

Penentuan variasi genetik limau nipis berdasarkan penanda molekul Jujukan Inter Ringkas Berulang (ISSR)

[Genetic variation determination of *limau nipis* based on Inter Simple Sequence Repeat markers (ISSR)]

Maya Izar Khaidizar, Mohd Azwan Jaafar dan Mohd Rafii Yusop

Pengenalan

Variasi semula jadi tumbuhan adalah sumber kepada ciri yang diingini untuk pembaikbakaan tumbuhan. Variasi ini merujuk kepada perbezaan pada ciri-ciri tumbuhan. Variasi tumbuhan menawarkan kepelbagaian dari segi rasa, bentuk, warna, bau serta membezakan ketahanan dan kerentanan suatu tumbuhan terhadap penyakit dan perosak. Warna bunga yang pelbagai, rasa buah yang manis atau masam dan kepelbagaian warna isi buah adalah beberapa contoh mudah yang merujuk kepada variasi semula jadi tumbuhan. Variasi semula jadi ini boleh berlaku disebabkan oleh pengaruh genetik (baka) dan juga pengaruh alam sekitar. Apabila variasi telah dikenal pasti, tumbuhan tersebut boleh digunakan sebagai induk untuk program pembaikbakaan tumbuhan atau dibiakkan secara vegetatif.

Variasi semula jadi ini boleh ditentukan melalui kaedah pencirian tertentu. Pencirian paling mudah adalah perincian dengan mata kasar (fenotip), diikuti dengan kaedah penanda molekul (pengenotipan), pencirian fitokimia, anatomi dan sebagainya. Kaedah pencirian fenotip adalah yang paling ringkas yang menggunakan ciri-ciri kualitatif tumbuhan seperti bentuk kanopi pokok, bentuk daun, kehadiran sayap pada tangkai daun (petiol), bentuk petiol, lokasi bunga, bentuk bunga, warna bunga, bentuk buah, rasa jus buah, bentuk biji dan sebagainya. Untuk kaedah pengenotipan pula, bahan genetik yang juga dikenali sebagai DNA diekstrak daripada tisu tumbuhan digunakan untuk menentukan perbezaan sifat genetik antara setiap individu dan juga setiap spesies. Kaedah pengenotipan adalah lebih tepat berbanding dengan kaedah pencirian fenotip kerana ciri genetik tidak mudah dipengaruhi oleh faktor persekitaran.

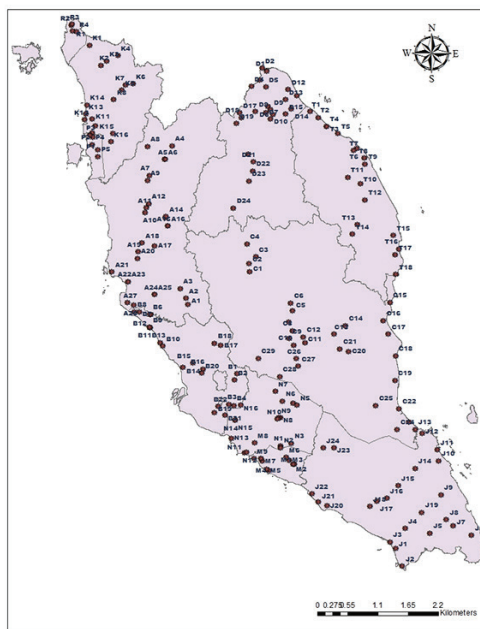
Limau nipis atau nama saintifiknya *Citrus aurantiifolia* adalah spesies limau yang berasal dari Malaysia. Terdapat dua variasi semula jadi limau nipis di Semenanjung Malaysia iaitu limau nipis dan limau kapas. Variasi ini dikenal pasti menggunakan pencirian fenotip. Variasi paling nyata adalah bentuk buah. Buah limau nipis berbentuk bulat, manakala limau kapas berbentuk elipsoid. Dari segi kulit buah pula, limau kapas mempunyai kulit yang lebih tebal berbanding dengan limau nipis. Bentuk daun juga mempunyai perbezaan. Daun limau nipis biasanya berbentuk ovat manakala daun limau kapas berbentuk eliptik. Ciri-ciri perbezaan ini hanya berdasarkan ciri-ciri kualitatif spesies ini.

Untuk memastikan keabsahan variasi semula jadi ini, ia perlu disokong dengan penjenotipan menggunakan penanda molekul.

Kajian penanda molekul telah banyak digunakan untuk mengenal pasti variasi genotip dalam kalangan tumbuhan peringkat tinggi. Antara penanda molekul yang sering digunakan ialah Polimorfisme Panjang Jalur Teramplifikasi (ALFP), Jujukan Inter Ringkas Berulang (ISSR), Polimorfisme Nukleotida Tunggal (SNP) dan Jujukan Ringkas Berulang (mikrosatelit). Variasi genotip limau nipis juga boleh dikesan menggunakan penanda molekul Jujukan Inter Ringkas Berulang (ISSR) yang bersifat dominan dan berkebolehan untuk mengesan variasi genetik dalam kalangan spesies yang sama. Perisian STRUCTURE kemudian digunakan untuk memberi efek visual kepada variasi sampel ini di peringkat populasi supaya ia lebih mudah untuk difahami. Kajian ini bertujuan untuk menilai tahap kepelbagaian variasi semula jadi spesies limau nipis. Hasil kajian ini dapat membantu penyelidik untuk merancang dan menentukan saiz populasi yang sesuai untuk dipulihara di bank gen ladang untuk mengelakkan kepupusan spesies limau di Malaysia.

Penyediaan sampel

Pensampelan telah dijalankan pada kawasan yang berbeza dari segi agro-ekologi. Sebelas ekspedisi telah diadakan melibatkan 11 negeri di Semenanjung Malaysia. Pensampelan telah dijalankan secara rawak pada setiap 20 km perjalanan di mana satu sampel keratan daun (10 daun) limau nipis diambil. Sebanyak 196 sampel limau nipis telah diperolehi untuk kajian ini. Titik koordinat setiap lokasi pensampelan direkodkan dan peta taburan titik pensampelan limau nipis dijana menggunakan perisian ArcGIS (*Gambar rajah 1*).



Gambar rajah 1. Taburan 196 titik pensampelan limau nipis di Semenanjung Malaysia

Pemencilan DNA

Pemencilan DNA dilakukan ke atas tisu daun muda menggunakan kaedah pengekstrakan. Satu gram daun yang telah dipotong kecil digiling menjadi serbuk halus menggunakan nitrogen cecair. Serbuk daun kemudiannya dimasukkan ke dalam tiub dan dicampurkan dengan 5 mL penimbal pengekstrakan setiltrimetilammonium bromida (CTAB) yang mengandungi tris-hidrogen klorida (Tris-HCl) (pH 8.0, 100 mM), asid etilena diamina tetraasetik (EDTA) (20 mM), 2% natrium klorida (1.4 M), dan 2% β -mercaptoetanol. Campuran penimbal pengekstrakan CTAB dan tisu tumbuhan seterusnya dieram pada suhu 60 °C selama 30 – 60 minit. Tiub mestilah digoncang setiap 10 minit agar campuran menjadi sehati. Kemudian, 5 mL larutan alkohol kloroform-isoamil (CIA) yang telah dibancuh dengan nisbah 24:1 dicampurkan ke dalam tiub tersebut dan digoncang seketika. Tiub kemudian diempar pada kelajuan 6,000 rpm selama 10 minit pada suhu bilik. Tiga lapisan akan terbentuk selepas pengemparan. Lapisan jernih paling atas akan disedut dan dipindahkan ke tiub baharu. Rawatan menggunakan larutan alkohol kloroform-isoamil diulang sebanyak dua kali supaya larutan jernih dan bersih diperolehi. Selepas itu, larutan jernih tadi ditambah dengan 12.5 μ L enzim Proteinase K (50 μ g/mL) dan dieram pada suhu bilik selama 30 minit. Kemudian, 3 mL isopropanol tulen (100%) sejuk pula dimasukkan ke dalam tiub tersebut dan digoncang perlahan.

DNA dibiarkan untuk mendak pada suhu -20 °C selama 30 minit atau semalaman. Proses pemendakan akan menghasilkan pelet DNA yang boleh diperolehi selepas ia diempar pada kelajuan 6,000 rpm selama 10 minit pada suhu 4 °C. Pelet DNA yang terbentuk kemudian dibersihkan menggunakan 2 mL penimbal basuhan yang mengandungi ammonium asetat (3 M) dan natrium klorida (5 M) diikuti dengan satu lagi pusingan pengemparan pada kelajuan 6,000 rpm selama 10 minit pada suhu 4 °C. Larutan penimbal basuhan seterusnya dibuang dan 10 mL etanol (96%) ditambah ke dalam tiub dan disimpan pada suhu -20 °C selama 60 minit. Kemudian pelet DNA diempar sekali lagi dengan kelajuan dan suhu sama selama 10 minit. Pelet kemudian dicuci dengan 1 mL etanol (70%) dan diempar. Larutan etanol kemudian dibuang dan pelet DNA dikeringkan secara vakum selama 10 minit pada suhu bilik. Akhir sekali, pelet yang telah kering dan bebas etanol dilarutkan dalam 200 μ L penimbal tris-asid etilena diamina tetraasetik (Tris-EDTA) yang mengandungi tris-hidrogen klorida (10 mM) dan EDTA (pH 8.0, 1 mM). DNA kemudian boleh disimpan pada suhu 4 °C untuk membolehkannya larut di dalam penimbal berkenaan.

Amplifikasi tindak balas polymerase berantai (PCR)

Proses amplifikasi telah dijalankan menggunakan isi padu 25 μL untuk setiap tindak balas PCR. Setiap 25 μL mengandungi 2 μL DNA (100 ng/mL), 2.5 μL penimbal PCR (10x), 0.5 uL dNTP (10 mM), 1.0 μL magnesium klorida (50 mM), 2.5 μL primer penanda molekul ISSR (1 μM), 0.25 μL enzim Taq Polymerase (5U) dan 16.25 μL air suling. Protokol PCR melibatkan satu fasa pra-denaturasi awal pada suhu 94 °C selama 3 minit, diikuti oleh 35 kitaran fasa denaturasi (94 °C untuk 30 saat, 72 °C untuk 45 saat, 72 °C untuk 2 minit) dan diakhiri dengan satu fasa akhir pemanjangan pada suhu 72 °C selama 7 minit. Sebanyak 14 primer penanda molekul ISSR telah diuji semasa kajian ini. Namun hanya 10 primer sahaja yang menjana produk PCR (*Jadual 1*). Empat belas primer yang diuji dipilih berdasarkan kajian Fang (1997) yang telah melaporkan penanda molekul ISSR terbaik untuk kajian spesies limau.

Visualisasi gel elektroforesis dan penskoran

Produk PCR yang terhasil semasa PCR mempunyai saiz jalur yang berbeza dan perbezaan ini akan menentukan variasi antara individu tumbuhan. Produk PCR ini hanya boleh dilihat secara visual di bawah sinar ultra ungu setelah ia dicampur dengan pewarna pemuatan yang mengandungi bahan bromofenol berwarna biru dan melalui proses elektroforesis menggunakan gel agaros. Gel yang menunjukkan jalur-jalur produk PCR direkod menggunakan kamera. Penskoran seterusnya dilakukan bagi setiap saiz jalur produk PCR yang ditunjukkan oleh setiap sampel berdasarkan imej yang telah direkod. Saiz setiap jalur akan

Jadual 1. Profil dan parameter kepelbagaian genetik menggunakan penanda molekul ISSR

Primer	Motif berulang jujukan nukleotida	Saiz jalur	JJ	JP	PJP (%)	Kandungan maklumat polimorfik
C1	(TCC) ₅	330 – 1,520	19	19	100	0.4763
C3	(TCC) ₅	340 – 1,500	17	17	100	0.4721
C4	(TG) ₇ T	50 – 1,370	17	17	100	0.463
C5	(AG) ₈ YT	50 – 1,350	23	23	100	0.4763
C8	(CGA) ₅	300 – 2,100	17	17	100	0.4969
C9	(GACA) ₄	230 – 2,020	24	24	100	0.4962
P2	(CA) ₇	50 – 1,200	16	16	100	0.4485
P4	(CA) ₇ T	150 – 2,800	18	18	100	0.4979
P5	(TG) ₇	50 – 1,300	17	17	100	0.4643
P7	(GA) ₈ YG	80 – 1,500	19	19	100	0.4773
Purata	–	–	18.7	18.7	100	0.4766
Ralat piawai						0.004

Nota: Nukleotida A: adenina; nukleotida C: sitosina; nukleotida G: guanina; nukleotida T: timina; nukleotida Y: pirimidina (sebatian berbes yang mengandungi nitrogen dengan struktur heterosiklik di dalam DNA); JJ: jumlah keseluruhan jalur; JP: jumlah jalur polimorfik; dan PJP: peratusan jalur polimorfik.

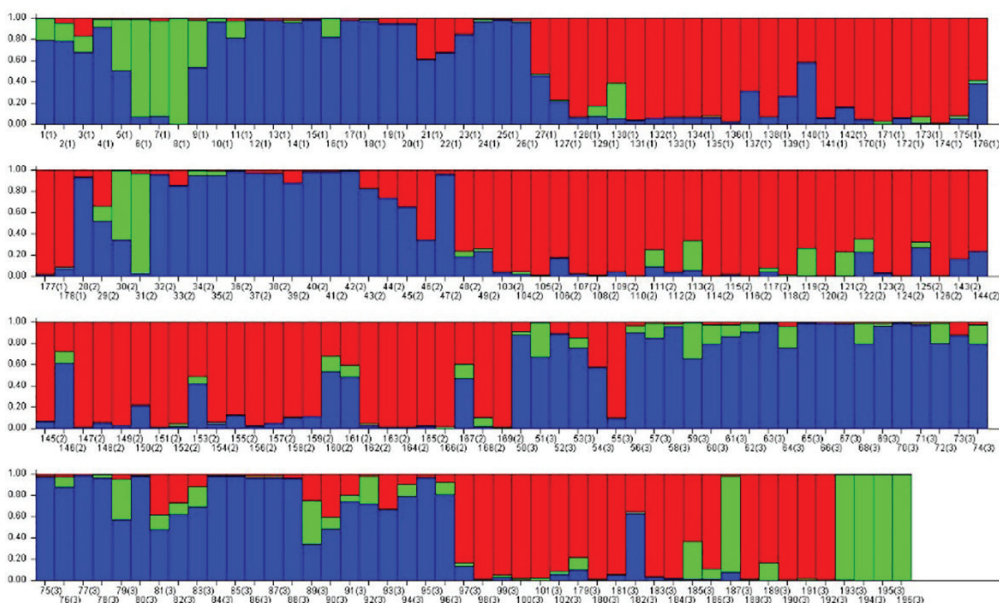
ditentukan menggunakan saiz skala tangga DNA 2-log sebagai rujukan. Sampel yang tidak mempunyai jalur akan diberi skor 0, manakala jalur yang hadir diberi skor 1. Jalur yang hadir dalam setiap sampel dianggap jalur monomorfik. Jalur polimorfik pula merujuk kepada jalur unik atau jalur yang tidak hadir bagi sampel tertentu. Semakin banyak jalur polimorfik diperolehi bagi suatu primer, semakin banyak informasi variasi genetik yang bakal dijana.

Analisis variasi genetik sampel limau nipis

Sejumlah 187 jalur produk PCR telah dicerap melalui proses elektroforesis. Setelah dianalisis, didapati kesemua primer yang digunakan adalah bersifat polimorfik dan primer C4 mempunyai kandungan maklumat polimorfik tertinggi iaitu 0.4979 (*Jadual 1*). Julat saiz jalur ialah 50 – 2800 pasangan bes (*Jadual 1*).

Untuk mengetahui tahap sebenar variasi genetik (genotip) limau nipis di Semenanjung Malaysia berserta gambaran visualnya, perisian STRUCTURE versi 2.3.3 dan program *Structure Harvester* versi 6.0 telah digunakan. Ujian dijalankan sebanyak 11 kali ke atas 196 sampel dan bilangan kumpulan yang optimum yang telah dijana oleh perisian berdasarkan kajian ini ialah tiga ($K = 3$). Ini bermakna, terdapat tiga kumpulan genotip telah dikenal pasti dan setiap warna (merah, biru dan hijau) mewakili satu kumpulan genotip limau nipis (*Rajah 1*).

Terdapat beberapa sampel yang hanya diwakili satu warna genotip, namun, majoriti sampel mempunyai percampuran dua warna genotip atau lebih. Kumpulan I (majoriti genotip biru) diwakili oleh sampel dari Melaka, Negeri Sembilan, majoriti



Rajah 1. Struktur genetik 196 sampel limau nipis di Semenanjung Malaysia menggunakan perisian STRUCTURE versi 2.3.3 dan program *Structure Harvester* versi 6.0. Plot bar mewakili $K = 3$

sampel dari Selangor, Perak, Penang, Kedah dan Perlis. Kumpulan II (majoriti genotip merah) pula telah mengumpulkan sampel dari Kelantan, Terengganu, Pahang dan Johor. Kumpulan III (majoriti genotip hijau) mengandungi sebilangan sampel dari Selangor dan satu sampel dari Negeri Sembilan. Didapati bahawa kumpulan I cenderung ke kawasan pantai barat, manakala kumpulan II cenderung ke kawasan pantai timur. Kumpulan III lebih selektif yang hanya tertumpu di negeri Selangor dan jumlahnya lebih kecil.

Keputusan kajian ini menunjukkan tiada kumpulan yang mengumpulkan sampel mengikut satu warna genotip secara total. Sebaliknya, percampuran warna antara tiga genotip ini menunjukkan bahawa telah berlaku pengacukan (pembaikbakaan) dan penyebaran benih tanaman dijalankan oleh manusia di seluruh Semenanjung Malaysia. Selain itu, limau nipis dan limau kapas yang dilaporkan berbeza fenotip juga tidak berjaya dibuktikan berbeza secara genetik. Ini bermakna variasi fenotip tidak semestinya dapat dibuktikan secara genetik. Variasi fenotip boleh berpunca daripada faktor persekitaran seperti nutrien, pengairan, cahaya dan sebagainya.

Penanda molekul ISSR dan perisian STRUCTURE telah membahagikan sampel kepada kumpulan berbeza bergantung kepada kekerapan relatif alel (alel bermaksud satu daripada sepasang atau lebih ciri keturunan alternatif) dalam suatu populasi. Perbezaan pada faktor dan tekanan ekologi setiap genotip berkemungkinan menyumbang kepada perbezaan struktur genetik dan taburan variasi genetik ini.

Dari segi pemuliharaan spesies pula, strategi pemuliharaan boleh ditumpukan kepada tiga genotip limau nipis yang berada pada lokaliti pantai barat dan pantai timur Semenanjung Malaysia. Ini bagi membolehkan seberapa banyak alel dalam setiap populasi dipulihara. Lebih banyak alel yang dipulihara dalam populasi, lebih banyak ciri keturunan yang boleh dimanipulasi pada masa hadapan menerusi program pembaikbakaan.

Kesimpulan

Penanda molekul ISSR telah berjaya menentukan variasi genotip 196 sampel limau nipis di 11 negeri di Semenanjung Malaysia kepada tiga kumpulan. Pendapat Ridley (1922) yang mengatakan limau nipis mempunyai dua variasi adalah kurang tepat. Program pembaikbakaan limau nipis boleh menggunakan maklumat tiga genotip yang telah dikenal pasti.

Bibliografi

- Baatout, H., Marrakchi, M. dan Pernes, J. (2003). Electrophoretic studies of genetic variation in natural populations of allogamous *Hedysarum capitatum* and autogamous *Hedysarum eupinosissimum*. *Plant Science* 69(1): 49 – 64
- Doyle, J. (1991). DNA protocols for plants. Dalam: *Molecular Techniques in Taxonomy*, (Hewitt, G.M., Johnston, A.W.B. dan Young, J.P.W., ed.), m.s. 283 – 293. Berlin, Heidelberg: Springer
- Fang, D. dan Roose, M. (1997). Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 408 – 417
- Kumar, J. dan Agrawal, V. (2009). Assessment of genetic diversity, population structure and sex identification in dioecious crop, *Trichosanthes dioica* employing ISSR, SCoT and SRAP markers. *Heliyon* 5(3): e01346
- Pritchard, J.K., Stephens, M. dan Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155(2): 945 – 959
- Ridley, H.N. (1922). *The Flora of the Malay Peninsula*. m.s. 359 – 359. L. London: Reeve dan Company.

Ringkasan

Citrus aurantiifolia atau limau nipis adalah tumbuhan asli di Semenanjung Malaysia. Pokoknya bersaiz sederhana sekitar 2 – 5 m dan berbuah sepanjang tahun. Limau nipis mula menghasilkan buah selepas 3 – 4 tahun ditanam dan boleh hidup sehingga 15 tahun. Pokok limau nipis mudah ditemui di laman rumah dan ditanam secara besar-besaran untuk memenuhi permintaan pengguna tempatan. Untuk menambah baik spesies ini, program pembaikbakaan perlu dilakukan. Namun, kajian genetik ke atas spesies ini masih belum banyak dijalankan. Kebanyakan kajian terkini tertumpu kepada prospek biodiversiti dan pembaikbakaan secara in vitro. Kajian genetik penting untuk program pembaikbakaan dan pemuliharaan tanaman. Dalam kajian awalan, didapati limau nipis tersebar luas di seluruh Semenanjung Malaysia. Sebanyak 196 sampel limau nipis dari 11 negeri di Semenanjung Malaysia telah dikumpulkan untuk menilai variasi genetiknya menggunakan 10 penanda molekul Jujukan Inter Ringkas Berulang (ISSR). Hasilnya, 187 jalur polimorfik telah ditemui dan ini memberikan nilai 100% untuk corak jalur polimorfik bagi primer yang digunakan. Analisis menggunakan perisian STRUCTURE (program berasaskan model) pula telah membahagikan 196 sampel limau nipis kepada tiga kumpulan genotip. Penentuan perbezaan genotip yang dikenal pasti boleh membantu kejayaan program pembaikbakaan limau nipis pada masa hadapan. Maklumat ini juga bermanfaat untuk program pemuliharaan tanaman di mana bilangan tumbuhan yang dipulihara boleh dikurangkan tanpa mengancam kepelbagaian spesies dan secara tidak langsung menjimatkan kos penyelenggaraan yang tinggi.

Summary

Citrus aurantiifolia or commonly known as *limau nipis* or lime is indigenous to Peninsular Malaysia. The tree is 2 – 5 m tall and it bear fruits all year round. *Limau nipis* starts to produce fruits 3 – 4 years after planting and its productive years can go up to 15 years. It can be easily found in the village especially in the home garden and grown by growers in big scales to cater demand. Through plant breeding, new varieties of *limau nipis* can be developed specially to increase yield and to build up tolerance and resistance towards pests and diseases. However, genetic study on this species is still limited. Most research on *limau nipis* are still focusing on bioprospection for natural products and in vitro propagation. In the preliminary study, *limau nipis* exhibited wide distribution across Peninsular Malaysia. Consequently, 11 states were randomly surveyed and 196 samples were collected for genetic diversity assessment. The genetic relationship among 196 samples was investigated using inter simple sequence repeats (ISSR). Ten ISSR primers produced 187 polymorphic bands hence revealed 100% polymorphic banding patterns. The STRUCTURE (model-based programme) analysis divided 196 *limau nipis* samples into three groups of genotypes. Different genotypes identified can be used by plant breeders to breed better *limau nipis* in the future. Genebanks on the other hand could conserve the least number of trees for each genotype without jeopardizing its diversity and indirectly reduces the expensive spending of genebanks.

Pengarang

Maya Izar Khaidizar

Pusat Penyelidikan Agrobiodiversiti dan Persekitaran

Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor

E-mel: maya@mardi.gov.my

Mohd Azwan Jaafar

Pusat Pengurusan Sumber Manusia

Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor

Mohd Rafii Yusop (Dr.)

Institut Pertanian Tropika dan Sekuriti Makanan

Universiti Putra Malaysia, 43400 UPM Serdang, Selangor