

Pengenalpastian varieti ubi keledek menggunakan kaedah molekular

(Identification of sweet potato varieties using molecular technique)

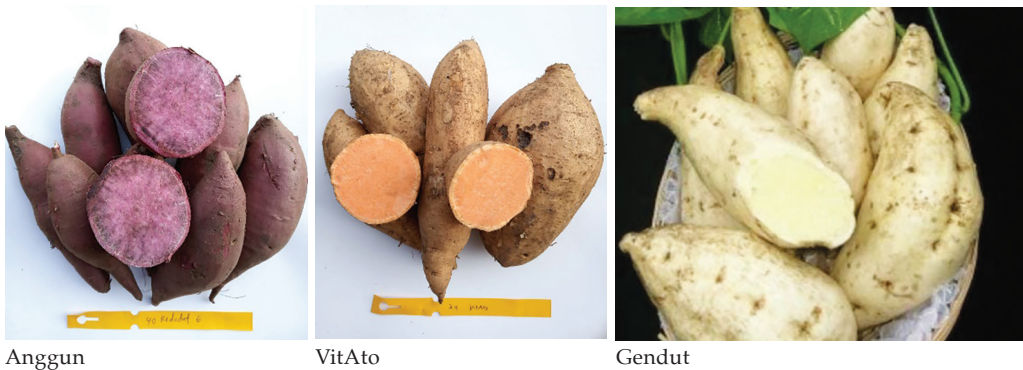
Hayati Ahmad, Nurul Afza Karim, Muhammad Hanif Azhari Noor, Siti Saidah Ibrahim dan Khairun Hisam Nasir

Pengenalan

Ubi keledek (*Ipomoea batatas* L.) merupakan tanaman ubian yang tergolong dalam keluarga Convolvulaceae yang mempunyai banyak kegunaan sama ada dimakan segar atau diproses kepada kanji atau alkohol untuk aplikasi industri guna, makanan ternakan dan industri makanan seperti penghasilan mi, gula-gula, manisan dan tepung. Pada masa kini, ubi keledek merupakan tanaman makanan kelima terpenting di dunia dan ketujuh terpenting di negara membangun. Lebih 95% tanaman ubi keledek dunia ditanam di negara membangun yang diberi perhatian sebagai tanaman makanan 'penyelamat kehidupan'. Di Malaysia, penanaman ubi keledek semakin berkembang apabila kerajaan menggalakkan rakyat Malaysia mengambil ubi keledek sebagai makanan tambahan/suplemen di samping nasi. Selain itu, dari aspek ekonomi ubi keledek juga berpotensi menggantikan tanaman tembakau sebagai tanaman alternatif.

Lapan varieti ubi keledek telah diisytiharkan oleh MARDI sejak 1994. Ini termasuklah varieti Gendut, Telong, Jalomas, VitAto, Anggun 1, Anggun 2, Anggun 3 dan Lembayung. MARDI juga mempunyai hampir 60 aksesori dalam koleksi janaplasmanya. Varieti ubi keledek biasanya dikenal pasti menerusi beberapa ciri morfologi dan agronomi. Ciri-ciri tersebut termasuklah warna daun, bentuk daun, bentuk ubi, warna kulit ubi, warna isi ubi, saiz ubi serta nilai nutrisinya. Ubi keledek mempunyai warna kulit dan isi ubi yang pelbagai, daripada warna putih kepada ungu gelap. Namun begitu, warna isi ubi yang biasa bagi kebanyakan varieti ubi keledek ialah putih ke kuning oren. Misalnya varieti Gendut yang mempunyai kulit ubi berwarna kuning coklat dan isi ubi berwarna kuning. Dua varieti ubi keledek untuk pemprosesan iaitu Telong mempunyai kulit ubi berwarna coklat cair dan isi ubi berwarna putih krim sementara Jalomas mempunyai kulit ungu kemerahan dan isi ubi berwarna oren. Varieti VitAto pula mempunyai kulit ubi berwarna coklat oren dan isi ubi berwarna oren. Varieti ini semakin mendapat perhatian untuk digunakan sebagai bahan mentah dalam industri pemprosesan makanan. Oleh itu, penting untuk membezakannya daripada varieti ubi keledek lain yang mempunyai isi ubi berwarna oren yang seakan sama yang terdapat dalam pasaran tempatan, sebahagiannya dihasilkan oleh peladang tempatan dan sebahagian lagi diimport dari luar negara.

Varieti Anggun pula mempunyai isi ubi berwarna ungu yang kaya dengan kandungan antosianin di samping boleh digunakan sebagai pewarna makanan semula jadi. Antosianin merupakan bahan antioksidan berguna yang mempunyai nilai kesihatan yang sangat baik. Varieti Anggun juga merupakan varieti berhasil tinggi dan sesuai ditanam dalam pelbagai keadaan agroekologi. Varieti ubi keledek yang terbaharu diisytihar oleh MARDI iaitu Lembayung yang mempunyai kulit dan isi ubi berwarna ungu. Tempoh tuaian ubi bagi varieti ini juga singkat iaitu 91 – 105 hari selepas tanam. Varieti ubi keledek Lembayung boleh dimakan secara terus atau diproses menjadi pelbagai produk seperti tepung untuk pracampanan roti, hasil bakeri, puri dan minuman komposit. *Gambar 1* menunjukkan contoh deskripsi ubi keledek menggunakan ciri-ciri morfologi warna isi ubi dan warna kulit ubi.



Gambar 1. Perbezaan varieti ubi keledek Anggun, VitAto dan Gendut dari segi warna isi ubi dan warna kulit ubi

Kepentingan pengenaltastian varieti tanaman: Kaedah morfologi vs kaedah molekular

Kaedah pengenaltastian varieti atau kultivar tanaman yang tepat, pantas, kos efektif dan boleh dipercayai dalam bidang pertanian dan hortikultur adalah perlu untuk tujuan praktikal program pembaikbakaan dan perlindungan *Intellectual Proprietary Rights* (IPR) bagi varieti baharu yang dipanggil hak pembiak baka tanaman atau *Plant Breeder Right* (PBR). Apabila ahli biak baka mempunyai hak ke atas sesuatu varieti atau kultivar, beliau boleh mengenakan royalti ke atas penjualan bahan tanaman tersebut apabila dipropagasi/digandakan atau dibiakkan. Kriteria untuk memperoleh PBR termasuklah perlu memenuhi ujian pembezaan keseragaman dan kestabilan atau *distinctness-uniformity-stability* (DUS). Varieti atau kultivar baharu yang ingin diisytiharkan mestilah berbeza daripada varieti sedia ada, seragam supaya semua individu yang dipropagasi mempunyai ciri seserupa mungkin dan stabil supaya cirinya kekal sama seperti deskripsinya yang spesifik. Kaedah morfologi merupakan kaedah utama dalam pengenaltastian varieti. Namun begitu, ia

mempunyai beberapa kelemahan. Ini termasuklah variasi yang tidak mencukupi untuk membezakan varieti atau kultivar dalam koleksi rujukan (*reference collections*) dan analisis yang subjektif bergantung kepada pengalaman dan kemahiran pencerap atau ahli biak baka. Ciri-ciri morfologi juga dipengaruhi oleh faktor-faktor persekitaran dan amalan pengurusan pertanian. Selain itu, sesetengah ciri atau trait hanya diekspreskan pada tahap perkembangan atau pertumbuhan tertentu tanaman.

Kaedah pengenalpastian varieti tanaman menggunakan kaedah molekular atau cap jari DNA telah terbukti boleh dipercayai, mudah, objektif, konsisten dan sesuai bagi memenuhi tujuan berkenaan. Kuasa diskriminasi yang terbukti menggunakan cap jari DNA dan kos analisis molekular yang semakin menurun menarik minat ahli biak baka untuk memperkukuhkan permohonan mereka bagi perlindungan varieti tanaman dengan mengemukakan data molekular yang menyokong dakwaan ciri perbezaan (*distinctness*) varieti baharu yang mereka hasilkan. Walau bagaimanapun, pihak berkuasa tidak menerima cap jari DNA secara persendirian sebagai bukti identiti unik varieti tanaman untuk tujuan PBR atau perlindungan paten.

Penanda molekular atau cap jari DNA boleh membantu terutamanya untuk membezakan varieti baharu yang terhasil atau diubah suai daripada varieti asal, juga dikenali sebagai *essentially derived varieties* (EDV). EDV atau varieti/kultivar moden biasanya dihasilkan daripada varieti sedia ada yang dilindungi menggunakan kaedah kacuk balik atau pengulangan kacuk balik, kaedah kejuruteraan genetik atau pemilihan titisan tanaman hasil daripada mutasi aruhan atau spontan. EDV biasanya sangat serupa secara morfologi dengan varieti sedia ada yang dilindungi, tetapi mempunyai perbezaan yang mencukupi secara genotip untuk mewajarkan pemberian nama varieti baharu. Bagi EDV yang terhasil secara kacuk balik, kawasan yang diintrogres adalah unik. Bagi varieti tanaman yang terhasil secara transgenik, jujukan transgen dan tapak integrasinya boleh digunakan sebagai penanda pengenalpastian yang spesifik. Cap jari DNA boleh menjadi sebahagian daripada pasport bagi varieti yang telah mempunyai deskripsi yang baik dan jelas, asalkan terdapat perbezaan antara EDV dan varieti asal. Walau bagaimanapun, kaedah molekular atau cap jari DNA sama sekali tidak boleh menggantikan kaedah atau ciri-ciri morfologi kerana perbezaan pada penanda DNA tidak semestinya melambangkan perbezaan dari segi morfologi.

Terdapat pelbagai penanda molekular yang boleh digunakan oleh ahli biak baka, penyelidik atau saintis. Pemilihan penanda DNA untuk pengenalpastian varieti bergantung kepada beberapa faktor. Ini termasuklah skala dan tujuan pengenalpastian varieti dilakukan. Bagi cap jari DNA secara umum untuk set janaplasm berskala kecil, sebarang kaedah molekular yang memberikan kepelbagaian penanda yang mencukupi boleh diterima. Walau bagaimanapun, jika pengenalpastian varieti atau kultivar dijalankan ke atas sejumlah besar varieti/kultivar yang berdaftar

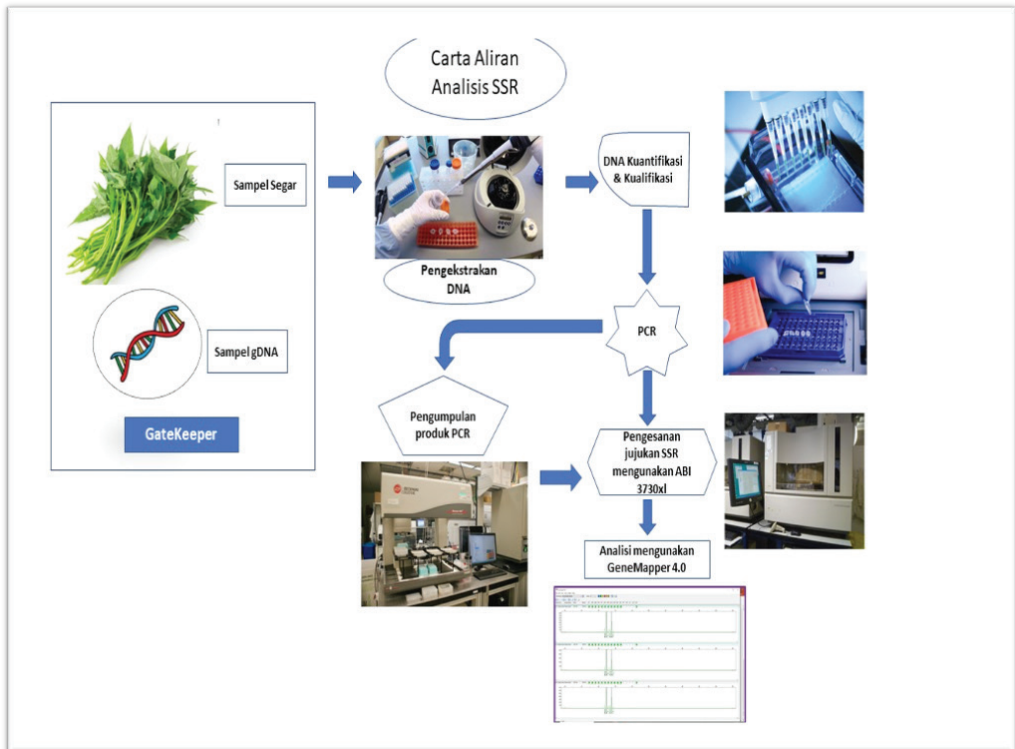
dan profil DNA bagi setiap varieti ingin disimpan dalam pangkalan data, kebolehulangan dan keupayaan pembezaan penanda DNA yang dipilih adalah sangat penting. Penanda jujukan berulang ringkas atau *Simple Sequence Repeat* (SSR) dan polimorfisma nukleotida tunggal atau *Single Nucleotide Polimorphism* (SNP) merupakan penanda pilihan dan sesuai untuk tujuan berkenaan kerana mempunyai beberapa kriteria seperti yang berikut: 1) Maksimum variasi antara varieti atau kultivar, 2) Minimum variasi dalam varieti atau kultivar, 3) Stabil dalam persekitaran yang berbeza, 4) Boleh diulang secara eksperimen.

Kaedah molekular untuk pengenalpastian varieti ubi keledek di Makmal Penemuan dan Penentusahan Penanda Molekul atau Centre for Marker Discovery and Validation (CMDV)

Penanda DNA jujukan berulang ringkas atau SSR telah dipilih dan digunakan untuk pengenalpastian varieti ubi keledek di makmal CMDV, MARDI. SSR adalah regangan 1 – 6 nukleotida yang berulang secara terangkai dan tersebar secara meluas dalam genom tanaman dan haiwan. SSR sangat polimorfik disebabkan kadar mutasi tinggi yang memberi kesan kepada bilangan unit berulang. Variasi atau polimorfisme dalam saiz atau panjang jujukan berulang berkenaan boleh dikesan dalam gel agarosa, gel resolusi tinggi seperti gel penjujukan atau sistem kapilari. Di CMDV, alat ABI3730xl yang berasaskan sistem kapilari digunakan untuk mengesan penanda SSR. Saiz SSR berbeza pada individu berlainan yang dikesan oleh alat berkenaan dipanggil alel. Penanda SSR menghasilkan alel atau kombinasi alel unik bagi individu-individu yang disaring menjadikan ia satu sistem yang ideal untuk pengenalpastian varieti. SSR mempunyai beberapa kelebihan berbanding dengan penanda molekul yang lain. Antaranya seperti yang telah dijelaskan, SSR sangat polimorfik dan terdapat dalam kuantiti yang besar dan tersebar secara meluas dan serata di dalam genom. Ia juga diwariskan secara ko-dominan yang memberikan lebih banyak maklumat apabila analisis data dijalankan, berbanding dengan penanda molekul bersifat dominan seperti *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) atau *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD). Analisis SSR juga memerlukan DNA dalam kuantiti yang kecil dan pengesanan serta analisis boleh dijalankan menggunakan platform berskala tinggi. *Carta alir 1* menunjukkan analisis SSR secara umum.

Analisis SSR melibatkan langkah-langkah berikut: Pemilihan primer yang sesuai, pengekstrakan DNA daripada sampel daun yang segar, penentuan kuantiti dan kualiti DNA, tindak balas berantai polymerase (PCR), pengumpulan produk PCR yang dilabel dengan pewarna berpendaflour yang berlainan, pengesanan jujukan SSR menggunakan platform ABI 3730xl dan akhir sekali analisis data menggunakan *GeneMapper 4.0*.

Maklumat jujukan primer penanda SSR pelbagai tanaman boleh diperoleh daripada pangkalan data awam atau jurnal penerbitan berkaitan tanaman dan bidang yang dikaji. Faktor



Carta alir 1. Analisis SSR di Makmal CMDV, MARDI

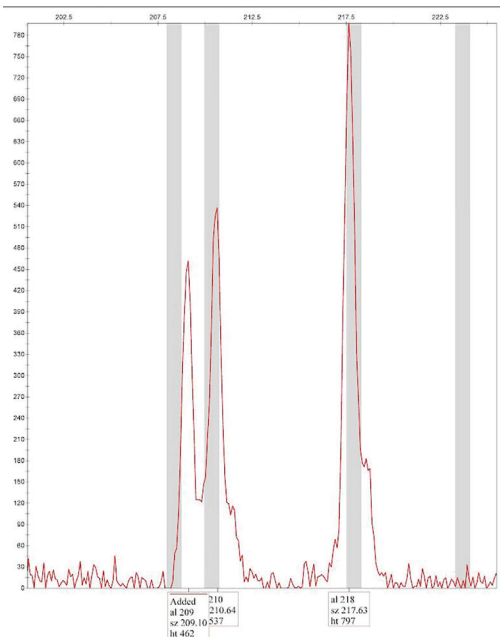
yang diambil kira dalam pemilihan primer adalah kemudahan penskoran, tahap polimorfisme yang dikesan pada panel ujian, nilai kandungan maklumat polimorfik atau *polymorphic information content* (PIC), taburan alel dan tahap kesan kegagapan atau *stuttering effect*. Senarai primer untuk sintesis ditempah daripada pembekal oligosintesis. Terdapat dua jenis primer yang digunakan untuk pengesanan amplicon DNA menggunakan platform ABI3730XL iaitu primer tidak berlabel dan primer yang dilabel dengan pewarna berpendaflour (FAM, NED, VIC atau PET) yang mempunyai panjang gelombang yang berbeza. Hanya primer hadapan yang dilabel dengan pewarna berpendaflour. Pewarna LIZ yang merupakan saiz standard ditambah kepada semua sampel sebelum pengesanan bertujuan untuk menganggar saiz fragmen yang digandakan dalam setiap sampel. Penggunaan empat pewarna berpendaflour ini membolehkan penanda SSR dianalisis dengan efisien secara multipleks. Pewarna berpendaflour adalah sensitif kepada cahaya, oleh itu langkah berjaga-jaga perlu diambil semasa mengendalikan primer berkenaan terutamanya semasa penyediaan PCR.

Pengekstrakan DNA dilakukan ke atas sampel daun segar menggunakan protokol standard ekstraksi DNA di Makmal CMDV. Pengekstrakan DNA biasanya merupakan tugas pertama dalam pelaksanaan projek. Adalah penting untuk memastikan

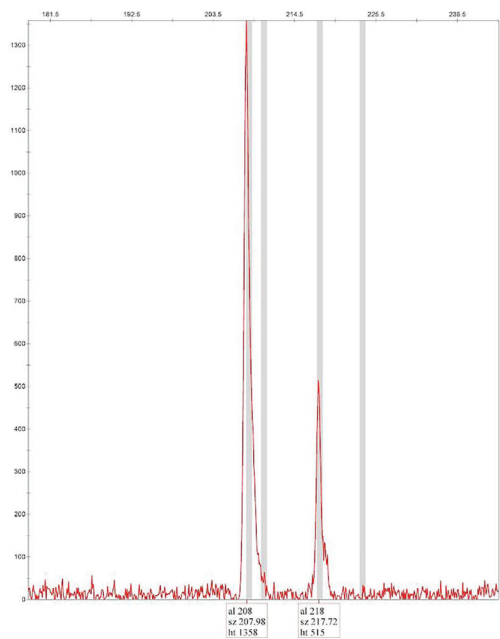
kualiti dan integriti DNA yang baik diperolehi dengan penggunaan sampel segar dan mematuhi protokol pengekstrakan DNA yang telah ditetapkan. Kepekatan DNA ditentukan menggunakan protokol yang menggunakan larutan Hoechst 33258 dan diukur menggunakan Nanodrop. Kualiti DNA yang diekstrak ditentukan menggunakan elektroforesis gel agarosa.

Tindak balas berantai polymerase atau *polymerase chain reaction* (PCR) adalah proses di mana primer yang dipilih akan mengamplifikasikan kawasan spesifik segmen DNA yang mengandungi jujukan SSR sasaran. Perbezaan saiz fragmen yang terhasil dalam varieti yang berlainan akan menunjukkan polimorfisme bagi varieti yang disaring. Pengesanan hasil PCR iaitu amplicon fragmen DNA yang dilabel secara floresen dijalankan menggunakan alat DNA 3730XL *Applied Biosystems* yang dikendalikan secara automatik, berskala tinggi dan menggunakan sistem elektroforesis kapilari. Sampel disuntik secara elektrokinetik ke dalam kapilari yang mengandungi polimer. Seterusnya voltan tinggi dikenakan untuk menggerakkan fragmen DNA merentasi polimer. Elektroforesis kapilari ini dapat membezakan molekul DNA yang berbeza berat molekul hanya satu nukleotida. Apabila sampel merentasi sinaran laser, pengesanan optikal akan membaca setiap fragmen. Sampel yang disuntik bersama-sama standard saiz molekular yang dapat dikesan secara serentak menjadikan penentuan alel lebih sensitif dan tepat. Data mentah yang terhasil dikumpulkan bagi kesemua kapilari dan kemudiannya dianalisis menggunakan perisian *GeneMapper 4.0*.

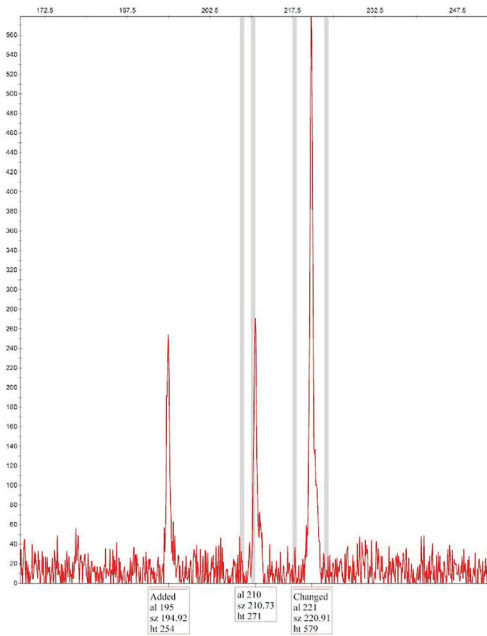
Tiga puluh dua aksesori ubi keledek yang telah dikumpulkan daripada germplasma MARDI, Bachok, Kelantan telah melalui protokol standard pengenalanpastian varieti menggunakan primer-primer SSR terpilih seperti yang telah diterangkan di atas. Dimulai dengan pengekstrakan DNA, tindak balas PCR, elektroforesis kapilari menggunakan alat DNA 3730XL *Applied Biosystems* seterusnya analisis data menggunakan perisian *GeneMapper 4.0*. Penanda SSR yang dipilih telah berjaya membezakan kesemua aksesori ubi keledek dalam germplasma MARDI. Ini termasuklah varieti ubi keledek yang telah diisytiharkan oleh MARDI iaitu Anggun 1, Anggun 2, Anggun 3, VitAto dan Gendut. Penanda SSR C43, J175, C8 dan C48 telah dipilih untuk membina cap jari unik bagi setiap aksesori. Kombinasi primer C43 dan J175 memadai untuk membezakan kesemua aksesori ubi keledek yang disaring. Walau bagaimanapun, penanda SSR tambahan C8 dan C48 akan memberikan maklumat yang berguna untuk menyokong pangkalan data cap jari ubi keledek yang dibina. *Rajah 1* menunjukkan elektroferogram bagi varieti Anggun, VitAto dan Gendut yang terhasil menggunakan primer SSR C43.



Anggun



Gendut



VitAto

Rajah 1. Elektroferogram bagi varieti Anggun, VitAto dan Gendut yang terhasil menggunakan primer SSR C43

Kesimpulan

Kaedah molekular menggunakan penanda SSR untuk pengenalpastian varieti ubi keledek merupakan kaedah yang tepat, konsisten, efisien dan boleh dipercayai. Ia boleh digunakan bersama-sama dengan kaedah morfologi untuk aplikasi dalam program pembaikbakaan atau tujuan perlindungan varieti tanaman (*Plant Breeder Right*). Aliran kerja dan kaedah protokol standard yang telah dibina bagi pengenalpastian varieti ubi keledek ini boleh juga digunakan untuk pengenalpastian varieti tanaman lain. Perbezaannya hanyalah pemilihan primer yang digunakan perlu spesifik mengikut tanaman yang disaring atau dikaji.

Bibliografi

- Hayati, A., Tan, S.L. dan Umi Kalsom, A.B. (2010). Identification of sweet potato varieties using microsatellite markers. *Biotechnology Symposium IV: Harnessing Biological Resources Through Biotechnology*. 1 – 3 Disember 2010, UMS, Sabah
- Hu, J., Nakatani, M., Mizuno, K. dan Fujimura, T. (2004). Development and characterization of microsatellite markers in sweet potato. *Breeding Science* 54: 177 – 188
- Karuri, H.W., Ateka, E.M., Amata, R., Nyende, A.B., Muigai, A.W.T., Mwasame, E. dan Gichuki, S.T. (2010). Evaluating diversity among Kenyan sweet potato genotypes using morphological and SSR markers. *Int. J. Agric. Biol.* 12: 33 – 38
- Lee, S.Y., Tan, S.L., Mooi, K.C., Abdul Aziz, A.M. dan Zaharah, A. (2002). The suitability of sweet potato varieties Telong and Jalomas for snack and ready-to-eat breakfast food with reference to organoleptic evaluation. *J. Trop. Agric. and Fd. Sc.* 30(1): 109 – 118
- Liu, K. dan Muse, S.V. (2005). Power Marker: An Integrated Analysis Environment for Genetic Marker Analysis. *Bioinformatics* 21: 2,128 – 2,129
- Ngailo, S., Shimelis, H., Sibiya, J., Amelework B. dan Mtunda, K. (2016). Genetic diversity assessment of Tanzanian sweetpotato genotypes using simple sequence repeat markers. *South Afr. J. Bot.* 102: 40 – 45
- Yang, X.S., Su, W.J., Wang, L. J., Lei J., Chai, S.S. dan Qing-chang Liu, Q.C. Molecular diversity and genetic structure of 380 sweetpotato accessions as revealed by SSR markers. *Journal of Integrative Agriculture* Vol. 14, Issue 4: 633 – 641

Ringkasan

Pengenalanpastian varieti ubi keledak biasanya berasaskan kepada ciri-ciri morfologi dan agronomi. Ini termasuklah jenis dan warna pucuk, warna daun, bentuk daun, bentuk ubi, warna kulit ubi, warna isi ubi, saiz ubi serta nilai nutrisinya. Sementara data morfologi dan agronomi boleh dipengaruhi oleh faktor-faktor persekitaran, maklumat genomik atau molekular tidak dipengaruhi oleh faktor-faktor luaran berkenaan. Profil SSR bagi 32 aksesori ubi keledak dalam germplasma MARDI telah berjaya dibangunkan menggunakan 31 pasang pencetus SSR. Empat primer teras C43, J175, C8 dan C48 telah digunakan untuk membangunkan cap jari DNA yang unik bagi setiap aksesori ubi keledak dalam germplasma MARDI. Ini termasuklah varieti ubi keledak yang telah diisytiharkan oleh MARDI iaitu Anggun 1, Anggun 2, Anggun 3, VitAto dan Gendut. Kaedah molekular berguna untuk membangunkan pangkalan data SSR bagi ubi keledak yang boleh digunakan untuk perlindungan varieti, analisis kepelbagaian genetik koleksi baharu atau aplikasi pembaikbakaan molekular pada masa hadapan.

Summary

Characterisation of sweet potato varieties are normally based on morphological and agronomic characteristics. These include vine type, shoot colour, leaf shape and colour, tuber flesh colour, tuber skin colour, tuber shape, size and nutritional values. While morphological and agronomic data might be influenced by environmental conditions, the genomic or molecular information is not. SSR profiling for 32 sweet potato accessions in MARDI germplasm were successfully developed using 31 SSR primer pairs. Four SSR core primers C43, J175, C8 and C48 were used to construct a unique DNA fingerprinting for each sweet potato accession in MARDI germplasm, including those released by MARDI (Anggun 1, Anggun 2, Anggun 3, VitAto and Gendut). Molecular technique is useful for SSR database development in sweet potato that can be further utilised for varietal protection, genetic diversity analysis of a new collection or future molecular breeding applications.

Pengarang

Hayati Ahmad

Pusat Penyelidikan Bioteknologi dan Nanoteknologi, Ibu Pejabat MARDI

Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor

E-mel: hayati@mardi.gov.my

Nurul Afza Karim

Pusat Penyelidikan Tanaman Industri

Stesen MARDI Bachok, 16310 Kelantan

Muhammad Hanif Azhari Noor, Siti Saidah Ibrahim dan Khairun Hisam Nasir (Dr.)

Pusat Penyelidikan Bioteknologi dan Nanoteknologi, Ibu Pejabat MARDI

Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor