

Aplikasi teknologi penanda molekul bagi pengenalan padi aroma daripada germplasma padi tradisional Malaysia

(Application of molecular markers technology for the identification of aromatic rice from Malaysian traditional rice germplasm)

Nor Helwa Ezzah Nor Azman, Mohd Shahril Firdaus Ab Razak, Alny Marlynni Abd Majid, Mohamad Zulfadli Kamarudin dan Site Noorzuraini Abd Rahman

Pengenalan

Padi (*Oryza sativa* L.) merupakan satu tanaman makanan bijirin yang penting di kebanyakan negara-negara Asia khususnya di Malaysia kerana nasi merupakan makanan ruji bagi majoriti penduduk. Terdapat dua subkumpulan beras aroma iaitu beras aroma dan beras tanpa aroma. Lazimnya, aksesori padi aroma mengeluarkan hasil yang lebih rendah berbanding dengan aksesori padi biasa seperti KDML, MRQ 76 dan MRQ 74. Tambahan lagi, kebanyakan padi aroma beradaptasi dan sesuai dengan keadaan persekitaran tertentu sahaja. Walaupun begitu, aksesori beras aroma lebih disukai berbanding dengan beras tanpa aroma kerana berkualiti tinggi, wangi dan tekstur nasinya yang lembut. Aroma, tekstur dan rasa beras aroma yang enak telah menyumbang kepada peningkatan permintaan di peringkat tempatan dan global seterusnya memainkan peranan penting dalam perdagangan beras global.

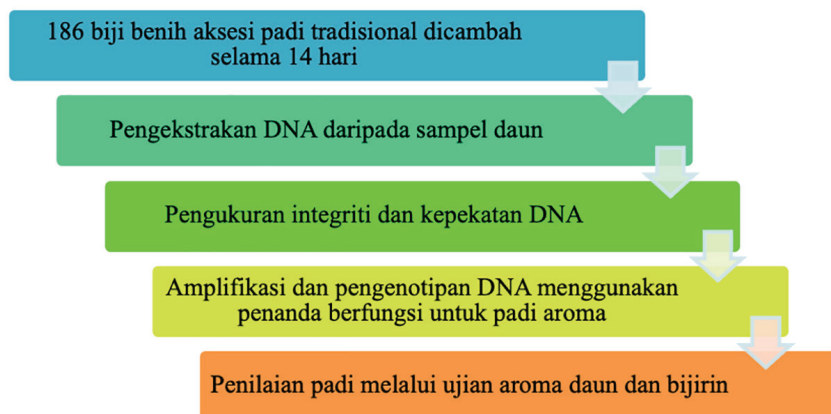
Terdapat beberapa pendekatan yang digunakan bagi pengenalan dan pencirian beras aroma. Sebagai contoh, melalui proses kunyahan nasi, rebusan bijian atau bahagian tanaman tertentu dengan menggunakan larutan KOH dan menghidu bau beras tersebut. Namun, pendekatan deria mempunyai kekangan yang mempengaruhi kebolehpercayaannya dan kebolehlaksanaan dapatan kajian terutama apabila melibatkan jumlah sampel yang besar. Di samping itu, pendekatan konvensional yang digunakan bagi mengenal pasti beras aroma adalah lebih mencabar kerana kesan persekitarannya yang negatif dan keterwarisan rasa aroma yang sangat rendah. Sehingga kini, penanda berfungsi berdasarkan jujukan genomik berperanan sebagai kaedah yang lebih mapan bagi penilaian sumber genetik padi beraroma. Penggunaan penanda berfungsi genomik yang berkaitan dengan ciri aroma lebih menguntungkan dari segi kebolehlaksanaan hasil yang tepat dan konsisten, dan kemalaran walaupun pada fasa, masa dan persekitaran yang berbeza.

Kehadiran gen betain aldehid dehidrogenase (BADH2) (*fgr/badh2/os2AP/osbadh2*, LOC_Os08g0424500) yang mengalami mutasi dan diekspreskan pada kromosom 8 dalam keadaan resesif homozigot telah dikenal pasti terlibat dalam pengawalan ciri aroma beras. Selain itu, enzim BADH2 didapati berfungsi bagi menghalang biosintesis unsur utama aroma atau secara

khususnya pada sebatian aroma yang dikenali sebagai 2-asetil-1-pirolina (2AP). Aksesori padi aroma menunjukkan salinan gen pemotongan lapan pasangan bes (8bp) pada jujukan gen BAD2 yang menyebabkan mutasi anjakan rangka dan telah menghalang aktiviti enzim BADH2 berbanding dengan aksesori padi tanpa aroma yang menunjukkan salinan gen berfungsi lengkap dan mengekod gen BAD2.

Padi tradisional memainkan peranan penting sebagai takungan gen sumber genetik yang rintang dan toleran terhadap tekanan biotik dan abiotik, berkualiti dari segi rasa dan kandungan nutrien serta berkebolehan beradaptasi. Sumber genetik padi tradisional ini sesuai dijadikan induk penderma kerana mempunyai kebolehan beradaptasi dengan ekosistem setempat atau dijadikan aksesori alternatif sekiranya dapat mengeluarkan hasil yang setara dengan aksesori moden. Pembaikbakaan tanaman menggunakan padi tradisional sebagai induk penderma bagi memindahkan gen-gen yang dikehendaki ke dalam aksesori moden supaya dapat menghasilkan aksesori yang superior bersama ciri-ciri yang diinginkan.

Oleh itu, kajian pengenaltastian beras aroma melalui germplasma padi tradisional Malaysia telah dijalankan dengan menggunakan penanda molekul berfungsi yang mensasarkan polimorfisme berfungsi gen BADH/Fgr kerana menawarkan satu kaedah yang lebih tepat dan efisien. Pengenaltastian kehadiran gen badh yang resesif melalui pendekatan penanda molekul berfungsi telah dijalankan ke atas germplasma padi tradisional Malaysia yang terdiri daripada 186 aksesori (*Carta alir 1*). Kesemua aksesori tersebut diperolehi dari Pusat Bank Gen, MARDI Seberang Perai. Dua fasa pengenaltastian telah dijalankan bagi mengenal pasti kehadiran alel yang mewakili ciri aroma beras. Bagi fasa penyaringan pertama, kehadiran alel fgr/fgr dikenal pasti melalui penyaringan molekular daripada semua aksesori padi tradisional. Pada fasa penyaringan kedua pula, aksesori yang menunjukkan kehadiran aroma berdasarkan saringan penanda DNA melalui proses penilaian kimia dengan menggunakan larutan KOH pada



Carta alir 1. Pembangunan penanda molekul

daun set germplasma untuk mengesahkan kehadiran aroma pada germplasma padi tersebut.

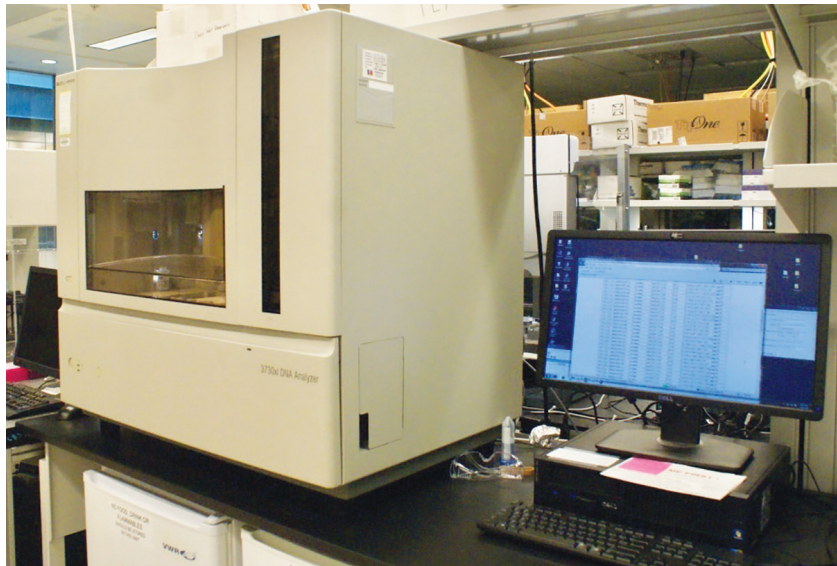
Biji benih bagi 186 aksesori padi tradisional ditambah selama 14 hari. Selepas itu, DNA diekstrak daripada daun muda bagi setiap tiga anak pokok yang seragam. MRQ 76 dan MR 303 dijadikan sebagai varieti kawalan positif dan negatif. Kedua-duanya merupakan varieti komersial beras putih di Malaysia, tetapi MRQ 76 adalah varieti beraroma, manakala MR 303 merupakan varieti tanpa aroma. Setelah pengekstrakan DNA dilakukan, gel agarose 0.8% digunakan untuk mengukur integriti DNA manakala 'Fluorescent Ascent' (Thermo Fisher Scientific, US) digunakan untuk mengukur kepekatan DNA. Dua penanda berfungsi iaitu Badex7-5 dan FMBadh2-E7 telah digunakan untuk menyaring kehadiran alel *Fgr/fgr* dalam sampel padi tradisional yang dipilih (Jadual 1). Reaksi rantai polimerase (PCR) dijalankan dengan bantuan pencetus M13 sebagai adaptor sebagai salah satu pasangan pencetus dan juga pada pewarna pendarfluor. Selepas itu, produk PCR dimultipleks dan dicampurkan dengan formamida Hi-Di dan GeneScan 500 LIZ sebelum produk dilarikan dengan menggunakan pelantar ABI 3730xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) (Gambar 1). Saiz alel ditentukan menggunakan perisian GeneMapper versi 5 (Thermo Fisher Scientific, Amerika Syarikat). Ujian aroma daun dan bijirin yang dijalankan bagi setiap aksesori yang menunjukkan kehadiran aroma berdasarkan kaedah saringan melalui penanda molekul SSR.

Pencirian 186 germplasma padi tradisional Malaysia menggunakan secara teknik molekul dengan menggunakan dua penanda berfungsi iaitu Badex7-5 dan FMBADH2-E7 telah menunjukkan konsistensi kedua-dua penanda dalam menghasilkan alel. Seperti yang ditunjukkan pada Rajah 1, penyaringan menggunakan kedua-dua penanda molekul berfungsi telah menunjukkan hasil seperti berikut (Jadual 2): (1) 24 aksesori padi tradisional yang menunjukkan kehadiran alel *fgr/fgr* (12.9%); (2) 149 aksesori padi tradisional yang menunjukkan kehadiran alel *Fgr/Fgr* (80.1%); (3) 13 aksesori padi tradisional yang menunjukkan kehadiran alel *Fgr/fgr* (7.0%). Perincian pemisahan alel bagi setiap padi tradisional diringkaskan seperti dalam Rajah 2. Aksesori padi beraroma menunjukkan saiz alel yang kurang 8 bp aksesori berbanding dengan aksesori padi yang tidak beraroma.

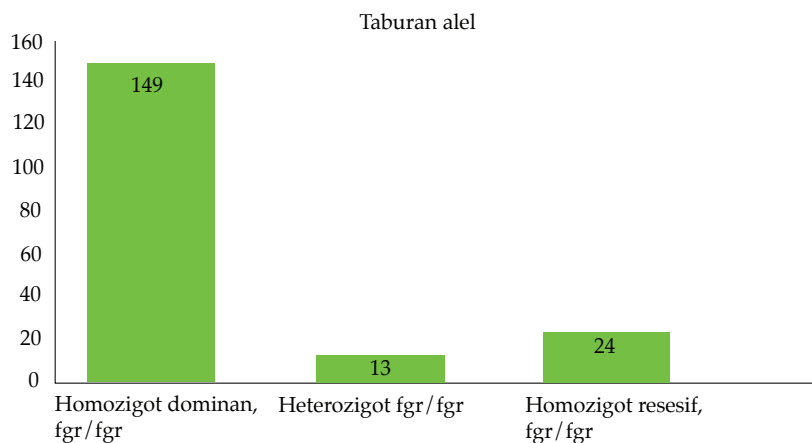
Jadual 1. Senarai pencetus untuk amplifikasi penanda berfungsi yang digunakan untuk menyaring kehadiran alel *Fgr/fgr*

Primer	Jujukan	Saiz*
Badex7-5	F: TGTTTTCTGTTAGGTTGCATT	112 bp (<i>fgr</i>);
	R: ATCCACAGAAATTTGGAAC	120 bp (<i>Fgr</i>)
FMBadh2-E7	F: GGTTCATTTACTGGGAGTT	277 bp (<i>fgr</i>);
	R: CAGTGAAACAGGCTGTCAAG	285 bp (<i>Fgr</i>)

*Saiz termasuk jujukan M13 yang diligasikan pada pencetus dan pewarna pendarfluor



Gambar 1. Mesin ABI 3730xL Genetic Analyzer yang digunakan untuk pengenotipan



Rajah 1. Taburan alel Fgr/Fgr, Fgr/fgr dan fgr/fgr bagi 186 aksesori padi tradisional

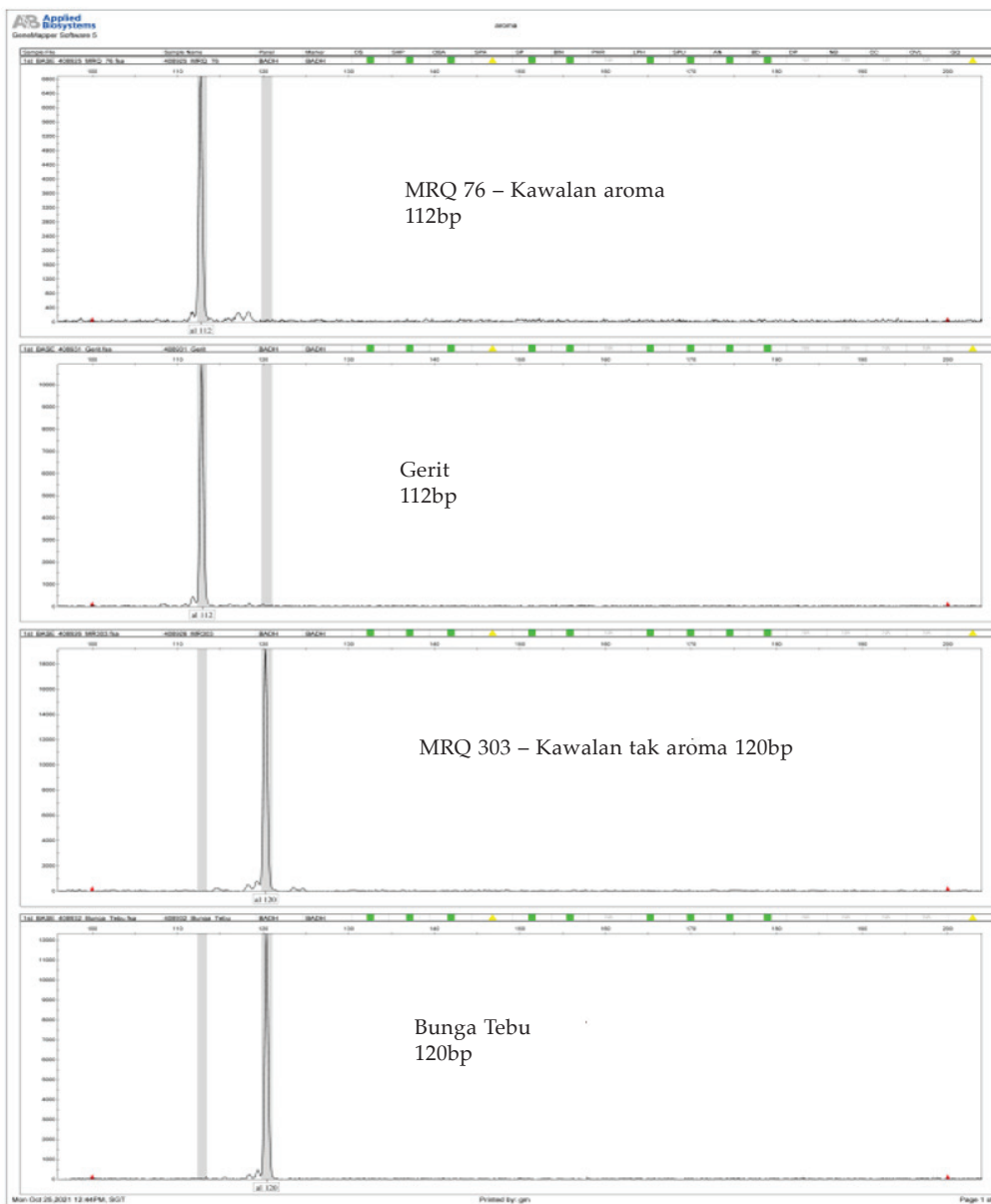
Gen *badh/fgr* ini bersifat resesif, maka hanya aksesori yang mewarisi alel resesif sahaja yang akan membawa ciri aroma iaitu sebanyak 24 germplasma padi tradisional sahaja yang diteruskan dengan saringan melalui deria rasa. Hasil kajian mendapati, pemotongan 8 bp di ekson 7 juga memainkan peranan yang penting dalam ciri aroma pada kebanyakan varieti padi termasuk beras Basmati dan Jasmine. Namun, aksesori dengan alel *Fgr/Fgr* dan alel *Fgr/fgr* mungkin dijangka mempunyai ciri aroma sekiranya terdapat gen-gen novel atau gen lain yang mengawal ciri aroma padi tersebut dalam aksesori padi tradisional Malaysia. Walaupun begitu, aksesori ini tidak mengandungi alel *fgr/fgr* yang bertanggungjawab secara menyeluruh dalam mengawal atur ciri

Jadual 2. Ringkasan alel Fgr/Fgr, Fgr/fgr dan fgr/fgr bagi 186 aksesori padi tradisional

Alel	Aksesori
<i>Fgr/Fgr</i>	MR303, Rambut, Opurak, Bunga Tebu, Kinabalu, Kajang, Jambi, Radin Ebos 41, Majat D, Tapan A, Anak China, Ruan, Badak, Pulut Tempunai, Berteh, Pulut Hitam, Padi Gamen, Bulat, Ubat, Geli 25, Taring Pelanduk, Putih (Huma), Pulut Manis, Jambok, Jabat, Langkatan A, Pulut Hitam Siam, Sat 4, Ranjam, Muar 1, Padi Gunong, Padi Huma, Patih II, Ulat Kuning, Dari, Wangi Puteh, Pulut Hitam Beras, Batu, Dara, Pulut Kurau, Sambung, Pulut Siaman, Kutip 2, Jenaga, Pulut Hitam Dukung, Kepak, Pulut Kijang, Serendah Kemboja, Pulut Merah 3, Rengan Wangi, Nangka Wangi 1, Buah Rotan, lenggong, Putih, Radin, Kao Pom, Merah Wangi 1, Pulut Pujoh 2, Pulut Tupai 1, Rambut Hitam, Mansau, Engkabang, Pulut Wan, Perempong, Pingkak, Belau, Bisbang, Berangan, Lantit, Kasua, Kepapa, Mama, Abong, Aboy, Sensay, Bidong A, Buntar A, Rambutan, Sadong, Sampong, Sebulu B, Seriap, Siam ER 72, Siamoi, Lilu, Tropik, Manik Siam, Manik 144, Mek Bujang Kelsom, Radin Kepek 130, Musang B, Pandan Gelap 149, Kolias, Kontol, Kontor, Kuattek, Lawang Lawi 99, Lawang Lawi 168, Lawang Lawi, Lebai Yaakub, Lekon, Lekon 55, Jintan Putih, Jintan Merah, Bemban, Genan, Gambunt, Buntol, Buis, Guabon H, Cheloring, China, Huma Kuning, Huma Wangi, Tingkang, Ruabon, Ulat, Chali, Gayo Vato, Che Lawi 16, Kedah, Jalil 14, Anak Puteh, Bodong, Bingka Petani, Biankok, Berayong, Gansayut, Belut Kuning, Cempaka 173, Anak Ru, Katimun, Dongkong, Pulut Minyak, Poturu, Kadungkang, Tarat, Pulut Pelanduk, Pulut, Pulut Pisang, Huma Lenggong 2, Panji Putih, Panji Halus, Kemaman 7, Undus
<i>Fgr/fgr</i>	Tega, Kurau, Campa, Buku Rotan 3, Pulut Simanggang, Pulut Hitam (Aroma), Langsat, Cepa, Ubak Babui, Rotan, Bawang, Sia Langit, Jambak
<i>fgr/fgr</i>	MRQ 76, Gerit, Kuku Belang, Gemalah, Piya, Bidor, Lebar 1, Kuku Balam 1, Gerik, Selayang, Pulut Coreng, Buih, Resid, Bongkok, Pok, Raya, Langkatan A, Mau, Sedong, Merjat, Kunyit, Hitam, Angkalias, Karok, Rantai

aroma padi. Secara kesimpulannya, kajian ini berjaya mengenal pasti sumber baharu aksesori padi aroma yang sesuai digunakan dalam program pembaikbakaan padi melalui pembiakbakaan berbantuan penanda (MAB).

Secara keseluruhannya, hasil ujian aroma daun dan bijirin menunjukkan hasil yang sama dan konsisten dengan hasil saringan melalui kedua-dua penanda DNA berfungsi bagi gen *badh/fgr*. Ini menunjukkan bahawa penanda tersebut sesuai digunakan dalam program MAB bagi menghasilkan varieti beraromatik yang berhasil tinggi. Penggunaan pendekatan pembiakbakaan secara konvensional ataupun penilaian ciri fenotip secara konvensional untuk ciri-ciri kualiti adalah sangat mencabar kerana proses penilaian ini hanya dapat dijalankan setelah pokok



Rajah 2. Segregasi alel bagi penanda Badex7-5

tersebut dituai terlebih dahulu. Penggunaan penanda DNA ini menawarkan satu kaedah yang lebih efektif dari segi kos dan masa. Di samping itu, aplikasi MAB juga dapat menggalakkan produktiviti, kebolehpercayaan dan konsistensi program pembiakbakaan bagi membangunkan padi yang berkualiti walaupun dalam keadaan persekitaran yang berbeza dan tidak menentu. Kajian terdahulu telah menunjukkan keberkesanan MAB dalam meningkatkan kualiti aksesori beras aroma. Kesesuaian MAB untuk mengenal pasti kehadiran alel BADH dalam beras aroma daripada koleksi germplasma yang besar juga ditunjukkan dalam kajian semasa yang menonjolkan potensinya untuk genotip rutin berskala besar bagi ciri-ciri rasa dalam pembiakbakaan dan germplasma.

Kesimpulan

Padi merupakan makanan ruji di seluruh dunia dan secara khusus berperanan dalam pembangunan ekonomi Malaysia. Laporan perangkaan bagi suku pertama tahun 2021 menganggarkan jumlah penduduk di Malaysia adalah seramai 32.75 juta orang. Bagi memenuhi keperluan penduduk yang kian meningkat dan cita rasa pengguna yang pelbagai, kira-kira 30 – 40% bekalan beras Malaysia diimport daripada luar negara. Secara umumnya, industri padi dan beras negara kian berkembang pesat dan antara faktor peningkatan tersebut adalah perkembangan dalam kemajuan inovasi dan teknologi. Aplikasi teknologi penanda molekul dalam program pembiakbakaan telah terbukti dalam meningkatkan produktiviti hasil pertanian negara berbanding dengan kaedah pembiakbakaan konvensional kerana teknologi ini lebih efisien, tepat dan efektif.

Penghargaan

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

Bibliografi

- Bradbury, L.M., Fitzgerald, T.L., Henry, R.J., Jin, Q. dan Waters, D.L. (2005). The gene for fragrance in rice. *Plant Biotechnology Journal* 3(3): 363 – 370
- Priyadarshini, M., Kumar, P. dan Sharma, V.K. (2018). Molecular differentiation and classification in relation to fragrance of landraces and improved varieties of aromatic rice using microsatellite markers. *Int. J. Chem. Stud.* 6: 3014 – 3021
- Prodhan, Z.H. dan Qingyao, S.H.U. (2020). Rice aroma: A natural gift comes with price and the way forward. *Rice Science* 27(2): 86 – 100
- Prodhan, Z.H., Faruq, G., Rashid, K.A. dan Taha, R.M. (2017). Effects of temperature on volatile profile and aroma quality in rice. *Int. J. Agric. Biol.* 19(5): 1,065 – 1,072

- Sakthivel, K., Sundaram, R.M., Rani, N.S., Balachandran, S.M. dan Neeraja, C.N. (2009). Genetic and molecular basis of fragrance in rice. *Biotechnology Advances* 27(4): 468 – 473
- Sarhadi, W.A., Hien, N.L., Zanjani, M., Yosofzai, W., Yoshihashi, T. dan Hirata, Y. (2011). Comparative analyses for aroma and agronomic traits of native rice cultivars from central asia. *Journal of Crop Science and Biotechnology* 11(1): 17 – 22
- Sholehah, I.M., Restanto, DP., Kim, K.M. dan Handoyo, T. (2020). Diversity, physicochemical and structural properties of Indonesian aromatic rice cultivars. *Journal of Crop Science and Biotechnology* 23(2): 171 – 180
- Wakte, K., Zanan, R., Hinge, V., Khandagale, K., Nadaf, A. dan Henry, R. (2017). Thirty-three years of 2-acetyl-1-pyrroline, a principal basmati aroma compound in scented rice (*Oryza sativa* L.): A status review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97(2): 384 – 395
- Yi, M., Nwe, K.T., Vanavichit, A., Chai-arree, W. dan Toojinda, T. (2009). Marker assisted backcross breeding to improve cooking quality traits in Myanmar rice cultivar Manawthukha. *Field Crops Research* 113(2): 178 – 186

Ringkasan

Harga beras aroma lebih tinggi berbanding dengan harga beras tanpa aroma disebabkan oleh ciri aromanya yang digemari ramai dan mendapat permintaan yang tinggi. Analisis molekular telah mengenal pasti pemotongan lapan pasangan bes (8bp) di ekson 7 gen badh/fgr sebagai penyumbang ciri aroma dalam kebanyakan varieti padi aroma, seperti Basmati dan Jasmine. Oleh itu, kajian ini bertujuan untuk menyaring sekumpulan padi tradisional Malaysia melalui penggunaan penanda molekul berfungsi yang mensasarkan pemotongan 8bp yang diintegrasikan dengan penilaian deria menggunakan larutan KOH. Hasil kajian mendapati 24 aksesori padi tradisional mempunyai alel fgr/fgr (12.9%), 149 aksesori padi tradisional mempunyai alel Fgr/Fgr (80.1%) dan 13 aksesori padi tradisional mempunyai alel fgr/fgr (7.0%). Sebanyak 24 aksesori dengan alel fgr/fgr menunjukkan deria aroma dalam ujian aromatik daun dan bijirin bagi penilaian kimia menggunakan larutan KOH. Bagi aksesori padi tradisional dengan alel fgr/fgr dan alel fgr/fgr turut dijangka mempunyai ciri aroma sekiranya terdapat gen lain yang turut terlibat dalam pengawalaturan aroma beras. Pengenalpastian sumber genetik daripada germplasma padi tradisional adalah penting bagi mengenal pasti penderma novel yang berpotensi untuk diaplikasikan dalam program pembiakbakaan melalui pembiakbakaan berbantuan penanda. Kajian ini telah berjaya membuktikan bahawa integrasi penanda molekul dan penilaian deria dalam penyaringan jisim alel fgr/fgr bagi mengenal pasti beras aroma daripada aksesori germplasma yang besar dan sesuai digunakan dalam program pembaikbakaan padi.

Summary

The price of aromatic rice is higher than the price of non-aromatic rice due to its aroma, which is the essential characteristic of rice. The previous molecular analysis identified the deletion of eight base pairs (8bp) in exon seven as the contributor to the aroma of most rice varieties, including Basmati and Jasmine rice. Therefore, the current study aimed to screen Malaysian landrace rice germplasm using a functional marker targeting the 8bp deletion integrated with sensory assessment using KOH solution. As the aroma characteristic was expressed in a recessive manner, sensory assessment using KOH solution was performed on accessions with the *fgr/fgr* allele only. The screening using functional markers revealed the following results: 24 landrace rice accessions showed *fgr/fgr* (12.9 %) 149 landrace accessions showed *fgr/fgr* (80.1%) 13 landrace rice accessions showed *fgr/fgr* (7.0%). As for the KOH solution's chemical assessment, all 24 accessions with *fgr/fgr* allele expressed their aromatic sensory in the leaf aromatic test and grain aromatic test. However, the remaining accessions with *Fgr/Fgr* and *Fgr/fgr* may be aromatic due to the presence of other genes that control the aroma of rice. Hence, exploring the genetic resource of the landrace rice germplasm was significant in identifying a novel donor to be applied in the rice breeding programme via a marker-assisted breeding approach. Conclusively, this study successfully proved the feasibility of integrating molecular marker approach and sensory assessment for the mass screening of *fgr/fgr* allele in identifying aromatic rice from extensive germplasm collection and breeding programmes.

Pengarang

Nor Helwa Ezzah Nor Azman

Pusat Penyelidikan Bioteknologi dan Nanoteknologi, Ibu Pejabat MARDI

Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor

E-mel: norhelwaezzah@gmail.com

Mohd Shahril Firdaus Ab Razak, Alny Marlynni Abd Majid dan Mohamad Zulfadli Kamarudin

Pusat Penyelidikan Bioteknologi dan Nanoteknologi, Ibu Pejabat MARDI

Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor

Site Noorzuraini Abd Rahman

Pusat Penyelidikan Agrobiodiversiti dan Persekitaran, Ibu Pejabat MARDI

Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor