanda molekul atau barkod DNA yang telah dikenal pasti akan diaplikasi dalam menentukan perbezaan 10 varieti durian terpilih iaitu MDUR88, Musang King, D24, D99, D145, D168, D175, D200, MDUR78 (D188) dan MDUR79 (D189) dengan menggunakan dua calon gen iaitu *nadhA* dan *PetB-PetD*.

Pencetus tindak balas berantai polimerase (PCR) untuk gen *nadhA* dan *PetB-PetD* direka berdasarkan jujukan gen daripada pangkalan data NCBI. Hasil penjujukan daripada produk PCR dianalisis untuk mengetahui kawasan unik setiap varieti durian sebagai barkod DNA. Barkod DNA yang mempunyai ketepatan pengenalpastian yang lebih tinggi dan masa penentuan yang lebih cepat adalah sangat penting diperlukan dalam menentukan genotip. Output projek yang diperolehi akan digunakan dalam penciptaan peranti biosensor DNA yang mudah alih dan pantas untuk mengenal pasti jenis durian.

Pengekstrakan DNA

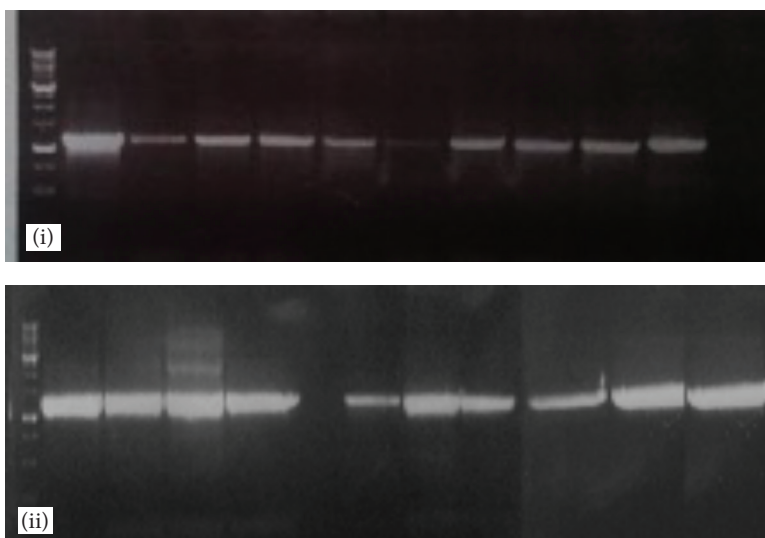
Tisu daun durian dikeringkan di dalam gel silika dan kemudian disimpan pada suhu $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tisu daun dikisar dengan menggunakan mesin pengisar. Pengekstrakan DNA dilakukan dengan menggunakan kit "Plant Genomic DNA" berdasarkan manual yang disediakan. Pencetus PCR *nadhA* dan *PetB-PetD* digunakan untuk menjalankan amplifikasi PCR pada keadaan yang diperincikan. Tindak balas PCR dengan isi padu berjumlah $25\text{ }\mu\text{l}$ yang mengandungi 30 ng templat DNA genomik, 1 X buffer PCR tanpa MgCl_2 , 2.0 mM MgCl_2 , 0.2 mM setiap dNTP, 0.1 mM setiap pencetus dan 1.0 U Taq DNA Polimerase dilakukan menggunakan mesin Biorad Thermal Cycler.

Penjujukan dan analisis DNA

Hasil produk PCR dijujuk daripada kedua-dua arah (5' dan 3') dengan menggunakan pencetus yang sama seperti digunakan dalam amplifikasi PCR. Hasil penjujukan dijajarkan dengan menggunakan program ClustalW2 untuk mengenal pasti kawasan unik gen setiap jenis durian kajian barkod DNA selanjutnya.

Hasil elektroforesis gel menunjukkan bahawa jalur DNA yang sepadan mempunyai saiz 1000 – 1500 bp untuk dua calon gen *ndhA* dan *PetB-PetD* (*Rajah 1*). Hasil keputusan kawasan unik gen dapat dikenal pasti dengan menggunakan dua calon gen *ndhA* dan *PetB-PetD* melalui perbandingan jujukan antara 10 varieti durian (MDUR88, Musang King, D24, D99, D145, D168, D175, D200, MDUR78 dan MDUR79) seperti dalam *Rajah 2*.

Barkod DNA sering digunakan sebagai piawai untuk mengenal pasti spesies tumbuhan. Jujukan DNA yang digunakan sebagai barkod berkesan harus mengandungi variasi yang mencukupi untuk pengenalpastian; mengandungi kawasan yang terpelihara dalam mereka bentuk pencetus universal serta cukup pendek untuk dijadikan jujukan dalam satu tindak balas. Bagi penentuan spesies haiwan pula, sebahagian daripada enzim pengoksidaan sitokrom C mitokondria I selalunya digunakan sebagai barkod umum dan juga digunakan dalam tujuan pengenalan forensik.



Rajah 1. Hasil keputusan PCR calon gen (i) nadhA (ii) PetB-PetD bagi jujukan berpotensi. Lajur 1: Penanda molekul 100 bp, lajur 2: Sampel MDUR88, lajur 3: Sampel D200, lajur 4: Sampel MDUR78, lajur 5: Sampel D145, lajur 6: Sampel D24, lajur 7: Sampel D99, lajur 8: Sampel D168, lajur 9: MDUR79, lajur 10: Sampel D175, lajur 11: Sampel MK

```

-----
1st_BASE_379261_888_IR      AAGATCAACCGTATNGAGTTTGGCTATCCCTTGTATAGANTTC----- 154
1st_BASE_3792679_RK_IR     AAGATCAACCGTATNGAGTTTGGCTATCCCTTGTATAGANTTC CCGTATAGANTGAGTT 179
1st_BASE_3792675_M079_IR   AAGATCAACCGTATNGAGTTTGGCTATCCCTTGTATAGANTTC----- 154
1st_BASE_3792675_B175_IR_M08 AAGATCAACCGTATNGAGTTTGGCTATCCCTTGTATAGANTTC----- 154
1st_BASE_3792685_M078_IR   AAGATCAACCGTATNGAGTTTGGCTATCCCTTGTATAGANTTC----- 155
1st_BASE_3792681_B209_IR   AAGATCAACCGTATNGAGTTTGGCTATCCCTTGTATAGANTTC----- 155
1st_BASE_3792688_B24_IR    AAGATCAACCGTATNGAGTTTGGCTATCCCTTGTATAGANTTC----- 154
1st_BASE_3792687_B145_IR   AAGATCAACCGTATNGAGTTTGGCTATCCCTTGTATAGANTTC----- 155
1st_BASE_3792675_B148_IR   AAGATCAACCGTATNGAGTTTGGCTATCCCTTGTATAGANTTC----- 154
1st_BASE_3792677_B99_IR    AAGATCAACCGTATNGAGTTTGGCTATCCCTTGTATAGANTTC----- 153
*****

```

(i)

```

1st_BASE_3781725_D99_PET_F  TTATCTTAAAGTTTAAAMAACCTTCTCTTCTCGCCACCCCGGTTTATATATAT 658
1st_BASE_3781729_D208a_PET_F TTATCTRAAAMAMAMAAATCTTCTCTTCTCGCCACCCCGGTTTATATATAT 652
1st_BASE_3781721_M078a_PET_F TTATCTTAAATATNAAMAATCTTCTCTTCTCGCCACCCCGGTTTATATATAT 649
1st_BASE_3781727_B168_PET_F TTATCTTAAAMAMAMAAATCTTCTCTTCTCGCCACCCCGGTTTATATATAT 659
1st_BASE_3781729_RK_PET_F   TTATCTRAAATATNAAMAACCTTCTCTTCTCGCCACCCCGGTTTATATATAT 651
1st_BASE_3781731_B175_PET_F TTATCTRAAAGTATNAAMAATCTTCTCTTCTCGCCACCCCGGTTTATATATAT 655
1st_BASE_3781729_M079_PET_F TTATCTRAAATATNAAMAACCTTCTCTTCTCGCCACCCCGGTTTATATATAT 658
1st_BASE_3781727_B889_PET_F TTATCTRAAATATNAAMAACCTTCTCTTCTCGCCACCCCGGTTTATATATAT 655
1st_BASE_3781729_B145_PET_F TTATCTRAAATTTTNAAMAATCTTCTCTTCTCGCCACCCCGGTTTATATATAT 658
*****

```

(ii)

Rajah 2. Hasil jujukan yang menunjukkan kawasan unik gen bagi kedua-dua calon gen (i) *nadhA* (ii) *PetB-PetD*

Kesimpulan

Barkod DNA yang bersaiz 1000 – 1500 bp telah berjaya diamplifikasi dan dijujukkan daripada 10 varieti durian dengan menggunakan pencetus PCR *nadhA* dan *PetB-PetD*. Hasil penjajaran jujukan DNA menunjukkan bahawa kedua-dua calon gen *nadhA* dan *PetB-PetD* ini mempunyai potensi yang baik dalam membezakan varieti durian melalui perbezaan nukleotid pada kawasan jujukan DNA unik yang dikenal pasti.

Penghargaan

Kajian ini dibiayai oleh projek PRB 405, Geran Pembangunan MARDI.

Bibliografi

- Abidin, M.Z., Mohammad, A.G., Shamsudin, M.O., Masdek, N.H.N. dan Ghazali, N.M. (2000). Klon durian berpotensi untuk alaf baru. Dalam: Prosiding Seminar Durian m.s. 1 – 3
- Baswarsiati, Y., Suhardi, H., Rahmawati, D. dan Soegiyarto, M. (2007). *Characterization of some properties of durian germplasm in Kediri District*. Assessment Institute for Agricultural Technology (BPTP), East Java Province. Surabaya
- Bruni, I., De Mattia, F., Galimberti, A., Galasso, G., Banfi, E., Casiraghi, M. dan Labra, M. (2010). Identification of poisonous plants by DNA barcoding approach. *International Journal of Legal Medicine* 124(6): 595 – 603
- Chase, M.W., Salamin, N., Wilkinson, M., Dunwell, J.M., Kesanakurthi, R.P., Haidar, N., dan Savolainen, V. (2005). Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360(1462): 1889 – 1895
- Chin, S.T., Nazimah, S.A.H., Quek, S.Y., Man, Y.C., Rahman, R.A. dan Hashim, D.M. (2007). Analysis of volatile compounds from Malaysian durians (*Durio zibethinus*) using headspace SPME coupled to fast GC-MS. *Journal of Food Composition and Analysis* 20(1): 31 – 44

- Fazekas, A.J., Burgess, K.S., Kesanakurti, P.R., Graham, S.W., Newmaster, S.G., Husband, B.C., et al. (2008). Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. *PLoS one* 3(7)
- Ferri, G., Alu, M., Corradini, B., Licata, M. dan Beduschi, G. (2009). Species identification through DNA "barcodes". *Genetic testing and molecular biomarkers* 13(3): 421 – 426
- Jaswir, I., Che Man, Y. B., Selamat, J., Ahmad, F. dan Sugisawa, H. (2008). Retention of volatile components of durian fruit leather during processing and storage. *Journal of food processing and preservation* 32(5): 740 – 750
- Kress, W.J., García-Robledo, C., Uriarte, M. dan Erickson, D.L. (2015). DNA barcodes for ecology, evolution, and conservation. *Trends in ecology and evolution* 30(1): 25 – 35
- Morton, J.F. dan Dowling, C.F. (1987). *Fruits of warm climates* (Vol. 20534). Miami, FL: JF Morton
- Siriphanich, J. (2011). Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits (woodhead publishing limited)
- Somsri, S., Vichitrananda, S., Kengkat, P., Koonjanthuk, P., Chunchim, S., Sesuma, S., et al. (2008). Three decades of durian breeding program in Thailand and its three newly recommended F1 hybrids. *Acta horticulturae*
- Statistik Tanaman Buah-buahan (2019). Diperoleh dari http://www.doa.gov.my/index/resources/aktiviti_sumber/sumber_awam/maklumat_pertanian/perangkaan_tanaman/perangkaan_buah_2019.pdf
- UN Trade Statistics. Diperoleh dari <http://unstats.un.org/>

Ringkasan

Durian merupakan buah tropika bermusim di mana Malaysia merupakan salah satu negara Asia timur yang mempunyai lebih daripada 100 varieti durian yang ditanam untuk pasaran tempatan dan juga eksport. Dari pelbagai varieti ini, terdapat sebahagian varieti yang menjadi pilihan atas faktor keenakan, isi, aroma dan tekstur buahnya. Varieti kelas premium ini yang antaranya terdiri daripada Musang King dan MDUR88 merupakan varieti premium untuk ditanam selain mempunyai permintaan tinggi daripada penggemar durian. Ini menjadikan harganya lebih tinggi di pasaran sama ada dalam bentuk anak pokok untuk dijadikan sebagai bahan tanaman ataupun sebagai hasil segar. Walau bagaimanapun, pengenalanpastian varieti durian boleh menjadi masalah disebabkan penilaian varieti ini kebanyakannya dilakukan berdasarkan bentuk daun, bentuk buah, aroma, rasa dan bentuk biji benih. Selain itu, beberapa jenis varieti durian menunjukkan persamaan ciri-ciri morfologi yang sukar untuk dibezakan dan dikenal pasti terutamanya dalam bentuk anak pokok. Di samping itu, identiti varieti durian yang hendak dikacuk perlu dikenal pasti terlebih dahulu bagi mengelakkan kekeliruan dan tersalah kacuk. Dengan menggunakan kaedah teknologi DNA, proses pengenalanpastian identiti varieti durian dapat ditentukan dengan lebih spesifik dan mudah. Dalam kajian ini, penanda molekul atau barkod DNA dikenal pasti dan akan diaplikasi dalam menentukan perbezaan 10 varieti durian terpilih iaitu MDUR88, Musang King, D24, D99, D145, D168, D175, D200, MDUR78 dan MDUR79 dengan menggunakan dua calon gen iaitu *nadhA* dan *PetB-PetD*. Daripada hasil keputusan yang diperolehi, dua calon gen ini yang telah dikenal pasti menunjukkan potensi untuk digunakan dalam membezakan dan menentusahkan identiti 10 varieti durian melalui perbezaan nukleotid menerusi penjajaran jujukan DNA. Hasil kajian ini telah menyokong penggunaan penanda molekul atau barkod DNA yang telah dibangunkan ini untuk kajian selanjutnya bagi mengenal pasti dan menentukan varieti durian.

Summary

Durian is a seasonal tropical fruit where Malaysia is one of the east Asian countries that consists of more than 100 varieties of *durian* grown for local and export markets. Of these various varieties, there are several varieties that are selected due to the taste, content, aroma and texture of the fruit. This premium class variety which consists of Musang King and D88 is a premium variety to be grown besides having high demand from *durian* enthusiasts. This makes the price higher in the market either in the form of saplings to be used as plant material and as fresh produce. However, identification of *durian* varieties can be problematic because it is mostly done through evaluation of leaf shape, fruit shape, aroma, taste and seed shape. In addition, some types of *durian* varieties show similar morphological characteristics that are difficult to distinguish especially in the form of saplings. In addition, the identification of *durian* variety for hybridization is necessary to avoid confusion. With the advent of DNA technology, the identification process of *durian* varieties can be more specific and simple. In this study, molecular markers or barcode DNA were applied in determining the differences of 10 selected *durian* varieties namely MDUR88, Musang King, D24, D99, D145, D168, D175, D200, MDUR78 and MDUR79 using two gene candidates (*nadhA* and *PetB-PetD*). From the results obtained, these two gene candidates have been identified showing the potential to be used in distinguishing and verifying the identities of 10 *durian* varieties via nucleotide differences through DNA sequence alignment. The results of this study support the use of the developed molecular markers or barcode DNA as an effective method for the identification and determination of *durian* varieties in the following study.

Pengarang

Mohammad Malek Faizal Azizi

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

Lau Han Yih (Dr.), Norliza Abu Bakar (Dr.) dan Faridah Salam (Dr.)

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