

Pembangunan penanda DNA bagi ciri ketahanan terhadap kemarau untuk aplikasi pembaikbakaan berbantuan penanda

(Development of DNA marker for drought tolerant trait for marker assisted breeding application)

Mohd Shahril Firdaus Ab Razak, Nor Helwa Ezzah Nor Azman, Rahiniza Kamaruzaman, Shamsul Amri Saidon, Site Noorzuraini Abdul Rahman, Mohd Aziz Rashid dan Mohammad Hariz Abdul Rahman

Pengenalan

Padi merupakan tanaman penting sebagai sumber makanan manusia, terutama di Asia Tenggara yang menyumbang 90% pengeluaran padi dunia. Menurut FAO, pengeluaran beras global meningkat tiga kali ganda iaitu dari tahun 1961 – 2010 dengan kenaikan daripada 221 juta tan metrik menjadi 670 juta tan metrik. Perluasan kawasan penanaman dan penanaman varieti semi kerdil (*semi dwarf*) yang berhasil tinggi merupakan faktor utama yang menyumbang kepada peningkatan pengeluaran padi global. Namun begitu, domestikasi varieti padi semi kerdil telah menjurus kepada kerentanan terhadap tekanan biotik dan abiotik.

Tekanan kemarau merupakan salah satu tekanan abiotik yang menyebabkan kehilangan hasil kerana kebanyakan varieti padi moden adalah sangat sensitif terhadap tekanan kemarau. Seperti yang telah dilaporkan oleh IRRI, hampir 27 juta hektar kawasan tadahan hujan untuk padi terjejas kerana kemarau. Di Malaysia, lebih daripada RM12 juta kerugian hasil dilaporkan berlaku pada 2009. Oleh itu, terdapat keperluan yang mendesak untuk membangunkan varieti baharu yang tahan atau toleran terhadap tekanan kemarau.

Pembaikbakaan berbantuan penanda DNA (MAB) merupakan satu kaedah yang terbaik dalam membangunkan varieti yang toleran terhadap tekanan kemarau. MAB merujuk kepada aplikasi penanda DNA dalam menambah baik tumbuhan dengan bantuan penengetipan. Perkara yang paling penting dalam menjalankan MAB adalah kualiti penanda DNA yang digunakan. Penanda molekul tersebut mestilah berada sangat rapat pada gen/ lokus trait kuantitatif (QTL) yang dikehendaki atau lebih baik sekiranya penanda berfungsi yang menasarkan polimorfisma berfungsi digunakan. Penggunaan penanda DNA yang berkualiti ini menjamin proses pemilihan progeni yang lebih tepat. Oleh itu, pengenalpastian dan pembangunan penanda DNA adalah satu langkah yang kritikal dalam menjamin kejayaan MAB.

Penanda dan lokus sifat kuantitatif (QTL) bagi toleran terhadap kemarau

Dalam dekad yang lalu, ketersediaan penanda molekular dan kaedah penjenutian tepat telah berjaya mengenal pasti beberapa QTL bagi hasil bawah tekanan kemarau (qDTY). Kebanyakan qDTY ini diperolehi dan dikenal pasti daripada varieti tradisional dan digunakan untuk membangunkan varieti yang toleran terhadap kemarau. Sebilangan QTL menunjukkan kesan bagi kedua-dua keadaan tanah tinggi mahupun tanah rendah dan sesetengah QTL hanya memberi kesan pada ekosistem yang spesifik sahaja. Begitu juga, beberapa QTL yang menunjukkan kesan pada pelbagai latar belakang genetik dan ada juga QTL yang hanya memberi kesan pada latar belakang genetik yang spesifik.

Pelbagai QTL kesan-besar (*large effect QTL*) ini membuka pintu baru untuk pembiakan berbantuan penanda untuk toleransi kemarau. Khususnya, QTL ini digunakan untuk membangunkan varieti berhasil tinggi yang toleran terhadap tekanan kemarau dengan menggunakan pendekatan pembiakan berbantuan penanda DNA. Kepelbagaian QTL ini membuka lembaran kepada pelaksanaan MAB dalam membangunkan varieti yang toleran terhadap tekanan kemarau yang berhasil tinggi.

qDTY12.1 merupakan QTL kesan-besar pertama yang dilaporkan bagi hasil dalam tekanan kemarau. QTL ini terletak di antara penanda RM28048 dan RM28166 pada kromosom 12. QTL ini telah dikenal pasti daripada populasi pemetaan F3 hasil kacukan induk penderma Way Rarem dengan Vandana. Ujian keberkesanan QTL ini ke atas populasi lain dan telah menunjukkan bahawa QTL ini memberi kesan yang konsisten dalam ekosistem yang berbeza. QTL ini juga tidak memberi apa-apa kesan sekiranya varieti yang membawa QTL ini ditanam dalam ekosistem pengairan seperti biasa. QTL dilaporkan terlibat dalam meningkatkan pengambilan air yang mana membawa kepada peningkatan hasil dalam keadaan kemarau. qDTY2.1 dan qDTY3.1 dikenal pasti hasil daripada analisis pengasingan pukal (BSA) dengan menggunakan populasi pemetaan kacuk balik hasil kacukan varieti Swarna dan varieti Apo. QTL ini memberi kesan untuk hasil bawah tekanan kemarau bagi ekosistem tanah rendah. qDTY1.1 juga dikenal pasti hasil daripada pendekatan BSA rentetan kejayaan dalam mengenal pasti qDTY2.1 dan qDTY3.1 menggunakan pendekatan BSA. qDTY1.1 dibangunkan melalui populasi pemetaan F3 antara induk penderma N22 dengan mega varieti Swarna, IR64 dan MTU1010 (N22/Swarna, N22/IR64 dan N22/MTU1010). QTL ini menunjukkan hasil yang konsisten bagi ketiga-tiga populasi tersebut.

Antara QTL kesan-besar lagi ialah qDTY3.2 yang mana ia juga dikenal pasti daripada varieti N22. Di samping itu, antara varieti lain yang merupakan induk penderma QTL ini ialah Morobereken dan juga Aday Sel. QTL ini ko-setempat dengan QTL Hd9, yang berkaitan dengan hari sehingga pengebungaan. Kandungan gen dalam QTL ini menunjukkan kepelbagaian gen berkaitan dengan fungsi tumbuhan dalam tekanan abiotik dan gen berkaitan pengebungaan. qDTY11.1 juga telah dikenal pasti daripada varieti Morobereken dengan menggunakan populasi pemetaan hasil kacukan Morobereken dengan varieti Swarna. qDTY6.1 pula merupakan QTL kesan-besar bagi hasil dalam ekosistem aerobik dan tanah rendah.

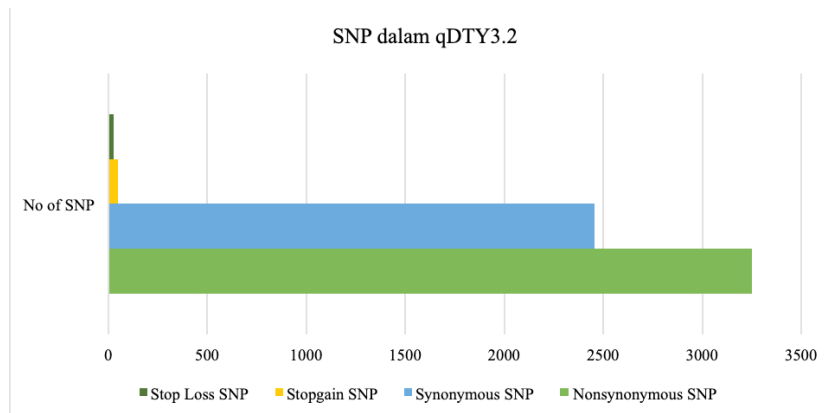
Integrasi data genomik dan transkriptomik dan mengenal pasti dan membangunkan penanda berkait dengan ketahanan kemarau bagi padi

Kajian dalaman bagi mengenal pasti dan membangunkan penanda bagi qDTY3.2 dan qDTY11.1 telah dijalankan dengan menggunakan pendekatan integrasi data genomik dan transkriptomik. Perbandingan genom pada kawasan qDTY3.2 antara varieti Morobereken, induk penderma dan MR 219, varieti komersial yang sensitif terhadap kemarau menunjukkan terdapat 287 gen berkod di dalam kawasan qDTY3.2 di Kromosom 3 yang diapit oleh penanda SNP id3000019 (Posisi: 3:187,698) dan id300946 (Posisi 3:1,716,139). Secara keseluruhan di kawasan ini sebanyak 5874 SNP telah dikenal pasti. Perincian SNP ini adalah seperti dalam *Rajah 1*. Hasil kajian transkriptomik pula menunjukkan tujuh gen terekspresi secara unik bagi sampel Morobereken dalam keadaan kemarau. Sejumlah 24 SNP telah dikenal pasti di dalam kawasan gen tersebut. Ini menunjukkan integrasi data transkriptomik dapat mengecilkan kawasan QTL seterusnya dapat mengurangkan fenomena seretan rantaian (*Linkage drag*) sekiranya mengaplikasi penanda ini dalam program MAB.

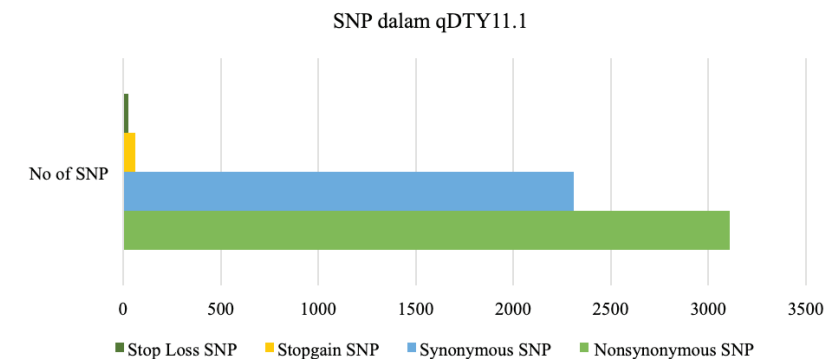
Perbandingan genom pada kawasan qDTY11.1 antara varieti Morobereken dan MR 219 pula menunjukkan terdapat sejumlah 1,035 gen berkod di dalam kawasan qDTY11.1. qDTY 11.1 telah dikenal pasti berada pada kromosom 11 yang mana telah diapit oleh penanda SNP id11002304 (Posisi: 11:5,515,396) dan penanda id11006765 (Posisi: 11:20,726,280). Secara keseluruhan, di dalam kawasan ini sebanyak 5,509 SNP telah dikenal pasti. Perincian SNP ini adalah seperti dalam *Rajah 2*. Hasil kajian transkriptomik pula menunjukkan tujuh gen terekspresi secara unik bagi sampel Morobereken dalam keadaan kemarau. Sejumlah 255 SNP telah dikenal pasti di dalam kawasan gen tersebut. Perincian gen terekspresi ini adalah seperti dalam *Jadual 1*. Kesemua penanda SNP ini akan divalidasi terlebih dahulu sebelum digunakan dalam MAB.

Aplikasi MAB dalam membangunkan varieti yang tahan terhadap tekanan kemarau

Pengenalpastian QTL bagi hasil dalam tekanan kemarau telah membuka jalan dalam membangunkan varieti toleran terhadap kemarau. Setiap qDTY menunjukkan kelebihan hasil 300 – 500 kg/ ha bawah tekanan kemarau yang sederhana sehinggalah kemarau yang teruk. Kelebihan hasil dalam tekanan kemarau perlu dipertingkatkan untuk memberi kesan komersial dalam kalangan petani. Kajian yang dijalankan juga menunjukkan interaksi dwigenik antara qDTY yang mana prestasi 1 qDTY akan dipertingkatkan lagi dengan kehadiran 1 lagi qDTY yang lain. Begitu juga, titisan IR64 dengan 2 dan 3 piramida QTL telah menunjukkan kelebihan hasil 1.2 – 1.5 t/ha berbanding dengan IR64 bawah tekanan kemarau yang sederhana dan teruk di samping mengekalkan potensi hasil yang sama dalam keadaan pengairan yang normal. Keberjayaan dalam piramida QTL telah menjadi batu loncatan dalam membangunkan varieti tahan kemarau melalui MAB. Di MARDI sendiri kita telah mengaplikasi MAB dalam membangunkan varieti yang toleran terhadap tekanan kemarau dengan mengintrogressi QTL berketahanan terhadap kemarau kedalam varieti komersial Malaysia yang berhasil tinggi seperti MARDI Siraj 297 (*Gambar 1*).



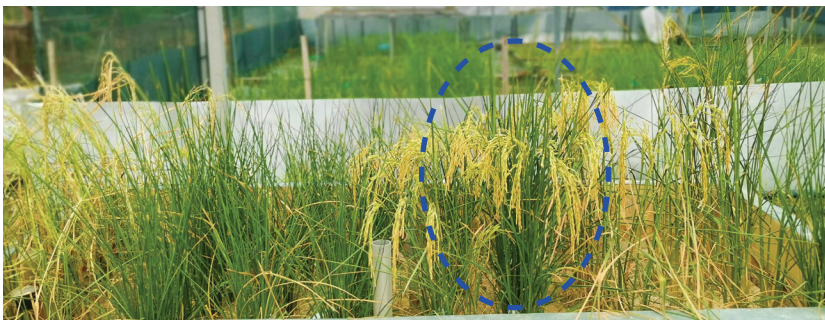
Rajah 1. Perincian SNP di dalam kawasan qDTY 3.2



Rajah 2. Perincian SNP di dalam kawasan qDTY 11.1

Jadual 1. Perincian gen yang terekspresi dalam kawasan qDTY3.2 dan qDTY11.1

ID Gen	Deskripsi gen
qDTY3.2	
Os03g0107800	Gen hipotetik terabadi
Os03g0115100	Menyerupai GHMP kinase
Os03g0129400	Menyerupai EST AU078206
Os03g0108500	4,4-dimethyl-sterol C4-methyl-oxidase
Os03g0115200	Menyerupai Nob1; Pno1p
Os03g0119300	Peptidase S8, domain berkaitan subtilisin
Os03g0125300	Domain D111/G
qDTY11.1	
Os11g0282300	Domain DUF1685
Os11g0289700	Protein famili Cytochrome P450
Os11g0439600	Lectin-nucleotide phosphohydrolase
Os11g0444700	Domain Octicosapeptide/Phox/Bem1p
Os11g0451700	Menyerupai Dehydrin DHN1
Os11g0502700	Glycosyl transferase
Os11g0525200	Menyerupai Cytochrome P450



Gambar 1. Titisan yang berpotensi toleran terhadap tekanan kemarau (dalam bulatan) yang dibangunkan melalui pendekatan MAB di MARDI

Kesimpulan

Tekanan kemarau merupakan salah satu tekanan abiotik yang menyebabkan kehilangan hasil kerana kebanyakan varieti padi moden adalah sangat sensitif terhadap kemarau. Kaedah terbaik bagi menangani masalah pengurangan hasil disebabkan tekanan kemarau adalah dengan penanaman varieti yang tahan terhadap tekanan kemarau tersebut. MAB menawarkan satu pendekatan yang terbaik dalam membangunkan varieti yang toleran terhadap tekanan kemarau. Namun begitu, keberjayaan program MAB adalah bergantung kepada kualiti penanda DNA yang digunakan. Penanda DNA yang digunakan 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. Dalam kajian ini, kita telah berjaya mengecilkan kawasan qDTY3.2 dan qDTY11.1 dengan menggunakan pendekatan integrasi data genomik dan transkriptomik. Penanda-penanda yang telah dibangunkan ini telah divalidasi dan diaplikasi dalam program pembiakbakaan dalam membangunkan varieti yang toleran terhadap tekanan kemarau.

Penghargaan

Penulis ingin mengucapkan jutaan terima kasih kepada kerajaan Malaysia kerana memberi peruntukan bawah NKEA EPP14-Pembangunan industri benih dan juga Projek Pembangunan PRB402. Penulis juga ingin mengucapkan terima kasih kepada sesiapa yang terlibat secara tidak langsung dalam menjayakan projek dan penulisan ini.

Bibliografi

- Bernier, J., Kumar, A., Ramaiah, V., Spaner, D. dan Atlin, G. (2007). A large effect QTL for grain yield under reproductive stage drought stress in upland rice. *Crop Science* 47(2): 507 – 516
- Dixit, S., Singh, A. dan Kumar, A. (2014). Rice breeding for high grain yield under drought: a strategic solution to a complex problem. *International Journal of Agronomy*
- FAO (2011). The state of the world's land and water resources for food and agriculture
- Shamsudin, N.A.A., Swamy, B.M., Ratnam, W., Cruz, M.T.S., Raman, A. dan Kumar, A. (2016). Marker assisted pyramiding of drought yield QTLs into a popular Malaysian rice cultivar, MR 219. *BMC genetics* 17(1): 30
- Venuprasad, R., Bool, M.E., Quiatchon, L. dan Atlin, G.N. (2012). A QTL for rice grain yield in aerobic environments with large effects in three genetic backgrounds. *Theoretical and Applied Genetics* 124(2): 323 – 332
- Venuprasad, R., Dalid, C.O., Del Valle, M., Zhao, D., Espiritu, M., Cruz, M. S. dan Atlin, G.N. (2009). Identification and characterization of large-effect quantitative trait loci for grain yield under lowland drought stress in rice using bulk-segregant analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 120(1): 177 – 190
- Vikram, P., Swamy, B.M., Dixit, S., Ahmed, H.U., Cruz, M.T.S., Singh, A.K. dan Kumar, A. (2011). qDTY 1.1, a major QTL for rice grain yield under reproductive-stage drought stress with a consistent effect in multiple elite genetic backgrounds. *BMC genetics* 12(1): 1 – 15

Ringkasan

Penduduk dunia meningkat dengan pesat setiap tahun dan keperluan untuk meningkatkan hasil pengeluaran makanan tanaman utama seperti padi, gandum, soya dan jagung juga meningkat. Tambahan pula, tekanan abiotik yang meliputi kemarau, kemasinan dan tekanan haba dan sejuk telah menyebabkan kehilangan hasil padi yang ketara bagi banyak kawasan penanaman padi. Antara kesemua itu, tekanan kemarau merupakan salah satu faktor utama yang membataskan pengeluaran hasil tanaman. Namun begitu, sehingga kini tiada satu pun varieti padi komersial yang diisytihar di Malaysia adalah tahan terhadap tekanan kemarau. Teknologi MAB menawarkan satu pendekatan terbaik dalam membangunkan varieti yang toleran terhadap kemarau. Namun begitu, kejayaannya sangat bergantung kepada kualiti penanda DNA yang diguna pakai. Kaedah integrasi data genomik dan transkriptomik menawarkan satu kaedah dalam mengenal pasti dan membangunkan penanda DNA yang berkesan dan berkualiti untuk aplikasi MAB bagi membangunkan varieti yang toleran terhadap kemarau.

Summary

The world's population is growing rapidly every year and there will be a need to increase food production yields of major crops such as rice, wheat, soybeans and corn. Furthermore, abiotic stresses, which include drought, salinity, heat and cold stress, have resulted in significant loss of rice yields in many rice growing areas. Among all that, drought stress is one of the main factors that limit the crop production. However, to date, none of the commercial rice varieties released in Malaysia are tolerance to drought stresses. MAB technology offers an excellent approach in developing drought tolerant rice variety. However, its success is highly dependent on the quality of the DNA markers used. The integration of genomic and transcriptomic data offer as best approach in identifying and developing effective and quality DNA markers for MAB applications for development of drought 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

Nor Helwa Ezzah Nor Azman
Pusat Penyelidikan Bioteknologi dan Nanoteknologi
Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM
43400 Serdang, Selangor

Rahiniza Kamaruzaman dan Shamsul Amri Saidon
Pusat Penyelidikan Padi dan Beras
Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM
43400 Serdang, Selangor

Site Noorzuraini Abdul Rahman
Pusat Penyelidikan Agrobiodiversiti dan Persekitaran
MARDI Seberang Perai
13200 Kepala Batas, Pulau Pinang

Mohd Aziz Rashid dan Mohammad Hariz Abdul Rahman
Pusat Penyelidikan Agrobiodiversiti dan Persekitaran
Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM
43400 Serdang, Selangor