

Penilaian kepelbagaian genetik cendawan tiram MARDI menggunakan teknologi cap jari DNA

(Assessment genetic diversity of MARDI's oyster mushroom using DNA fingerprinting technology)

Khairun Hisam Nasir, Ganisan Krishnen, Khairul Asfamawi Khulidin dan Siti Nadhrah Abd Hisham

Kata kunci: cendawan tiram MARDI, cap jari DNA, penentuan, analisis serpihan DNA, pepohon filogenetik

Pengenalan

Industri cendawan di peringkat dunia berkembang dengan kadar yang berlipat kali ganda sejak kebelakangan ini. Kadar pertumbuhan industri cendawan dijangka meningkat sehingga 9.7% setahun menjelang 2030 dengan nilai tahunan sekitar RM200 bilion. Menariknya, pertumbuhan industri ini tertumpu di kawasan Asia Pasifik, terutamanya di China, Jepun dan Malaysia yang menguasai 79% pasaran dunia pada tahun 2021. Pasaran cendawan dunia diunjurkan mencapai nilai RM560 bilion menjelang tahun 2032. Dengan ini permintaan untuk cendawan yang berkualiti tinggi akan meningkat secara berterusan.

Pelbagai jenis cendawan boleh ditanam secara komersial di Malaysia mengikut agro iklim yang berbeza. Sebahagiannya, ditanam di kawasan tanah tinggi, tanah rendah atau secara persekitaran terkawal. Cendawan tiram (*Pleurotus pulmonaris*), tiram putih (*Pleurotus florida*), kukur (*Schizophyllum commune*), telinga kera (*Auricularia auricula*) dan jerami padi (*Volvariella* sp.) merupakan cendawan yang sering diusahakan oleh pengusaha cendawan tempatan.

Secara umumnya, industri cendawan di Malaysia merupakan industri yang berpotensi untuk dibangunkan. Walau bagaimanapun, industri cendawan di Malaysia mengalami pelbagai kekangan seperti kualiti benih cendawan yang rendah, bekalan benih yang tidak mencukupi dan faktor cuaca yang tidak menentu seperti perubahan suhu, kelembapan dan aliran udara akan mempengaruhi pertumbuhan optimum cendawan. Bagi menangani isu sedemikian, MARDI telah membangunkan koleksi kultur cendawan melalui penyaringan dan pemencilan isolat yang lebih produktif.

Pelbagai isolat cendawan telah dikenal pasti dan diperolehi daripada sumber yang berbeza terutamanya *Pleurotus pulmonaris* (cendawan tiram). Sebanyak 96 isolat cendawan tiram telah disaring, terdapat dua strain baharu *Pleurotus pulmonaris* iaitu Jelira 1 (MP28) dan Jelira 2 (MP9) yang produktif telah dikenal pasti berpotensi untuk dibangunkan. Kedua-dua strain Jelira 1 dan Jelira 2 mencatat tempoh pengkulturan hingga pembentukan primordia yang lebih singkat serta kurang dicemari berbanding dengan strain komersial *Pleurotus* sp.

Maklumat mengenai variasi genetik antara strain cendawan tiram amat penting untuk memastikan ketepatan dalam mengenal pasti strain

yang digunakan. Seterusnya menyumbang kepada pengenalan dan pembangunan cendawan tiram baharu yang mempunyai potensi hasil dan kualiti yang lebih baik. Sehingga kini, pengenalan cendawan tiram lazimnya bergantung kepada kaedah pencirian morfologi terhadap sesuatu strain cendawan tiram. Walau bagaimanapun, kaedah sebegini mempunyai kekangan sekiranya sampel diambil pada peringkat miselia kerana pertumbuhan cendawan tiram yang belum lengkap serta bentuk fisiologi yang tidak sempurna. Malah, pencirian secara morfologi tidak dapat dilaksanakan dalam keadaan ini.

Sehubungan itu, satu kaedah pengenalan yang cepat, tepat dan boleh diulang uji perlu dibangunkan. Teknologi cap jari DNA berasaskan penanda DNA jenis ulangan jujukan ringkas (SSR) menawarkan pendekatan pantas dengan keperluan sampel yang minimum yang sesuai digunakan pada peringkat miselia dan tidak dipengaruhi oleh variasi persekitaran. Melalui teknologi ini, profil alel yang terhasil dapat dijadikan cap jari DNA untuk membezakan dan mengesahkan identiti strain cendawan tiram. Penanda SSR sesuai digunakan untuk membangunkan cap jari DNA kerana sifatnya yang berpolimorfisme yang tinggi, alel yang kodominan yang membolehkan pembezaan keadaan homozigot dan heterozigot, serasi dengan tindak balas berantai polimerase (PCR), kebolehlulangan hasil ujian yang tinggi serta mudah disepadukan dengan peralatan bertruput tinggi. Oleh itu, kajian menilai kepelbagaian genetik cendawan tiram MARDI menggunakan penanda SSR telah dibangunkan bagi pengenalan cap jari DNA cendawan tiram MARDI.

Pembangunan cap jari DNA cendawan tiram MARDI

Sampel cendawan tiram

Pengekstrakan DNA dengan menggunakan kaedah CTAB telah dijalankan bagi 12 cendawan tiram dalam bentuk miselia cecair (TK, MP9, MP11, NP12, MP22, MP28, MP35, MP52, MP53, MP58, MP59 dan MP60) dan 1 (CCTK) dalam bentuk jana buah (*fruiting body*).

Pengenalan pencetus SSR, PCR dan analisis serpihan DNA

Sebanyak 36 pasangan pencetus digunakan untuk menghasilkan produk PCR. Pencetus SSR digabungkan dengan pewarna berpendaflour semasa proses PCR. PCR dilakukan dalam tiub dengan isi padu sebanyak 10 μL yang terdiri daripada 1.0 μL DNA (kepekatan 40 $\text{ng}/\mu\text{L}$), 1 μL penimbal tindak balas PCR, 1.5 – 3.0 mM MgCl_2 , campuran 2 mM dNTPs, 10 mmol set pencetus, 5 mmol pewarna berpendaflour (FAM/VIC/NED dan PET) dan 1U *Taq DNA polymerase* (Invitrogen, USA). Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan alat *Peltier Thermal Cycler, DNA Engine Tetrad 2* (BioRad, USA). Profil PCR termasuk denaturasi awal pada suhu 94 °C selama lima minit diikuti dengan 34 kitaran, denaturasi kedua pada suhu 94 °C selama 30 saat, penyepuhlingapan selama 45 saat pada suhu 52 °C, pemanjangan pada 72 °C selama 45 saat dan kitaran akhir 72 °C selama 7 minit. Seterusnya, analisis serpihan DNA bagi produk PCR dilakukan dengan menggunakan alat ABI3730XL (Applied Biosystems, USA).

Penskoran dan analisis data

Penskoran bagi setiap produk PCR daripada cendawan tiram dianalisis menggunakan perisian GeneMapper 5.0 (Applied Biosystems). Bahan kimia GS500LIZ digunakan sebagai kawalan standard bagi penskoran elektroferogram. Hanya puncak elektroferogram yang jelas digunakan dalam analisis menggunakan perisian MicroChecker v2.2.3 untuk mengesahkan kehadiran alel nol, kecaciran alel dan ralat penskoran akibat kesan puncak *stutter*. Puncak alel yang telah diskor, diimport dalam format Microsoft Excel dan dianalisis menggunakan perisian PowerMarker v3.25 untuk mengira bilangan alel, heterozigositi dan jarak genetik. Perisian MEGA 7 digunakan untuk menghasilkan dendogram berdasarkan jarak genetik yang dijana oleh perisian PowerMarker.

Pengenotipan cendawan tiram MARDI

Sebanyak 36 pencetus SSR telah digunakan untuk optimisasi PCR namun hanya 10 pencetus SSR sahaja yang berjaya dioptimisasi manakala selebihnya sama ada gagal untuk diamplifikasi ataupun menghasilkan jalur berganda yang tidak spesifik. Sepuluh pencetus SSR yang berjaya dioptimumkan ini kemudiannya digunakan untuk amplifikasi ke atas semua 13 isolat yang dikaji. Daripada 10 pencetus SSR tersebut, hanya enam pencetus SSR (*Jadual 1*) menghasilkan alel polimorfik manakala baki empat pencetus SSR menunjukkan sama ada alel monomorfik atau skor alel yang rendah. Antara 13 sampel cendawan tiram yang telah diuji, didapati bahawa kekerapan alel berjulat daripada 0.1154 (penanda GB-PO-025) hingga 0.4231 (penanda GB-PO-006) dengan purata 0.2885 (*Jadual 1*). Kekerapan alel menggambarkan kehadiran relatif alel pada setiap individu cendawan tiram adalah alel unik bagi setiap individu cendawan yang boleh digunakan sebagai pengenalan identiti cendawan. Manakala, bilangan alel berjulat antara 7 – 16 dengan purata 10.6667 menunjukkan bilangan alel pada setiap pencetus yang menggambarkan kepelbagaian genetik. Pencetus yang mempunyai nilai kepelbagaian genetik yang tinggi berupaya untuk membezakan cendawan tiram.

Kepelbagaian genetik berjulat antara 0.7692 – 0.9142 dengan purata 0.8289 menunjukkan kebarangkalian perbezaan dua alel yang diambil secara rawak daripada populasi cendawan (*Jadual 1*). Nilai kepelbagaian genetik yang tinggi (menghampiri 1) menunjukkan kepelbagaian alel yang tinggi dan sangat membantu dalam membezakan individu cendawan tiram. Sebaliknya jika nilai kepelbagaian genetik yang rendah (menghampiri 0) menggambarkan kepelbagaian alel rendah yang menunjukkan maklumat alel yang rendah dalam membezakan individu cendawan tiram.

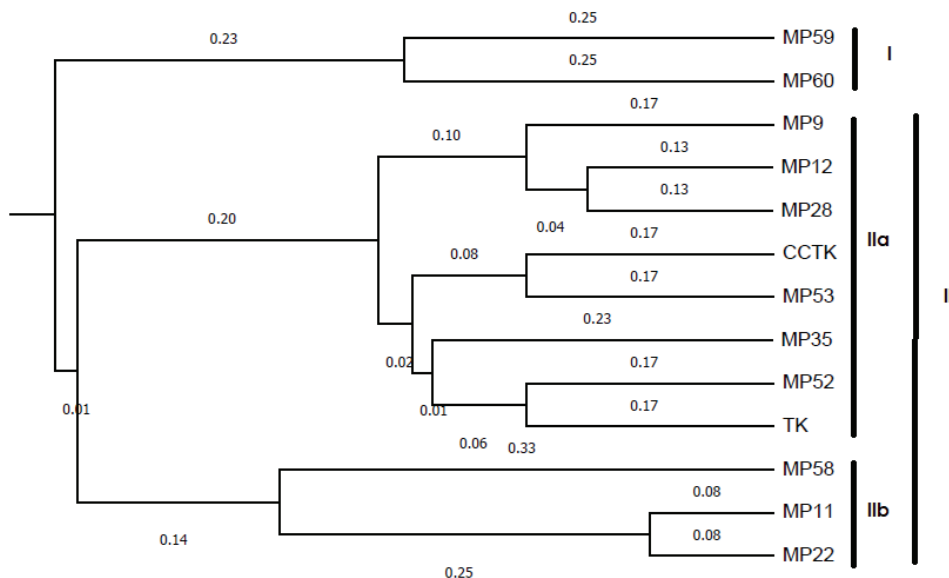
Kandungan maklumat polimorfik [*Polymorphic information content* (PIC)] berjulat daripada 0.7471 – 0.9077 dengan purata 0.8110 (*Jadual 1*). Nilai PIC menggambarkan keupayaan pencetus SSR mengesan perbezaan genetik dalam populasi cendawan yang diuji. Nilai PIC mempunyai nilai daripada julat 0 – 1. Sekiranya nilai PIC kurang daripada 0.25 menunjukkan pencetus kurang memberi maklumat (*less informative marker*), nilai PIC antara 0.25 – 0.5

menunjukkan pencetus mempunyai maklumat sederhana (*moderate informative*) dan nilai PIC yang melebihi 0.5 menunjukkan pencetus mempunyai maklumat tinggi yang sangat berguna dalam mengesan kepelbagai genetik cendawan tiram.

Enam pencetus SSR polimorfik digunakan untuk menjana pepohon filogenetik (*phylogenetic tree*) berasaskan data jarak genetik (*genetic distance*) daripada keputusan analisis yang diperolehi menggunakan perisian PowerMarker yang berjulat daripada 0.000 – 1.0000. Sekiranya nilai jarak genetik antara individu cendawan tiram adalah sama maka dikumpulkan dalam kumpulan yang sama. Dua kumpulan telah dihasilkan berdasarkan jarak genetik individu cendawan tiram, kumpulan 1 terdiri daripada MP59 dan MP60 (mempunyai jarak genetik yang sama iaitu 0.25) (*Rajah 1*).

Jadual 1. Pencirian enam pencetus SSR polimorfik untuk pengenotipan DNA 13 cendawan tiram

| Pencetus SSR | Kekerapan alel | Bilangan alel | Kepelbagaian genetik | Heterozigositi | PIC |
|--------------|----------------|---------------|----------------------|----------------|--------|
| GB-PO-006 | 0.4231 | 10.0000 | 0.7692 | 0.6154 | 0.7488 |
| GB-PO-025 | 0.1154 | 14.0000 | 0.9142 | 0.6154 | 0.9077 |
| GB-PO-039 | 0.3077 | 7.0000 | 0.7781 | 1.0000 | 0.7471 |
| GB-PO-080 | 0.3077 | 8.0000 | 0.8047 | 0.6923 | 0.7792 |
| GB-PO-097 | 0.1923 | 16.0000 | 0.9053 | 0.9231 | 0.8984 |
| GB-PO-173 | 0.3846 | 9.0000 | 0.8018 | 0.7692 | 0.7848 |
| Purata | 0.2885 | 10.6667 | 0.8289 | 0.7692 | 0.8110 |



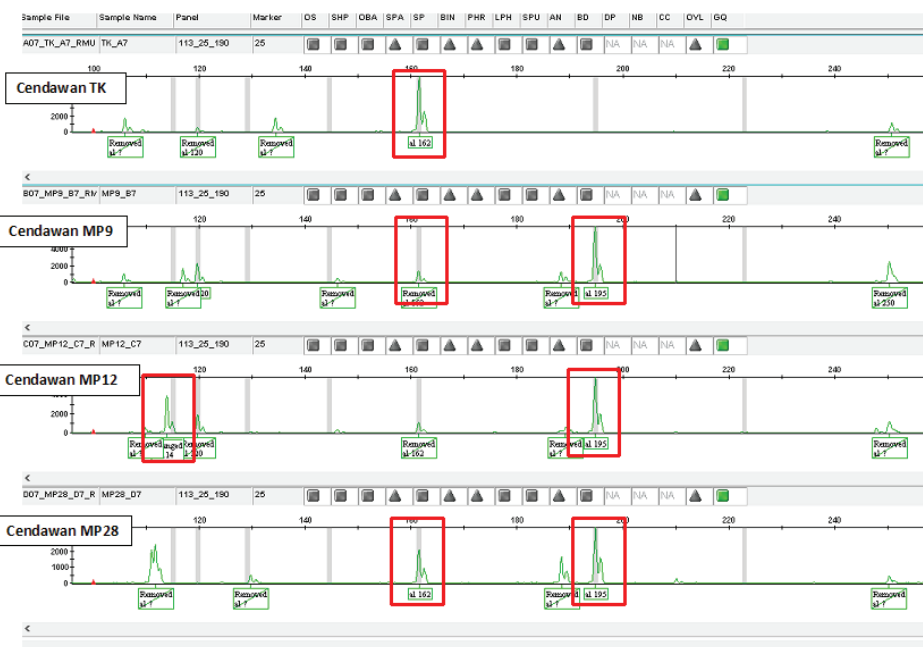
Rajah 1. Pepohon filogenetik jenis unweighted pair-group method for arithmetic averages (UPGMA) untuk 13 cendawan tiram yang terbahagi kepada dua kumpulan

Manakala kumpulan II boleh dibahagikan kepada dua subkumpulan iaitu subkumpulan IIa terdiri daripada MP9 (jarak genetik 0.17), MP12 (jarak genetik 0.13), MP28 (jarak genetik 0.13), CCTK (jarak genetik 0.17), MP53 (jarak genetik 0.17), MP35 (jarak genetik 0.23), MP52 (jarak genetik 0.17) dan TK (jarak genetik 0.17), manakala subkumpulan IIb terdiri daripada MP58 (jarak genetik 0.33), MP11 (jarak genetik 0.08) dan MP22 (jarak genetik 0.08) (*Rajah 1*). Perbezaan antara subkumpulan IIa dan IIb mempunyai perbezaan jarak genetik sebanyak 0.01. Perbandingan biologi antara subkumpulan IIa dan subkumpulan IIb adalah ciri biologi jana buah yang besar dan berat yang tinggi (subkumpulan IIa) berbanding dengan jana buah sederhana (subkumpulan IIb), struktur topi melengkung (subkumpulan IIa) berbanding dengan topi rata (subkumpulan IIb) dan kitar pengeluaran antara 45 hari (subkumpulan IIa) berbanding dengan 60 hari (subkumpulan IIb). Implikasi industri cendawan tiram subkumpulan IIa memberikan hasil pengeluaran yang tinggi berbanding dengan subkumpulan IIb. Perbezaan kumpulan I dan II mempunyai jarak genetik sebanyak 0.23. Perbandingan biologi antara kumpulan I dan kumpulan II ialah kumpulan I merupakan cendawan tiram yang unik manakala kumpulan II cendawan tiram biasa yang mewakili cendawan tiram komersial. Dengan adanya pepohon filogenetik cendawan tiram, setiap individu cendawan tiram dikumpulkan mengikut persamaan dan perbezaan genetik yang terhasil daripada pencetus SSR dan seterusnya dapat membentuk cap jari DNA. Sebagai contoh pencetus SSR GB-PO-025 menghasilkan alel yang unik ditunjukkan oleh elektroferogram daripada alat ABI3730XL (*Rajah 2*).

Kaedah morfologi fizikal telah digunakan untuk mengenal pasti cendawan tiram MARDI sejak sekian lama. Namun begitu, terdapat kekurangan pencirian secara morfologi iaitu memerlukan kepakaran individu. Selain itu, pencirian morfologi cendawan tiram turut dipengaruhi oleh faktor persekitaran. Untuk mengatasi masalah tersebut cap jari DNA menggunakan enam pencetus SSR iaitu GB-PO-006, GB-PO-025, GB-PO-039, GB-PO-080, GB-PO-097 dan GB-PO-173 dan berupaya untuk membezakan 13 cendawan tiram MARDI.

(a)

Pencetus GB-PO-25



(b)





Rajah 2. Elektroferogram daripada alat ABI3730XL bagi pencetus GB-PO-25 yang menghasilkan alel unik yang boleh digunakan sebagai cap jari DNA. Bagi cendawan TK (alel 162), MP9 (alel 195), MP12 (alel 114 dan 195), MP28 (alel 162 dan 195), MP35 (alel 119 dan 250), MP11 (alel 109 dan 223), MP22 (alel 223 dan 250), MP52 (alel 115), MP53 (alel 120 dan 145), MP58 (alel 133), MP59 (alel 129), MP60 (alel 129), CCTK (alel 120 dan 162) dan kawalan (tiada DNA cendawan) tiada alel yang terhasil

Kesimpulan

Sepuluh pencetus SSR telah berjaya dioptimasi daripada 36 pencetus SSR yang dikenal pasti untuk kajian cap jari cendawan tiram MARDI. Hanya enam sahaja pencetus SSR menghasilkan alel polimorfik yang digunakan dalam menjana pohon filogenetik cendawan tiram. Pepohon filogenetik telah membahagikan cendawan tiram kepada dua kumpulan. Kumpulan 1 terdiri daripada MP59 dan MP60, manakala kumpulan II boleh dibahagikan kepada dua subkumpulan iaitu IIa dan IIb. Subkumpulan IIa terdiri daripada MP9, MP12, MP28, CCTK, MP53, MP35, MP52 dan TK manakala subkumpulan IIb terdiri daripada MP58, MP11 dan MP22. Pengenalpastian cendawan tiram menggunakan cap jari DNA boleh dilakukan dengan menggunakan enam pencetus SSR iaitu GB-PO-006, GB-PO-025, GB-PO-039, GB-PO-080, GB-PO-097 dan GB-PO-173. Teknologi cap jari DNA cendawan tiram boleh digunakan dalam menyokong pencirian morfologi cendawan tiram. Selain itu, cap jari DNA cendawan tiram dapat menentukan ketulenan benih cendawan tiram dalam mengawal pencemaran dengan percampuran benih cendawan yang kurang berkualiti demi meningkatkan produktivi industri cendawan.

Bibliografi

- Arif, I. A., Khan, H. A., Shobrak, M., Al Homaidan, A. A., Al Sadoon, M., Al Farhan, A. H., & Bahkali, A. H. (2010). Interpretation of electrophoretograms of seven microsatellite loci to determine the genetic diversity of the Arabian Oryx. *Genetics and Molecular Research*, 9(1), 259–265.
- Gonzalez, P., & Labarere, J. (2000). Phylogenetic relationships of *Pleurotus* species according to the sequence and secondary structure of the mitochondrial small-subunit rRNA V4, V6 and V9 domains. *Microbiology*, 146, 209–221.
- Jamaludin, M. R. (2025). Industri cendawan dunia. *Agrimag*, 30, 8–13.
- Khairul, A. K., Ganisan, K., Mohd, Z. M. A., Ten, S. T., Haryati, M., MUSAALBAKRI, A. M., AHMAD, F. B., SYALIYANA, K., & ABU, B. O. (2023). SCIPe MARDI: Pakej lengkap untuk industri cendawan tempatan. *Buletin Teknologi MARDI*, Bil. 36, 153–166.
- Kyung-Ho, Gi-An, L., Sok-Young, L., Jae-Gyun, G., Tae-San, K., Won-Sik, K., Kyoung-In, S., Gang-Seob, L., & Yong-Jin, P. (2009). Development and characterization of new microsatellite markers for the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *J. Microbiol. Biotechnol*, 9, 851–857.
- Liu, K., & Muse, S. V. (2005). PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics*, 21, 2128–2129.
- Matthew, J. H., Thao, M. N., Amanda, W., & Kenneth, J. C. (2008). Multiplex-Ready PCR: A new method for multiplexed SSR and SNP genotyping. *BMC Genomics*, 9, 80.
- Manen, J. F., Bouby, L., Dalnoki, O., Marival, P., Turgay, M., & Schlumbaum, A. (2003). Microsatellites from archaeological *Vitis vinifera* seeds allow a tentative assignment of the geographical origin of ancient cultivars. *J. Archaeol. Sci.*, 30, 721–729.

- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., & Rafalski, A. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol. Breed*, 2, 225–238.
- Scott, K. D., Egger, P., Seaton, G., Rossetto, M., Ablett, E. M., Lee, L. S., & Henry, R. J. (2000). Analysis of SSRs derived from grape ESTs. *Theor. Appl. Genet.*, 100, 723–726.
- Slavov, G. T., Howe, G. T., Gyaourova, A. V., Birkes, D. S., & Adams, W. T. (2005). Estimating pollen flow using SSR markers and paternity exclusion: accounting for mistyping. *Mol. Ecol.*, 14, 3109–3121.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, F.W., Wills, P.D., & Shipley, P. (2004). MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4, 535–538.
- Yong-Bao, P. (2016). Development and integration of an SSR-based molecular identity database into sugarcane breeding program. *Agronomy*, 6(2), 28.

Ringkasan

Cendawan tiram (*Pleurotus pulmonarius*) yang telah dibangunkan oleh MARDI mempunyai nilai komersial yang setanding dengan cendawan tiram komersial. Dalam kajian ini, analisis kepelbagaian genetik isolat cendawan tiram dijalankan dengan menggunakan pencetus SSR. Sebanyak 36 pencetus SSR telah dipilih dan dijalankan proses optimisasi PCR. Sepuluh SSR yang berjaya dioptimisasi dan analisis serpihan DNA telah dijalankan ke atas 13 cendawan tiram. Enam pencetus SSR yang polimorfik dikenal pasti dengan kekerapan alel daripada julat 0.1154 – 0.4231, bilangan alel daripada 7 – 16, kepelbagaian gen daripada julat 0.7781 – 0.9142 dan kandungan maklumat polimorfik daripada julat 0.7471 – 0.9077. UPGMA mengelompokkan 13 cendawan tiram kepada dua kumpulan. Pencetus SSR ini berupaya digunakan sebagai cap jari DNA untuk membezakan cendawan tiram MARDI.

Summary

Oyster mushroom (*Pleurotus pulmonarius*) developed by MARDI has a commercial value comparable to commercial oyster mushrooms. In this study, oyster mushroom isolates were subjected to genetic diversity analysis using Simple Sequence Repeats (SSR) marker. A total of 36 SSR markers were selected and PCR optimisation was performed. Ten SSR markers were successfully optimised using PCR and were amplified on 13 oyster mushrooms. Six polymorphic SSR markers were identified with allele frequencies ranging from 0.1154 – 0.4231, allele numbers from 7 – 16, gene diversity ranging from 0.7781 – 0.9142 and Polymorphic Information Content ranging from 0.7471 – 0.9077. UPGMA dendrogram grouped the 13 oyster mushrooms into two groups. These SSR markers can be used as DNA fingerprints to distinguish MARDI oyster mushrooms.

Pengarang

Khairun Hisam Nasir (Dr.)
Pusat Penyelidikan Bioteknologi dan Nanoteknologi,
Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM,
43400 Serdang, Selangor
E-mel: hairin@mardi.gov.my

Ganisan Krishnen (Dr.) dan Khairul Asfamawi Khulidin
Pusat Penyelidikan Sains Tanah, Air dan Baja,
Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM,
43400 Serdang, Selangor

Siti Nadhrah Abd Hisham
Pusat Penyelidikan Bioteknologi dan Nanoteknologi,
Ibu Pejabat MARDI Persiaran MARDI-UPM,
43400 Serdang, Selangor