

Eksplorasi hubungan genetik terung tradisional berpotensi untuk program pembaikbakaan

(Exploration on genetic relationship of potential traditional eggplant for breeding programme)

Zulhairil Ariffin, Maya Izar Khaidizar, Nor Asiah Ismail, Aminah Mahmud, Umikalsum Mohamed Bahari dan Nuradni Hashim

Pengenalan

Terung (*Solanum melongena* L.) amat dikenali sebagai salah satu tanaman sayuran dalam famili Solanaceae bersama-sama spesies penting yang lain seperti ubi kentang, tomato, tembakau dan lada hitam. Menurut kamus Inggeris, terung dipanggil dengan pelbagai nama seperti 'brinjal eggplant', 'aubergine' atau 'guinea squash'. Namun, di Malaysia panggilan terung sahaja sudah memadai dan amat sinonim dengan masyarakat setempat. Terdapat banyak jenis terung yang boleh didapati di Malaysia. Lazimnya, terung ungu, terung panjang, terung bulat dan terung putih sangat mudah didapati kerana seringkali digunakan dalam masakan. Selain itu, banyak petani di negara-negara Asia menanam tanaman terung untuk keperluan makanan di samping menambah pendapatan isi rumah mereka. India dan China merupakan negara pengeluar utama tanaman terung kerana menjadi pusat tanaman primer diikuti oleh negara Thailand, Filipina, Indonesia dan Malaysia. Selain itu, negara Jepun dan Amerika juga telah meningkatkan usaha untuk menanam terung pada skala besar di ladang pertanian mereka. Terdapat tiga jenis varieti yang berasal daripada terung var. *Esculentum*, var. *Serpentinum* dan var. *Depressum*. Anak pokok dan hasil buahnya digunakan dan dijual oleh petani di pasar harian. Kebiasaannya, varieti-varieti ini adalah berbeza berdasarkan morfologi kerana fisiologi dan pengaruh persekitaran. Maka, kepelbagaian variasi adalah semula jadi yang berlaku antara varieti terung yang ada pada hari ini.

Sehubungan itu, penanda molekul berdasarkan tindak balas polimerase berantai (PCR) dipercayai dan digunakan secara meluas untuk kajian yang berkaitan kepelbagaian hubungan genetik serta menyelesaikan isu-isu berlainan taksonomi tumbuhan. Analisis molekul menggunakan kawasan jujukan nukleotida yang spesifik dapat merungkai hubungan filogenetik varieti terung dengan lebih jelas. Sebagai contoh, kloroplas DNA yang tidak dilabel (cpDNA) telah digunakan sebagai prob untuk alat pengesanan di dalam DNA. Sakata et al. juga telah menemui kepelbagaian morfologi adalah tidak bersandarkan kepada kepelbagaian cpDNA dan bergantung kepada perbezaan pola cpDNA yang ada. Selain cpDNA, terdapat teknik lain yang boleh digunakan seperti penanda isozyme, Polimorfisme Panjang Jalur Tersekat (RFLP), Jujukan Ringkas Berulang Pertengahan (ISSR) dan Polimorfisme Panjang Jalur Teramplifikasi (AFLP) pada kajian lepas. Bagi kajian ini, gen Maturase K (*matK*) telah

digunakan untuk menyasiat hubungan filogenetik varieti terung komersial termasuk terung tradisional (*Gambar 1*). Gen *matK* telah dicadangkan sebagai kawasan kod bar bagi tumbuhan darat oleh para saintis. Kawasan kod bar *matK* mengandungi 841 bp saiz 205 – 1046 bp (termasuk kawasan primer) dalam jujukan penuh plastid *Arabidopsis thaliana*.



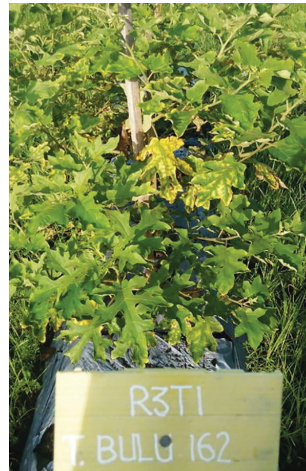
Terung asam



Terung susu



Terung pipit



Terung bulu



Terung rapuh



Terung telunjuk

Gambar 1. Pokok terung tradisional

Penyediaan sampel

Sebanyak 65 sampel daun muda terung telah dikumpulkan dari plot kajian pembangunan terung tradisional terpilih yang terletak di MARDI Jalan Kebun, Klang dan di Serdang, Selangor. Varieti terung tradisional yang dikumpulkan terdiri daripada terung susu (empat aksesori), terung telunjuk (11 aksesori), terung pipit (enam aksesori), terung bulu (enam aksesori), terung asam (empat aksesori) dan terung rapuh (tujuh aksesori). Selain itu, terung komersial yang dikenali sebagai terung bulat sebiji (empat aksesori), terung panjang biru (empat aksesori), terung panjang (empat aksesori), terung ungu besar (empat aksesori), terung putih asal (empat aksesori), BR13 (empat aksesori) dan MTE2 (empat aksesori) juga turut dikumpulkan.

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 β -mercaptoetanol] dan dieram pada suhu 65 °C selama 30 minit. Tiub digoncang setiap 10 minit agar campuran menjadi sebati dan sekata. Tiub dikeluarkan dan 200 μ l alkohol kloroform-isoamil (CIA; 24:1) dicampurkan ke dalam larutan, digoncang dan diemparkan pada kelajuan 13,000 rpm pada suhu bilik selama 2 minit. Tiga lapisan terbentuk dan bahagian paling atas yang dipanggil *supernatant* dipindahkan ke dalam tiub baharu dan dicampur sekali lagi dengan larutan CIA, digoncang dan diemparkan pada kelajuan 13,000 rpm pada suhu bilik selama 2 minit. *Supernatant* dipindahkan keluar dan ditambah dengan 600 μ l isopropanol sejuk (-20 °C), digoncang untuk dibiarkan selama 15 minit pada suhu bilik. Campuran larutan diemparkan pada 13,000 rpm selama 2 minit pada suhu 4 °C. *Supernatant* 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 μ 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 genomplastid. Jujukan penuh penanda adalah seperti dalam *Jadual 1*.

Tindak balas polimerase berantai (PCR) *matK* dijalankan menggunakan kuantiti kecil iaitu sebanyak 7.5 μ l dengan program ditetapkan pada fasa pradenaturasi 94 °C selama 1 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 5 minit.

Jadual 1. Jujukan penuh penanda *matK*

Nama	Jujukan penuh penanda
matK-390f	5'-CGATCTATTCATTCAATATTTC-3'
matK-1326r	5'-TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT-3'

Penulenan produk PCR

Produk PCR dicerap melalui elektroforesis gel agaros 1% selama 1 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 μ l 3M 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 1 minit. Larutan terempar dibuang dan larutan tertinggal diemparkan sekali lagi. Bekas dicuci dengan 650 μ l penimbal pencuci dan diemparkan pada 10,000 rpm selama 1 minit. Larutan terempar diempar sekali lagi pada 10,000 rpm untuk membuang sisa etanol. Bekas diletakkan pada tiub baharu dan sebanyak 30 – 200 μ 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 dituliskan akan diproses untuk penjujukan bagi kedua-dua arah iaitu hadapan dan bertentangan. Kedua-dua jujukan DNA ini diproses menggunakan program *Geneious* untuk mendapatkan jujukan penuh DNA. Selain itu, jujukan penuh DNA ini juga diperiksa menggunakan aplikasi pengenalpastian tumbuhan yang terdapat di laman sesawang BOLDSYSTEMS untuk menentukan identiti kesamaan jujukan. Analisa filogenetik juga dijalankan ke atas jujukan penuh DNA menggunakan algoritma Neighbor-joining (NJ) oleh program *Molecular Evolutionary Genetic Analysis* (MEGA 7).

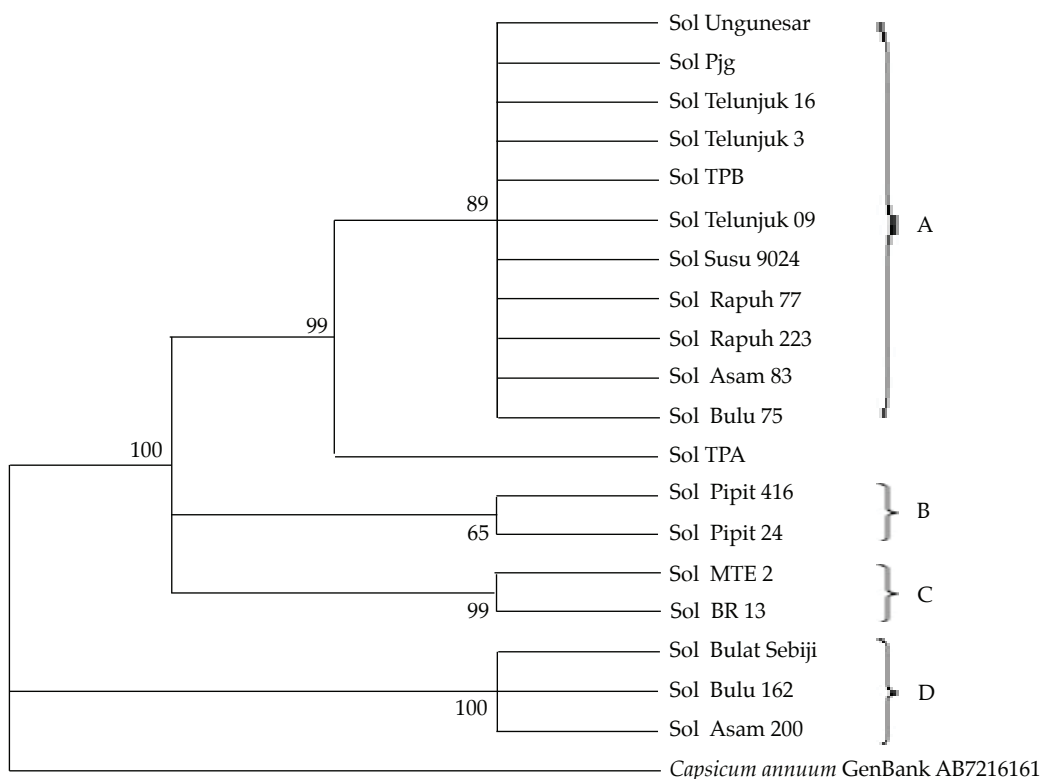
Analisis kajian

Hasil padanan jujukan penuh DNA varieti terung tradisional dan komersial mendapati bahawa kesemua sampel mempunyai nilai kesamaan yang tinggi (95 – 99%) dengan sampel dan jujukan lain spesies *Solanum* yang terdapat di dalam pangkalan data BOLDSYSTEMS. Pangkalan data ini telah dibangunkan oleh Pusat Biodiversiti Genomik yang terletak di Kanada. Ia merupakan aplikasi atas talian dan pangkalan data yang menghimpun dan menggunakan maklumat kodbar DNA di dalam satu hub kolaborasi untuk komuniti saintifik dan rujukan

sumber awam pada skala besar. Aksesori terung telunjuk, terung bulu, terung asam, terung susu dan terung rapuh mempunyai nilai kesamaan yang tinggi kepada spesies *Solanum* seperti *S. kurzii*, *S. pubescens*, *S. linnaeanum* dan *S. incanum*. Menurut laman sesawang (SolanaceaeSource.org), *S. Kurzii* telah dikenal pasti sebagai sinonim kepada *S. violaceum* Ortega iaitu spesies yang telah diterima sebagai ahli dalam genus *Solanum*. Manakala, *S. pubescens*, *S. linnaeanum* dan *S. Incanum* juga telah diterima sebagai ahli yang sah di dalam genus *Solanum*.

Pohon filogenetik bagi 19 varieti terung juga telah berjaya dihasilkan menggunakan algoritma *Neighbor-joining* (NJ) dengan *Capsicum annuum* (GenBank AB7211616.1) sebagai kumpulan luar (*Rajah 1*). Berdasarkan pohon filogeni yang dihasilkan menunjukkan varieti terung dapat dipecahkan kepada lima kluster iaitu A, B, C, D dan E. Kluster A terdiri daripada terung telunjuk, terung susu, terung rapuh, terung asam, terung bulu, terung panjang, terung ungu besar, terung panjang biru dan terung putih asal. Manakala, kluster B dan C terdiri daripada terung pipit dan MTE2 bersama BR13 masing-masing. Terung asam 200, terung bulu 162 dan terung bulat sebiji dihimunkan dalam kluster D.

Pemerhatian terhadap serangan penyakit dan perosak ke atas terung tradisional juga menunjukkan tindak balas yang berbeza-beza. Berdasarkan *Jadual 2*, terung asam 83, terung bulu 75 dan



Rajah 1. Pohon filogenetik menggunakan kaedah Neighbor Joining dan model Juke Cantor bersama *Capsicum annuum* sebagai kumpulan luar

Jadual 2. Kehadiran serangan penyakit dan perosak ke atas terung tradisional

Akses terung tradisional	Penyakit dan perosak							
	Ulat pengorek	Antraknos	Karat daun	Hama	Virus	Layu bakteria	Reput pangkal batang	Reput buah
Pipit 246	X	X		X	X			
Pipit 24	X	X		X				
Asam 200	X	X	X	X	X		X	
Asam 83							X	
Bulu 75						X	X	
Bulu 162							X	
Telunjuk 16	X	X		X	X			
Rapuh 77	X	X	X	X	X			
Rapuh 223	X	X	X	X	X			
Susu 9024	X	X		X	X			X

terung bulu 162 mempunyai nilai rintang yang tinggi berbanding dengan terung tradisional yang lain berdasarkan simptom penyakit dan kehadiran perosak. Serangan ulat pengorek, hama dan penyakit seperti antraknos dan virus menunjukkan kekerapan yang tinggi berlaku ke atas pokok terung tradisional. Selain itu, didapati penyakit reput buah dan layu bakteria didapati kurang memberikan impak yang besar terhadap pertumbuhan dan perkembangan pokok terung tradisional.

Berdasarkan jadual ini, pokok terung asam 83, terung bulu 75 dan terung bulu 162 mempunyai potensi sebagai sumber genetik terpilih terhadap serangan penyakit dan perosak. Namun, lebih banyak kajian lanjut perlu dijalankan dari aspek agronomi, penghasilan anak pokok, kandungan kimia berfungsi serta daya ketahanan pokok terung ini terhadap perubahan cuaca yang melanda dunia sekarang. Selain itu, usaha pemuliharaan terung tradisional juga perlu dipertingkatkan agar sumber genetik ini sentiasa disimpan dengan baik bagi mengelakkan kepupusan atau kehilangan. Maka, aktiviti pengumpulan sumber genetik terung dalam bentuk biji benih amatlah penting terutamanya di kawasan hutan atau pedalaman untuk memperoleh sumber baharu atau lebih dikenali sebagai kerabat liar terung.

Kesimpulan

Terung tradisional dan varieti terung yang lain mempunyai nilai kepelbagaian genetik yang tinggi. Terung tradisional amat berpotensi menjadi sumber genetik terpilih bagi menambah baik strategi program pembaikbakaan di samping memperkasakan pemuliharaan sumber genetik terung secara in situ dan ex situ.

Bibliografi

- Cuénoud, P., Savolainen, V., Chatrou, L.W., Powell, M., Grayer, R.J. dan Chase, M.W. (2002). Molecular phylogenetics of Caryophyllales based on nuclear 18S rDNA and plastid *rbcL*, *atpB*, and *matK* DNA sequences. *Am. J. Bot.* 89: 132 – 144
- Daunay, M.C. dan Lester, R.N. (1988). The usefulness of taxonomy or Solanaceae breeders, with special reference to the genus *Solanum* and to *Solanum melongena* L. (eggplant). *Capsicum Newslett.* 7: 70 – 79
- Doyle, J. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus (Madison)* 12: 13 – 15
- Fay, M.F., Cameron, K.M., Prance, G.T., Llédo, M.D. dan Chase, M.W. (1997). Familial relationships of Rhabdodendron (Rhabdodendraceae): *Plastid rbcL* sequences indicate a caryophyllid placement. *Kew Bull.* 52: 923 – 932
- Isshiki, S., Iwata, N. dan Khan, M.M.R. (2008). ISSR variations in eggplant (*Solanum melongena* L.) and related *Solanum* species. *Sci. Hortic.* 117: 186 – 190
- Isshiki, S., Uchiyama, T., Tashiro, Y. dan Miyazaki, S. (1998). RFLP analysis of a PCR amplified region of chloroplast DNA in eggplant and related *Solanum* species. *Euphytica* 102: 295 – 299
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M. dan Sturrock, S. (2012). Geneious basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28: 1647 – 1649
- Kress, W.J., Erickson, D.L., Jones, F.A., Swenson, N.G., Perez, R. dan Sanjur, O. (2009). Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106: 18,621 – 18,626
- Liao, Y., Juan Sun, B., Wen Sun, G., Cheng Li, H., Liang Li, Z. dan Xing Li, Z. (2009). AFLP and SCAR markers associated with peel color in eggplant (*Solanum melongena*). *Agric. Sci. China* 8: 1,466 – 1,474
- Murray, M.G. dan Thompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8: 4,321 – 4,326
- Nothmann, J., Rylski, I. dan Spigelman, M. (1976). Color and variations in color intensity of fruit of eggplant cultivars. *Sci. Hortic.* 4: 191 – 197
- Sakata, Y. dan Lester, R.N. (1997). Chloroplast DNA diversity in brinjal eggplant (*Solanum melongena* L.) and related species. *Euphytica* 9: 295 – 301
- V. Kashyap, S. Vinod Kumar, C. Collonnier, F. Fusari, R. Haicour, G.L. Rotino, (2003). Biotechnology of eggplant. *Sci. Hortic.* 97: 1 – 25

Ringkasan

Terung tradisional seringkali dilabelkan sebagai terbiar, jarang digunakan dan kurang ditanam secara meluas berbanding dengan varieti terung komersial (*Solanum melongena*) seperti terung panjang biru, terung bulat dan terung ungu besar. Antara faktor yang menyebabkan ia kurang popular adalah kurangnya promosi meluas, tiada kesedaran awam dan pengetahuan amat terhad sebagai panduan petani menjalankan pertanian berskala besar. Walau bagaimanapun, terung tradisional amat berpotensi kerana ia juga mempunyai nilai-nilai baharu yang harus diterokai berikutan takungan genetik terung yang semakin mengecil. Antara aksesori terung tradisional yang terdapat dalam koleksi MyGeneBank™ adalah seperti terung pipit, terung asam, terung bulu, terung telunjuk, terung rapuh dan terung susu. Kajian DNA molekul telah berjaya memperoleh jujukan DNA aksesori terung tradisional dengan menggunakan kawasan kod plastid, gen Maturase K (*matK*), termasuk tujuh varieti terung yang lain iaitu terung bulat sebiji, terung panjang biru, terung panjang, terung ungu besar, terung putih asal, BR13 dan MTE2. Saringan kawasan jujukan DNA ke atas semua terung telah dijalankan menggunakan enjin pengenalpastian tumbuhan di laman sesawang *Barcode of Life Database Systems* (BOLDSYSTEMS). Hasil padanan jujukan DNA menunjukkan bahawa nilai kesamaan yang tinggi (>99%) telah diperolehi bagi aksesori terung telunjuk, terung bulu, terung asam, terung susu dan terung rapuh kepada spesies *Solanum* seperti *S. kurzii*, *S. pubescens*, *S. linnaeanum* dan *S. incanum*. Pohon filogenetik juga telah dibina menggunakan kaedah *Neighbor Joining* dan model Juke Cantor bersama *Capsicum annuum* sebagai kumpulan luar. Nilai *bootstrap* yang tinggi telah merangkumkan terung asam, terung bulu, terung bulat sebiji dan terung MTE2 bersama BR13 dalam dua kumpulan berasingan. Terung pipit yang juga dikenali sebagai kerabat liar terung iaitu *Solanum torvum* telah dipisahkan sepenuhnya daripada yang lain pada nilai *bootstrap* 65%. Ini menunjukkan aksesori/varieti terung dalam kumpulan tersebut mempunyai hubungan yang rapat dan berkongsi leluhur yang sama. Kajian ini juga menunjukkan bahawa terung tradisional dan varieti terung yang lain mempunyai nilai kepelbagaian genetik yang tinggi. Oleh itu, dapat disimpulkan bahawa terung tradisional amat berpotensi menjadi sumber genetik terpilih bagi menambah baik strategi program pembaikbakaan di samping memperkasakan pemuliharaan sumber genetik terung secara in situ dan ex situ.

Summary

Traditional eggplant and its wild relatives are considered underutilized and very poorly cultivated compared to commercial eggplant such as 'terung panjang biru', 'terung bulat' dan 'terung ungu besar'. It was not very popular due to less promotion, no public awareness and very limited knowledge for the farmers to cultivate the eggplant in large scale plantation. However, traditional eggplants may have good potential value since they possess new wealth of distinct characters to be discovered due to narrowness of the eggplant gene pool. A collection of traditional eggplant was available in MyGeneBank™ collection such as 'terung pipit', 'terung asam', 'terung bulu', 'terung telunjuk', 'terung rapuh' and 'terung susu'. DNA research have successfully obtained DNA sequences of traditional eggplants using plastic region, Maturase K (*matK*) gene, including commercial eggplant consisting of 'terung bulat sebiji', 'terung panjang biru', 'terung panjang', 'terung ungu besar', 'terung putih asal', BR13 and MTE2. A screening of these sequences has been undertaken using a plant identification engine at the Barcode of Life Database Systems (BOLDSYSTEMS) website. Blast results showed that DNA sequences obtained higher identical value (>99%)

for 'terung telunjuk', 'terung bulu', 'terung asam', 'terung susu' and 'terung rapuh' with *Solanum* species such as *S. kurzii*, *S. pubescens*, *S. linnaeanum* dan *S. incanum*. A phylogenetic tree also was constructed using Neighbor Joining method and Jukes Cantor distance model with *Capsicum annuum* as an outgroup. A bootstrap value of 1000 was observed between terung asam, terung bulu, terung bulat sebiji and MTE2 together with BR13 in two separate clusters. 'Terung pipit' also known as eggplant wild relatives was clearly separated from the rest with a bootstrap value of 65%. Therefore, most of the accessions /varieties in the both clusters have close relationship and similar ancestor. The study also indicated that both traditional and commercial eggplant displayed high level of inter and intra specific variations in term of genetic diversity. Thus, it can be concluded that traditional eggplant has strong potential value of genetic resource to be utilized in the plant breeding programme as well as *in situ* and *ex situ* conservation of eggplant.

Pengarang

Zulhairil Ariffin

Pusat Penyelidikan Agrobiodiversiti dan Persekitaran

Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM

43400 Serdang, Selangor

E-mel: hairi@mardi.gov.my

Maya Izar Khaidizar, Nor Asiah Ismail (Dr.), Aminah Mahmud, Umikalsum

Mohamed Bahari dan Nuradni Hashim

Pusat Penyelidikan Tanaman Industri

Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM

43400 Serdang, Selangor

