

Pengesahan genetik 'Raja Sungai': membezakan Kelah daripada Empurau

(Genetic verification of the 'River King': differentiating Kelah from Empurau)

Mohd Azwan Jaafar, Naim Syahmi Noordin dan Muhammad Zudaidy Jaapar

Kata kunci: penanda molekul, genetik, *Tor tambra*, Kelah, Empurau, akuakultur, pengesahan spesies

Pengenalan

Dianugerahi gelaran 'Raja Sungai', ikan air tawar asli Malaysia seperti Kelah dan Empurau bukan sahaja menjadi buruan idaman pemancing, malah merupakan komoditi akuakultur premium yang bernilai tinggi. Keunikan rasa, tekstur isinya yang lemak berkrim, serta kesukaran untuk ditemui di habitat liar telah melonjakkan nilainya ke tahap yang luar biasa. Di Sarawak, ikan Empurau liar bersaiz besar boleh mencecah sekitar RM1,000 hingga RM1,800 sekilogram, manakala harga Kelah Merah dari Semenanjung Malaysia pula dinilai sekitar RM400 hingga RM1,000 sekilogram bergantung kepada saiz dan asalnya. Di Sabah, spesies yang dikenali sebagai Pelian turut mendapat permintaan tinggi dengan harga pasaran sekitar RM350 hingga RM600 sekilogram.

Untuk konteks yang lebih luas, ikan Kelah dan Empurau tergolong dalam genus *Tor* (*Mahseer*) dengan taburan yang luas di seluruh Asia Tenggara dan benua kecil India. Daripada kira-kira 20 spesies *Mahseer* yang direkodkan di Asia, Malaysia merupakan habitat penting bagi beberapa spesies tersebut, dengan *Tor tambra* dan *Tor tambroides* merupakan spesies yang paling dominan dari segi ekologi dan nilai komersial. Kepelbagaian inilah yang menyumbang kepada kewujudan pelbagai nama tempatan seperti Kelah Merah, Kelah Biru, Empurau dan Pelian mengikut lokaliti.

Di sebalik nama-nama gah seperti Kelah, Empurau dan Pelian, wujud satu kekeliruan yang memerlukan jawapan saintifik: adakah semuanya tergolong daripada spesies yang sama? Analisis genetik telah merungkai persoalan ini. Kelah dari Semenanjung Malaysia dan Empurau dari Sarawak disahkan tergolong dalam spesies yang sama, iaitu *Tor tambra*. Sebaliknya, Pelian yang terdapat di Sabah dikenal pasti sebagai spesies berbeza, iaitu *Tor tambroides* yang secara filogenetik merupakan spesies terdekat dengan *Tor tambra*.

Persoalan seterusnya ialah, jika Empurau dan Kelah tergolong dalam spesies yang sama, mengapakah Empurau dari Sarawak begitu istimewa? Rahsianya adalah terletak pada faktor ekologi habitat semula jadinya. Perbezaan warna kemerahan dan kualiti isi premium pada Empurau adalah hasil daripada pengaruh persekitaran dan dietnya yang unik. Kunci utama pada keistimewaannya ialah buah engkabang (*Shorea macrophylla*) yang menjadi diet eksklusif di habitat sungainya.

Diet inilah yang menghasilkan tekstur isi lemak berkrim serta aroma buah-buahan yang menjadi punca mengapa Empurau dimahkotakan sebagai ‘Raja Sungai’ dengan nilai pasaran tertinggi di Malaysia.

Ironinya, meskipun Empurau mempunyai kualiti rasa premium, penampilan fizikalnya sukar dibezakan daripada Kelah, malah hampir serupa dengan spesies *Tor tambroides* (Pelian) pada pandangan pemerhati biasa. Persamaan fizikal yang mengelirukan inilah yang menjadi punca utama pelbagai isu serius yang membuka ruang kepada kes penipuan di pasaran, merencatkan program pembiakbakaan baka tulen dan menggugat usaha pemuliharaan populasi liar. Oleh itu, satu kaedah pengesahan yang mampu ‘melihat’ melangkaui penampilan fizikal amat diperlukan. Di sinilah teknologi penanda molekul atau ‘cap jari DNA’ memainkan peranan kritikal. Teknologi ini menawarkan penyelesaian berketepatan tinggi untuk mengenal pasti perbezaan genetik yang tidak dapat dilihat secara fizikal. Melalui aplikasi penanda *Simple Sequence Repeats* (SSR), variasi genetik antara *strain* Kelah dan Empurau kini dapat dipetakan dengan jitu, menjadi teras kepada pembangunan sistem pengesahan genetik yang amat diperlukan ini.

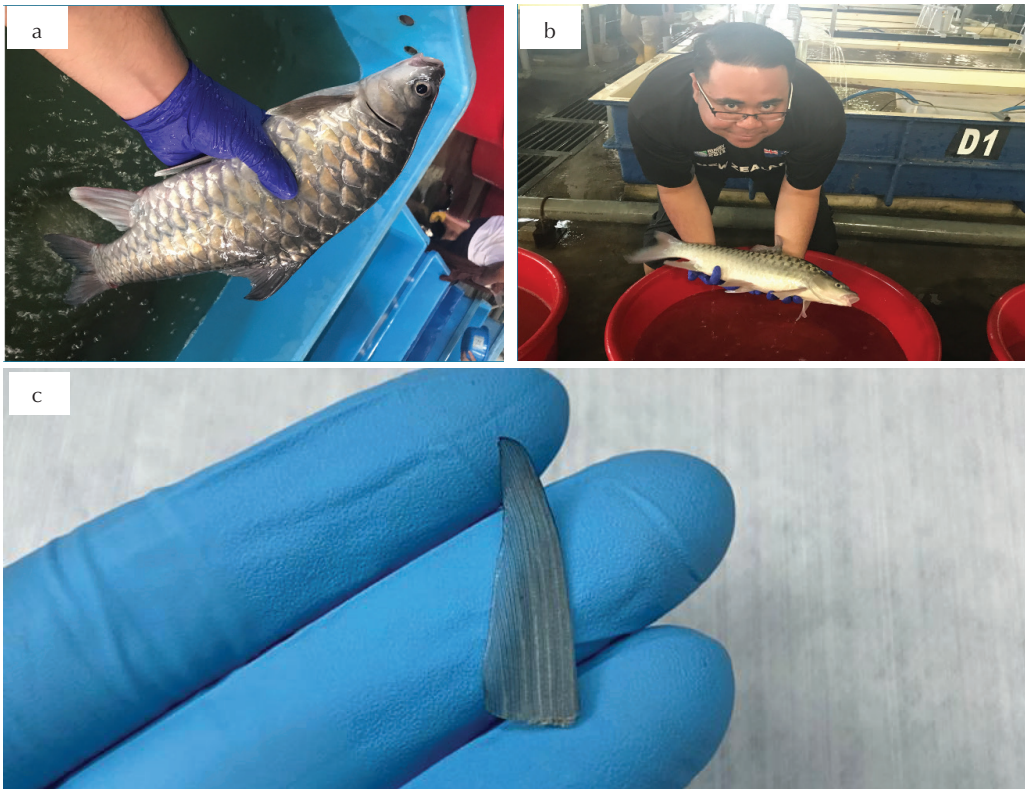
Penerangan mengenai teknologi cap jari Kelah dan Empurau Apa itu penanda molekul?

Penanda molekul khususnya *Microsatellites* atau *Simple Sequence Repeats* (SSR) adalah jujukan DNA pendek yang berulang. Jujukan ini wujud dalam genom dan dicirikan oleh tahap polimorfisme (kepelbagaian) yang tinggi. Keunikan inilah yang menjadikannya sangat berguna untuk menilai corak dan taburan kepelbagaian genetik pada peringkat intraspesies (dalam spesies yang sama). Ia telah berjaya digunakan untuk mengesan variasi genetik dalam pelbagai spesies haiwan dan tumbuhan.

Metodologi: Pembangunan profil genetik melalui analisis DNA

Proses 1: Pengumpulan sampel tisu

Langkah pertama melibatkan pengumpulan bahan genetik daripada ikan. Sejumlah 70 sampel Kelah [*Gambar 1(a)*] dan 22 sampel Empurau [*Gambar 1(b)*] telah diperolehi daripada stok benih induk di Institut Penyelidikan Perikanan (FRI) Glami Lemi, Negeri Sembilan. Sampel tisu diambil melalui kaedah tidak mematikan (*non-lethal*), iaitu dalam bentuk keratan sirip (sekitar 5 mm × 5 mm) [*Gambar 1(c)*]. Kaedah ini dipilih kerana hanya mendatangkan stres minimum kepada ikan dan membolehkan ikan terus hidup untuk program pembiakbakaan. Tambahan pula harga perolehan bagi setiap ekor induk Empurau adalah bernilai antara RM6,000 – RM8,000 menyebabkan proses ini perlu dilakukan secara berhati-hati untuk mengelakkan sebarang kecederaan mahupun kecacatan serius berlaku. Setiap sampel dilabel dengan teliti dan diawet dalam etanol berkepekatan 95% bagi memastikan DNA di dalamnya tidak rosak sebelum proses analisis dijalankan.



Gambar 1. Proses pensampelan sirip ikan di Institut Penyelidikan Perikanan (FRI) Glami Lemi, Negeri Sembilan. (a) Sampel Kelah, (b) Sampel Empurau dan (c) Contoh keratan sirip

Proses 2: Pengekstrakan dan pemeriksaan kualiti DNA

Tujuan peringkat ini adalah untuk mengasingkan DNA daripada komponen sel lain seperti protein, lemak dan bendasing. DNA berkualiti tinggi berjaya diekstrak daripada kesemua 92 sampel menggunakan kit pengekstrakan komersial Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN, Jerman) dengan sedikit pengubahsuaian pada prosedur kerja yang disesuaikan mengikut jenis sampel serta reagen tambahan yang digunakan di makmal. Seterusnya, kualiti, kuantiti dan integriti DNA yang diekstrak disahkan melalui dua kaedah. Pertama, kuantiti dan ketulenan DNA diukur menggunakan spektrofotometer Epoch Biotech (Epoch Life Science, USA). Bacaan kuantiti menunjukkan kepekatan DNA yang diperoleh adalah antara 100 – 200 ng/ μ l, julat yang optimum untuk analisis PCR. Dari segi ketulenan, nisbah bacaan OD 260/280 yang direkodkan adalah sekitar 1.7 – 2.0, menandakan ketulenan DNA yang tinggi dan bebas daripada sisa kontaminasi protein. Kedua, integriti DNA divisualisasikan melalui elektroforesis pada gel agarosa 0.8%. Gel yang direndam dalam larutan *ethidium bromide* kemudiannya diperiksa di bawah sinaran *ultra-violet* (UV). Kehadiran satu jalur DNA yang jelas mengesahkan bahawa DNA yang diekstrak tidak terdegradasi serta berkualiti tinggi untuk digunakan dalam proses PCR.

Proses 3: Tindak balas berantai polimerase (PCR)

Daripada puluhan penanda SSR yang berpotensi yang tersedia di pangkalan data genetik awam, sebanyak 10 penanda telah dipilih dengan teliti untuk teknologi ini (*Jadual 1*). Pemilihan tersebut tidak dibuat secara rawak, sebaliknya melalui proses saringan berasaskan kriteria statistik yang ketat bagi memastikan setiap penanda yang digunakan bersifat sangat informatif. Kriteria utama yang digunakan dalam pemilihan penanda adalah seperti yang berikut:

- Indeks Heterozigositi (He) > 0.9: Nilai ini mengukur kebarangkalian bahawa satu individu yang dipilih secara rawak mempunyai dua alel berbeza bagi sesuatu penanda. Nilai yang tinggi (>0.9) menunjukkan bahawa penanda tersebut memiliki tahap kepelbagaian genetik yang sangat tinggi, sekali gus menjadikannya amat berkesan untuk membezakan antara individu.
- Kandungan Maklumat Polimorfik (PIC) > 0.5: PIC adalah satu lagi ukuran penting yang menilai kegunaan sesebuah penanda dalam kajian genetik. Nilai yang melebihi 0.5 menunjukkan bahawa penanda itu adalah sangat informatif dan mempunyai kuasa pembedaan yang tinggi.

Seterusnya, tindak balas PCR disediakan dalam isi padu keseluruhan 10 µl, merangkumi campuran *mastermix* dan templat DNA. Komponen utama yang terkandung dalam *mastermix* tersebut ialah:

- 4.9 µl, Air ternyahion (ddH₂O)
- 0.25 µl, 0.4 µM bagi setiap primer
- 1.0 µl, 0.2 mM campuran dNTP (Promega, USA)
- 0.5 µl, 2.5 µM pewarna pendarfluor M13 (*M13 Fluorescent dye*)
- 1.0 µl, *Buffer* PCR 5× (Invitrogen, USA)
- 1.0 µl, 2 mM MgCl₂ (Invitrogen, USA)
- 0.1 µl, enzim *Taq polymerase* (Invitrogen, USA)
- 1 µl sampel DNA (30 ng/µl)

Jadual 1. Senarai 10 penanda molekul SSR dan rujukan dokumen yang telah disahkan berkesan untuk analisis genetik ikan Kelah dan Empurau dalam kajian ini

Nama penanda SSR	Motif ulangan	Rujukan
<i>Bgon22</i>	TCC	Kamonrat et al., 2002
<i>Bgon75</i>	AC	Kamonrat et al., 2002
<i>Barb37</i>	ATTT	Chenuil et al., 1999
<i>Barb59</i>	GATA	Chenuil et al., 1999
<i>MFW1</i>	CA	Crooijmans et al., 1997
<i>MFW7</i>	CA	Crooijmans et al., 1997
<i>MFW17</i>	CA	Crooijmans et al., 1997
<i>MnLR2-1-52A</i>	AG	Keong et al., 2008
<i>MnRmC3-1</i>	GT	Keong et al., 2008
<i>MnLR2-1-17B</i>	GA	Keong et al., 2008

Proses penggandaan kemudiannya dijalankan menggunakan kitaran PCR yang terdiri daripada 35 kitaran dengan lima fasa dengan tiga suhu berbeza iaitu fasa *Initial Denaturation* dan fasa *Denaturation* pada 94 °C, fasa *Annealing* pada 45 – 65 °C (bergantung kepada penanda SSR) dan fasa *Extension* dan fasa *Final Extension* pada 72 °C.

Proses 4: Pengenalpastian genotaip SSR

Setelah digandakan, produk PCR dianalisis bagi menentukan saiz sebenar fragmen DNA yang terhasil untuk setiap penanda. Analisis ini dijalankan menggunakan mesin penganalisis genetik (ABI 3730xl Genetic Analyzer, USA), iaitu peralatan berketepatan tinggi yang mampu mengesan perbezaan saiz DNA sehingga ke tahap satu pasangan bes [*base pair* (bp)]. Data mentah daripada mesin ini seterusnya dianalisis menggunakan perisian khusus GeneMapper Versi 4.0.

Dalam perisian ini, proses kritikal yang dikenali sebagai penskoran alel dijalankan, di mana saiz sebenar setiap fragmen DNA (alel) ditentukan secara digital. Sebelum profil genetik akhir dibina, data ini mesti melepasi beberapa proses tapisan kualiti yang ketat, termasuklah pengenalpastian *null alleles* dan memastikan kadar panggilan (*call rate*) yang tinggi untuk menjamin ketepatan. Akhir sekali, gabungan saiz-saiz alel yang telah disahkan inilah yang membentuk genotip atau profil genetik tersendiri iaitu 'cap jari DNA' yang unik bagi setiap individu ikan.

Analisis data dan aplikasi teknologi

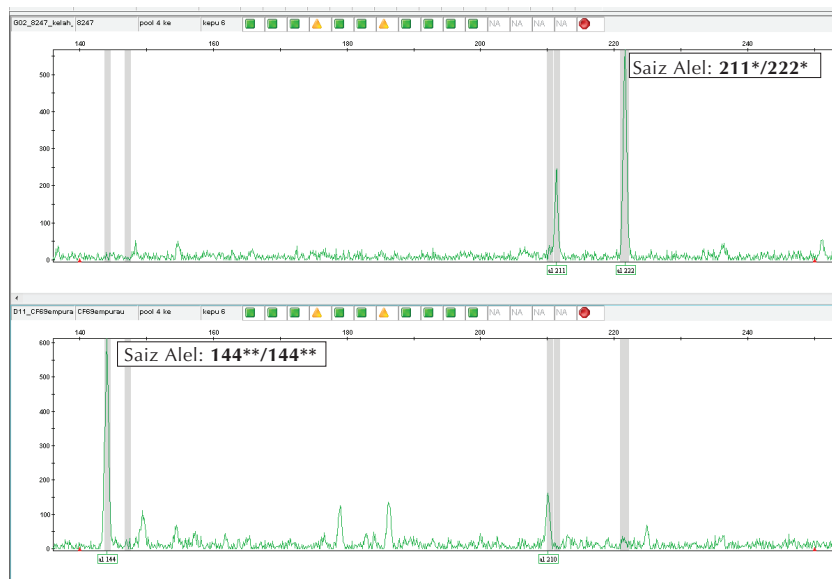
Hasil analisis menunjukkan bahawa kesemua 10 penanda SSR yang diuji telah berjaya diamplifikasi dan menghasilkan data genotip yang berkualiti tanpa sebarang isu kegagalan amplifikasi atau kadar panggilan yang rendah. Secara umumnya, penanda molekul SSR yang digunakan menunjukkan bahawa populasi Kelah dan Empurau mempunyai hubungan yang rapat, namun masih boleh dibezakan. Ini disokong oleh beberapa petunjuk statistik utama:

- Jarak Genetik (F_{ST}): Ukuran perbezaan genetik antara populasi, yang diskalakan daripada 0 (tiada beza) hingga 1 (berbeza sepenuhnya), mencatatkan nilai 0.0956. Nilai yang rendah ini mengesahkan bahawa kedua-dua populasi tergolong dalam spesies yang sama (*Tor tambra*) dengan tahap perbezaan yang rendah hingga sederhana.
- Aliran Gen (*Gene Flow*): Jarak genetik yang rendah ini dapat dijelaskan oleh Aliran Gen yang aktif antara populasi dengan nilai positif 2.3641. Dapatan ini menunjukkan wujudnya aliran gen antara populasi yang mengurangkan pembezaan genetik.
- *Inbreeding Coefficient* (F_{IS}): Populasi ini juga menunjukkan tahap kesihatan genetik yang baik di mana nilai F_{IS} negatif, iaitu -0.3899, yang menandakan terdapat lebih kepelbagaian genetik (*heterozygosity*) dan tiada isu pembiakbakaan dalam yang serius. Dapatan ini turut disokong oleh nilai purata *heterozygosity* pada 0.5286.

Walaupun data populasi menunjukkan Kelah dan Empurau adalah spesies yang sama dan berkait rapat, di sinilah letaknya kekuatan sebenar teknologi penanda molekul. Analisis terperinci pada peringkat individu berjaya mengesan profil genetik unik yang konsisten dan boleh diulang. Daripada semua penanda yang diuji, tiga daripadanya menunjukkan perbezaan genotip antara populasi Kelah dan Empurau. Penanda *Barb59* merupakan contoh yang paling jelas serta mempunyai kuasa diagnostik yang tinggi. Perbezaan yang ditunjukkan oleh penanda ini sangat ketara dan mudah untuk dikenal pasti:

- Bagi populasi Kelah, menunjukkan genotip heterozigot dengan saiz alel 211/222 pasangan bes (bp). Sebaliknya;
- Bagi populasi Empurau, menunjukkan genotip homozigot dengan saiz alel 144 bp.

Perbezaan saiz yang begitu besar antara 222 bp pada Kelah dan 144 bp pada Empurau menjadikan penanda *Barb59* calon utama untuk kit pengesanan pantas antara Kelah dan Empurau (*Rajah 1*).



Nota:

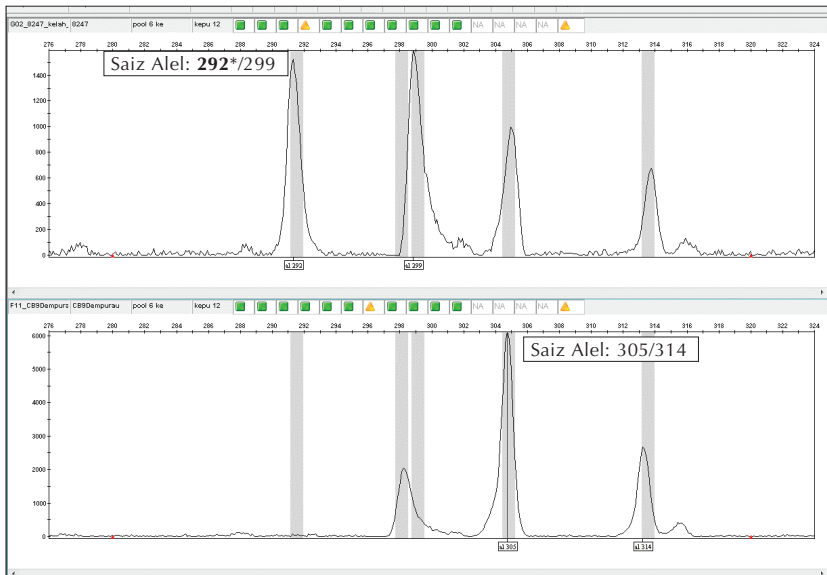
*Saiz alel unik kepada populasi ikan Kelah

** Saiz alel unik kepada populasi ikan Empurau

Rajah 1. Perbezaan plot genotip daripada perisian GeneMapper antara sampel Kelah (atas) dan Empurau (bawah) menggunakan penanda Barb59

Kekuatan analisis ini tidak bergantung kepada satu penanda sahaja, namun terdapat juga corak perbezaan yang berpotensi pada penanda-penanda lain yang membuktikan lagi kebolehpercayaan teknologi ini. Sebagai contoh, Penanda *MFW17* menunjukkan perbezaan dalam kombinasi alel heterozigot. Sampel Kelah mempunyai genotip alel bersaiz unik iaitu 292, manakala majoriti Empurau mempunyai genotip alel bersaiz 299/305/314. Ini menunjukkan walaupun populasi Kelah dan Empurau berkongsi alel 299/305/314, terdapat alel unik 292 untuk

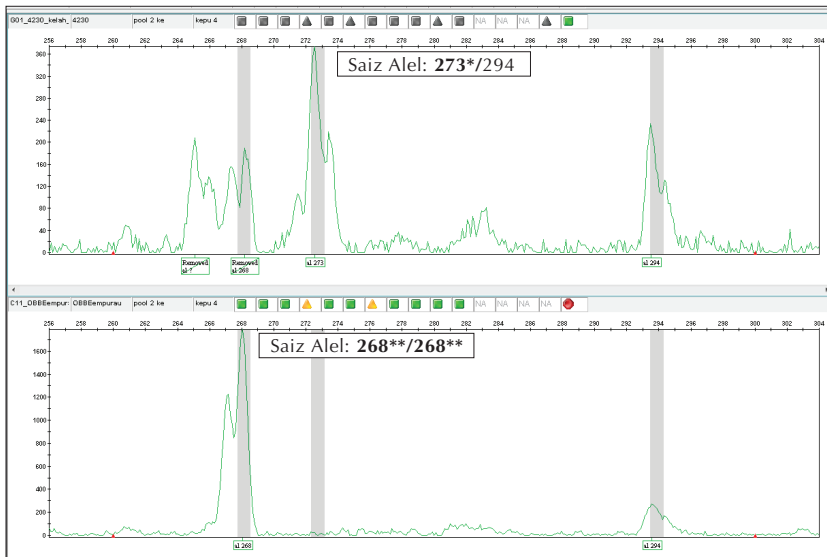
Kelah yang boleh membezakan kedua-dua strain tersebut (*Rajah 2*). Penanda *Bgon75* pula menunjukkan perbezaan pada alel spesifik. Alel bersaiz 273 bp kerap ditemui pada Kelah, manakala alel bersaiz 268 bp adalah ciri khas bagi Empurau (*Rajah 3*).



Nota:

*Saiz alel unik kepada populasi Kelah

Rajah 2. Perbezaan plot genotip daripada perisian GeneMapper antara sampel Kelah (atas) dan Empurau (bawah) menggunakan penanda MFW17



Nota:

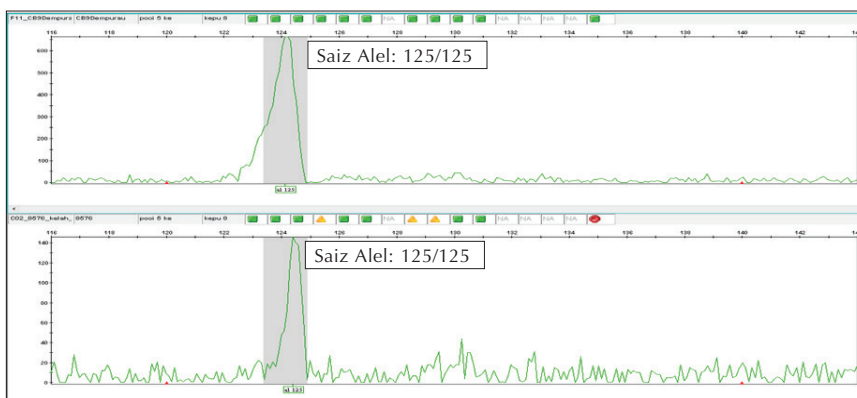
*Saiz alel unik kepada populasi ikan Kelah

** Saiz alel unik kepada populasi ikan Empurau

Rajah 3. Perbezaan plot genotip daripada perisian GeneMapper antara sampel Kelah (atas) dan Empurau (bawah) menggunakan penanda Bgon75

Menariknya, hanya satu penanda sahaja iaitu *MFW1* yang menunjukkan genotip yang serupa bagi kedua-dua populasi, di mana majoritinya adalah homozigot pada saiz 125 bp (*Rajah 4*). Ini adalah satu penemuan yang penting kerana ia menunjukkan bahawa tidak semua bahagian genom berbeza, selaras dengan fakta bahawa mereka adalah spesies yang sama.

Secara kesimpulannya, walaupun data menunjukkan Kelah dan Empurau adalah populasi yang sihat dan saling berhubung, kekuatan sebenar teknologi ini terletak pada kepekaannya. Analisis menggunakan penanda SSR yang spesifik berjaya mengesan profil genetik unik yang konsisten, membolehkannya berfungsi sebagai 'cap jari DNA' untuk membezakan kedua-dua strain ini dengan tepat.



Rajah 4. Persamaan plot genotip daripada perisian GeneMapper antara sampel Kelah (atas) dan Empurau (bawah) menggunakan penanda MFW1

Impak teknologi: manfaat kepada industri dan sumber asli

Kejayaan membezakan Kelah dan Empurau secara genetik ini membuka ruang kepada pelbagai aplikasi praktikal yang berpotensi memberi impak signifikan terhadap ekonomi, industri akuakultur dan pemuliharaan biodiversiti negara.

- **Jaminan ketulenan dan memerangi penipuan pasaran**

Nilai pasaran Empurau yang sangat tinggi menjadikannya sasaran utama kes penipuan, apabila Kelah atau spesies ikan lain yang bernilai lebih rendah dijual pada harga premium setaraf dengan harga Empurau. Teknologi 'cap jari DNA' ini berfungsi sebagai alat pengesahan muktamad. Agensi penguatkuasaan seperti Jabatan Perikanan, pemborong, pengusaha restoran dan pembeli kini mempunyai kaedah saintifik untuk mengesahkan ketulenan produk. Ini bukan sahaja melindungi pengguna, tetapi juga mengekalkan integriti dan nilai premium ikan Empurau asli di pasaran.

- **Revolusi dalam program pembiakbakaan terpilih**

Bagi pengusaha akuakultur, teknologi ini membawa dua manfaat besar. Pertama, ia menjamin ketulenan baka induk dan seterusnya memastikan hanya strain yang betul sahaja digunakan dalam program pembiakbakaan.

• **Alat strategik untuk pemuliharaan populasi liar**

Usaha pemuliharaan 'Raja Sungai' kini boleh dilaksanakan dengan lebih strategik. Teknologi ini boleh digunakan oleh ahli biologi pemuliharaan untuk memetakan taburan serta kepelbagaian genetik populasi liar di seluruh sistem sungai negara. Data tersebut sangat signifikan dalam mengenal pasti populasi yang unik atau terancam, sekali gus membolehkan langkah perlindungan khusus dirangka. Selain itu, dalam program pelepasan benih ke habitat asal, teknologi ini memastikan benih yang dilepaskan adalah sepadan dari segi genetik dengan populasi sedia ada bagi mengelakkan risiko pencemaran genetik dan meningkatkan peluang kelangsungan hidup.

Cabaran semasa dan hala tuju masa hadapan teknologi

Walaupun keberkesanan tidak dapat dinafikan, cabaran utama dalam penggunaan meluas teknologi penanda molekul ini adalah kos permulaan yang tinggi untuk pembangunan fasiliti makmal dan keperluan tenaga kerja mahir. Namun, halangan ini telah dikenal pasti mempunyai penyelesaian yang praktikal. Para pengusaha industri tidak perlu menanggung beban kos tersebut kerana MARDI, melalui Pusat Penemuan dan Pengesahan Penanda Molekul (CMDV), telah bersedia menawarkan perkhidmatan analisis 'cap jari DNA' ini. Dengan anggaran kos sekitar RM80 bagi setiap sampel dan potensi pengurangan kos untuk analisis secara pukal, teknologi canggih ini lebih mudah diakses dan lebih mampu milik.

Sekiranya mendapat permintaan yang tinggi, beberapa inisiatif penyelidikan dan pembangunan (R&D) boleh dirancang untuk menjadikannya lebih efisien dan mesra pengguna. Fokus utama adalah pada pembangunan sistem *PCR Multiplex*, iaitu satu kaedah yang membolehkan beberapa penanda SSR dianalisis serentak dalam satu tindak balas. Inovasi ini dijangka dapat mengurangkan kos dan masa analisis secara drastik, menjadikannya amat sesuai untuk saringan berskala besar.

Matlamat akhir semua usaha ini adalah untuk membina satu aset strategik negara. Setiap data genotip yang diperolehi akan disumbangkan kepada pembinaan pangkalan data DNA untuk ikan-ikan air tawar bernilai tinggi di Malaysia. Pangkalan data ini akan berfungsi sebagai 'perpustakaan genetik' sebagai sumber rujukan untuk agensi penguatkuasaan, para penyelidik dan pihak industri. Ia akan menjadi alat yang tidak ternilai untuk pengesahan spesies, perancangan pemuliharaan dan pengurusan sumber perikanan negara secara lestari untuk generasi akan datang.

Kesimpulan

Teknologi penanda molekul SSR telah berjaya menjelaskan perbezaan genetik yang merungkai identiti 'Raja Sungai' Malaysia. Kajian ini mengesahkan secara saintifik bahawa walaupun Kelah dan Empurau tergolong dalam spesies yang sama iaitu *Tor tambra* seperti yang dibuktikan oleh jarak genetik (F_{ST}) yang rendah dan aliran gen yang aktif. Teknologi ini berupaya mendedahkan perbezaan dengan lebih tepat walaupun dengan jarak genetik yang rendah. Melalui penanda-

penanda yang sangat informatif, 'cap jari DNA' yang konsisten bagi setiap strain telah berjaya dikenal pasti dengan jitu, terutamanya melalui perbezaan ketara pada penanda seperti *Barb59*. 'Cap jari DNA' ini bukan sekadar penemuan akademik, tetapi merupakan satu alat praktikal yang berkuasa dengan aplikasi yang meluas. Dalam sektor ekonomi, ia menjadi benteng pertahanan terhadap penipuan pasaran, memastikan ketulenan dan nilai premium 'Raja Sungai' terjamin. Bagi industri akuakultur, ia merevolusikan program pembiakbakaan dengan membolehkan pemilihan induk tulen dan pengurusan kepelbagaian genetik untuk mengelakkan pembiakbakaan dalam. Manakala untuk pemuliharaan, ia menjadi alat strategik untuk memeta dan mengurus populasi liar seterusnya memastikan khazanah biodiversiti negara terus lestari. Dengan ketersediaan perkhidmatan di makmal seperti CMDV MARDI, teknologi ini sedia untuk diaplikasikan oleh industri. Usaha bersepadu ini akan terus melindungi, memartabatkan dan meningkatkan nilai warisan 'Raja Sungai' Malaysia untuk generasi kini dan akan datang.

Penghargaan

Penghargaan ditujukan kepada semua ahli projek yang terlibat dan Institut Penyelidikan Perikanan (FRI) Glami Lemi atas kerjasama dalam penyediaan sampel ikan. Projek ini telah dibiayai bawah peruntukan Projek Khas NKEA RMK 11.

Bibliografi

- Bhassu, S., Bakar, Y., & Rashid, Z. A. (2008). Isolation of dinucleotide microsatellite markers in commercially threatened Malaysian mahseer *Tor tambroides*. *Russian Journal of Genetics*, 44(8), 1000–1002.
- Chenuil, A., Galtier, N., & Berrebi, P. (1999). A test of the hypothesis of an autopolyploid vs. allopolyploid origin for a tetraploid lineage: application to the genus *Barbus* (Cyprinidae). *Heredity*, 82(4), 373–380.
- Crooijmans, R. P. M. A., Poel, J. V. D., Groenen, M. A. M., Bierbooms, V. A. F., & Komen, J. (1997). Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Animal genetics*, 28(2), 129–134.
- Kamonrat, W., McConnell, S. K. J., & Cook, D. I. (2002). Polymorphic microsatellite loci from the Southeast Asian cyprinid, *Barbodes gonionotus* (Bleeker). *Molecular Ecology Notes*, 2(2), 89–90.
- Keong, R. B. P., Siraj, S. S., & Daud, S. K. (2008). Cross species amplification of ikan kelah, *Tor tambroides* by using *Mystus nemurus* microsatellite markers.
- VÄHÄ, J. P., & Primmer, C. R. (2006). Efficiency of model-based Bayesian methods for detecting hybrid individuals under different hybridization scenarios and with different numbers of loci. *Molecular Ecology*, 15(1), 63–72.
- Zane, L., Bargelloni, L., & Patarnello, T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular ecology*, 11(1), 1–16.

Ringkasan

Ikan Kelah dan Empurau yang dikenali sebagai 'Raja Sungai', merupakan ikan air tawar premium di Malaysia. Kajian genetik komprehensif ini dijalankan bagi menjelaskan kekeliruan yang wujud berhubung dengan status taksonomi dan identiti kedua-dua spesies tersebut. Hasilnya mengesahkan suatu paradoks yang sering dibincangkan bahawa Kelah dan Empurau walaupun berbeza daripada segi nama dan ciri fizikal, sebenarnya tergolong dalam satu spesies yang sama iaitu *Tor tambra*. Pengesahan ini dibuktikan melalui data populasi yang menunjukkan tahap perbezaan genetik (F_{ST}) yang sangat rendah iaitu 0.0956, serta aliran gen yang aktif pada 2.3641, menandakan mereka adalah satu populasi besar yang saling berhubung. Selain itu, *Inbreeding Coefficient* (F_{IS}) yang negatif (-0.3899) turut mengesahkan populasi ini berada dalam keadaan sihat dengan kepelbagaian genetik yang baik. Kekuatan utama kajian ini adalah kejayaan aplikasi penanda molekul SSR untuk membezakan kedua-dua strain ini walaupun daripada spesies yang sama. Analisis terperinci menunjukkan bahawa tiga daripada penanda SSR yang diuji mampu mengenal pasti genotip unik yang konsisten membezakan antara Kelah dan Empurau. Contoh paling ketara adalah melalui penanda *Barb59*, di mana majoriti sampel Kelah mempunyai alel dominan bersaiz 222 bp, manakala majoriti Empurau pula mempunyai alel bersaiz 144 bp. Hanya satu penanda, MFW1, menunjukkan profil genotip yang serupa bagi kedua-dua strain. Teknologi ini mempunyai implikasi yang amat penting, terutamanya untuk tujuan pengesahan ketulenan bagi membanteras penipuan pasaran yang berleluasa. Di samping itu, ia menjadi alat yang berkuasa dalam industri akuakultur untuk menyokong program pembiakbakaan terpilih bagi menjamin ketulenan baka, serta membantu agensi berkaitan dalam merangka strategi pemuliharaan populasi liar 'Raja Sungai' Malaysia dengan lebih berkesan.

Summary

Kelah and *Empurau*, known as the 'King of the River' are premium freshwater fish in Malaysia. This comprehensive genetic study was conducted to clarify the existing confusion regarding the taxonomic status and identity of these two species. The findings confirm a widely discussed paradox that although *Kelah* and *Empurau* differ in name and physical traits, they in fact belong to the same species, *Tor tambra*. This conclusion is supported by population data showing a very low level of genetic differentiation (F_{ST}) of 0.0956 and active gene flow of 2.3641, indicating that they form a single, large, interconnected population. Furthermore, a negative Inbreeding Coefficient (F_{IS}) of -0.3899 confirmed that this population is healthy, with good genetic diversity. A key strength of this study is the successful application of SSR molecular markers to differentiate between these two strains, even though they are the same species. Detailed analysis showed that three of the tested SSR markers could identify unique genotypes that consistently distinguish between *Kelah* and *Empurau*. The most significant example was observed with the *Barb59* marker, where the majority of *Kelah* samples possessed a prominent allele of 222 bp, while the majority of *Empurau* had an allele of 144 bp. Only one marker, MFW1 showed a similar genotype profile for both strains. This technology has significant implications, particularly for authenticity verification to combat widespread market fraud. It is also a powerful tool for the aquaculture industry to support selective breeding programmes, ensuring broodstock purity. Additionally, it will assist relevant agencies in formulating more effective conservation strategies for Malaysia's wild 'King of the River' populations.

Pengarang

Mohd Azwan Jaafar (Ts. Dr.)

Pusat Penyelidikan Bioteknologi dan Nanoteknologi,
Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor

E-mel: azwanj@mardi.gov.my

Naim Syahmi Noordin

Pusat Penyelidikan Bioteknologi dan Nanoteknologi,
Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor

Muhammad Zudaidy Jaapar

Institut Penyelidikan Perikanan (FRI) Glami Lemi, 71650 Kuala Klawang,
Negeri Sembilan