

**KAJIAN FILOGENETIK DAN MORFOLOGI
GENUS *THRIXSPERMUM*
(ORCHIDACEAE) DI SABAH**

MAHANI MOHD ISA



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

**TESIS INI DISERAHKAN UNTUK MEMENUHI
KEPERLUAN PENGIJAZAHAN IJAZAH
SARJANA SAINS**

**INSTITUT BIOLOGI TROPIKA DAN
PEMULIHARAAN
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH
2017**

UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

BORANG PENGESAHAN STATUS TESIS

JUDUL: **KAJIAN FILOGENETIK DAN MORFOLOGI GENUS (*THRIXSPERMUM*) DI SABAH**

IJAZAH: **IJAZAH SARJANA SAINS (BIODIVERSITI DAN BIOSISTEMATIK)**

Saya, **MAHANI MOHD ISA**, sesi pengajian **2013-2014**, mengaku membenarkan tesis sarjana ini disimpan di Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dengan syarat-syarat seperti berikut:-

1. Tesis ini adalah hak milik Universiti Malaysia Sabah.
2. Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dibenarkan membuat salinan untuk pengajian sahaja.
3. Perpustakaan dibenarkan membuat salinan tesis ini sebagai bahan pertukaran antara institusi pengajian tinggi

4. Sila tanda (/)

☐ SULIT (Mengandungi maklumat yang berdarjah keselamatan atau kepentingan Malaysia seperti yang termaktub di dalam AKTA RAHSIA 1972)

☐ TERHAD (Mengandungi maklumat TERHAD yang telah ditentukan oleh organisasi/badan di mana penyelidikan dijalankan)

☒ TIDAK TERHAD



MAHANI MOHD ISA
MX1321004T

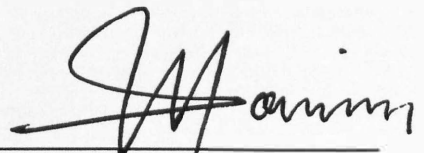
Disahkan oleh,

NURULAIN BINTI ISMAIL

LIBRARIAN

UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

(Tandatangan Pustakawan)



(Prof. Madya Dr. Monica Suleiman)

Penyelia



(Dr. Liew Thor Seng)

Penyelia Bersama

Tarikh: 7 September 2017

PENGAKUAN

Karya ini adalah hasil kerja saya sendiri kecuali nukilan, ringkasan dan rujukan yang tiap-tiap satunya telah saya jelaskan sumbernya.



30 Ogos 2017

Mahani Mohd Isa
(MX1321004T)



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

PENGESAHAN

NAMA : MAHANI MOHD ISA

NO. MATRIX : MX1321004T

TAJUK : KAJIAN FILOGENETIK DAN MORFOLOGI GENUS
(*THRIXSPERMUM*) DI SABAH

IJAZAH : IJAZAH SARJANA SAINS
(BIODIVERSITI DAN BIOSISTEMATIK)

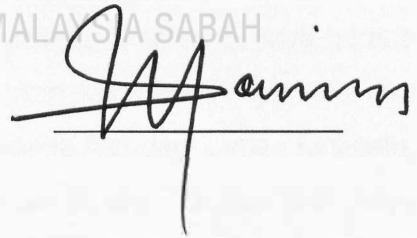
TARIKH VIVA : 18 JUN 2017

DISAHKAN OLEH;

1. **PENYELIA UTAMA**

Prof. Madya. Dr. Monica Suleiman

Tandatangan



2. **PENYELIA BERSAMA**

Dr. Liew Thor Seng



PENGHARGAAN

Saya ingin mengucapkan setinggi-tinggi penghargaan kepada semua yang telah membantu saya tidak kira secara langsung mahupun tidak langsung dalam menyiapkan kajian ini. Terima kasih diucapkan kepada kedua ibu dan bapa saya yang saya kasihi kerana telah banyak bersabar dalam memberikan sokongan moral kepada saya selama tempoh kajian ini dijalankan. Tanpa sokongan dari mereka saya tidak mampu untuk menyiapkan tesis ini dengan jayanya.

Ucapan terima kasih juga diucapkan kepada ketiga-tiga penyelia yang saya hormati iaitu Dr. Monica Suleiman, Dr. Liew Thor Seng dan Pn. Lam Nyee Fan yang telah banyak membimbing saya sewaktu kajian ini dilakukan. Banyak tunjuk ajar yang telah saya pelajari dari mereka. Dr. Monica banyak membantu saya dalam mengenali dan memahami subjek kajian saya. Manakala Dr. Liew dan Pn. Lam banyak membimbing saya sewaktu kerja-kerja makmal molekular dijalankan. Menerusi bimbingan, nasihat dan juga kesabaran mereka akhirnya saya berjaya menyiapkan kajian saya.

Kepada semua staf yang berada di Institut Biologi Tropika dan Pemuliharaan, ucapan terima kasih diucapkan kerana telah membantu saya sewaktu saya berada di Institut ini. Bantuan mereka ketika saya melakukan kerja-kerja lapangan dan kerja-kerja makmal amat saya hargai. Seterusnya kepada staf dari Taman Kinabalu, Taman Kipandi dan pengkaji orkid yang telah membantu saya, terima kasih saya ucapkan. Tunjuk ajar dari mereka banyak membantu saya mengenali dan memahami genus *Thrixspermum* dengan lebih lanjut.

Akhir sekali kepada semua sahabat-sahabat pascasiswazah IBTP yang saya sayangi, terutamanya Fauziah, Syamimi, Nurain, Nor Hazami, Joanni, Jannah, Mumtaz, Aqilah dan Suzila terima kasih saya ucapkan. Kehadiran kamu semua di sepanjang tempoh pengajian ini banyak memberikan suntikan semangat kepada saya. Semoga kita bersama-sama memperoleh kejayaan.

Mahani Mohd Isa

30 Ogos 2017

ABSTRAK

Thrixspermum merupakan genus orkid yang kurang diketahui dan difahami. Tempoh bunga mekar pendek, spesimen rujukan dan deskripsi asal spesies yang kurang baik menyebabkan masalah identifikasi dan klasifikasi. Terdapat tiga objektif dalam kajian ini iaitu untuk mewujudkan DNA Barcoding bagi genus *Thrixspermum* di Sabah, untuk menjelaskan kekeliruan hubungan di antara seksyen dalam genus *Thrixspermum* dengan menggunakan analisis molekular ITS dan rbcL berdasarkan kawasan nuklear ribosomal DNA dan kawasan kloroplas, dan untuk mendokumentasikan ciri morfologi ringkas spesies *Thrixspermum*. Sebanyak 27 spesimen (10 berbunga, 17 tidak berbunga) telah dikumpulkan yang terdiri daripada 26 *Thrixspermum* dan satu *Cordiglottis fulgens* iaitu sinonim kepada *Thrixspermum*. Dua-puluh satu spesimen telah dikenalpasti sehingga ke peringkat seksyen Schlechter (diadaptasi pada 1911): *Thrixspermum*, *Dendrocolla* dan *Katocolla*. Kaedah pengekstrakan molekular adalah berdasarkan protokol piawai CTAB dan menggunakan protokol yang diterbitkan oleh kit pengekstrakan tumbuhan Dneasy. Protokol PCR dan Agarose gel elektroforesis menggunakan protokol piawai orkid. Penulenan, kitaran penjujukan, pemendakan dan penjujukan adalah menggunakan kit protokol dari QIAGEN. Hasil jujukan disusun secara manual dengan menggunakan perisian BioEdit versi 7.2.2.0. Fail jujukan yang telah disusun ditukar ke fail Nexus dan digunakan dalam analisis filogenetik *Maksimum Likelihood* dan *Bayesian Inference*. Panjang jujukan ITS dan rbcL adalah masing-masing diantara 705-862 jujukan (bp) dan 632-737 bp. Jujukan bagi dua wilayah piawai kodbar telah diuji untuk jarak genetik. Jarak-jarak genetik dalam genus berdasarkan ITS dan rbcL masing-masing adalah 0.36-75 dan 0.98-75. Hubungan filogenetik kombinasi dua kawasan DNA dilakukan dengan menggunakan 27 spesimen dan satu outgroup (*Phalaenopsis aphrodite* Rchbf.f). Pokok filogenetik berdasarkan dataset gabungan (ITS dan rbcL) menghasilkan gambaran jelas mengenai hubungan seksyen dalam *Thrixspermum*. Pokok filogenetik terdiri daripada dua klad monofiletik utama, dan klad terbentuk mengikut kepada kumpulan seksyen *Thrixspermum* dan *Dendrocolla* seperti yang diperkenalkan oleh Schlechter (1911). *Thrixspermum pensile* (Katocolla sek.) terletak di antara dua klad utama. Walaupun, *T. pensile* adalah monofiletik dengan klad dari sek. *Thrixspermum*, tetapi nilai sokongan yang diperolehi adalah rendah iaitu 44 bp. Data molekul kajian ini tidak dapat memberikan sokongan samada pembentukan sek. *Katocolla* boleh terjadi dan juga tidak membuktikan kebarangkalian bahawa spesies dari seksyen tersebut mungkin tertanam di dalam dua kumpulan seksyen lain akibat dari limitasi spesimen dan jujukan. Pemansuhan sek. *Katocolla* seperti dicadangkan oleh O'Byrne tidak boleh disokong oleh kajian ini. Walau bagaimanapun, kajian ini berjaya menyediakan data molekul menyokong pembentukan dua seksyen *Thrixspermum* yang lain (sek. *Thrixspermum* dan *Dendrocolla*). Kajian ini juga telah membuktikan genus *Cordiglottis* adalah sinonim kepada *Thrixspermum* berdasarkan kedudukan *Cordiglottis fulgens* dalam klad sect. *Thrixspermum*. Ciri-ciri morfologi bagi sebelas spesies *Thrixspermum* telah didokumentasikan secara ringkas dan menyeluruh.

ABSTRACT

PHYLOGENETIC AND MORPHOLOGICAL STUDY OF GENUS THRIXSPERMUM (ORCHIDACEAE) IN SABAH

Thrixspermum is a little-known and poorly understood orchid genus. Ephemeral flower characters, poor type material and poor original species descriptions are causing misidentification and classification problem. There are three objectives in this study which is to establish DNA Barcoding for the genus *Thrixspermum* in Sabah, to clear the confusion between sections in the genus *Thrixspermum* by using molecular analysis of ITS and *rbcl* based on the nucleus of ribosomal DNA and chloroplast areas, and to document brief morphological characters of *Thrixspermum* species. A total of 27 specimens (10 fertile, 17 infertile) were collected comprising of 26 *Thrixspermum* and one *Cordiglottis fulgens*, which was a synonym of *Thrixspermum*. Twenty-one specimens were identified up to Schlechter's section level (adopted in 1911): *Thrixspermum*, *Dendrocolla* and *Katocolla*. Molecular work employed a standard extraction protocol of CTAB and using protocol given by the DNeasy plant extraction kit. PCR and Agarose gel electrophoresis used a standard orchid protocol. Purification, cycle sequencing, precipitation and sequencing were carried out using kit and the standard protocol from QIAGEN. Sequences product was re-align manually using the BioEdit version 7.2.2.0 software. The re-aligned sequences files were then converted to Nexus file and the data then use in phylogenetic analysis of the Maximum Likelihood and Bayesian Inference. *Thrixspermum* sequences were deposited in GenBank through Barcoding of Life Database (BOLD) and accession numbers were successfully obtained. The length of ITS region ranged from 705-862 base pair (bp) and *rbcl* 632-737 bp. The sequences of two standard regions as barcodes were tested for genetic distances. The genetic distances within the genus based on ITS and *rbcl* ranged from 0.36 to 75 and 0.98 to 75, respectively. Phylogenetic relationship of two combined DNA regions was done employing 27 specimens and one outgroup (*Phalaenopsis aphrodite* Rchbf.f). Phylogenetic trees based on combined dataset (ITS and *rbcl*) produced a clear picture on the section relationship within the *Thrixspermum*. Phylogenetic tree consists of two main monophyletic clades, and

the clades formed according to the groups of section *Thrixspermum* (67bp) and *Dendrocolla* (83bp) introduced by Schlechter (1911). *Thrixspermum pensile* (*Katocolla* sect.) located between the two major clades. Although, *T. Pensile* is monophyletic with *Thrixspermum* sect. clade, but the support value obtained was low at 44 bp. Molecular data of this research unable to neither provide support to the formation of *Katocolla* sect. nor prove the probability of species *Katocolla* sect. might embedded inside the other two section groups due to the specimen and sequence limitation. Nullification of *Katocolla* sect. proposed by O'Byrne could not be supported by this research. However, this research provided a molecular data supporting the formation of the other two sections in *Thrixspermum* (*Thrixspermum* and *Dendrocolla*). This study also has proven that genus *Cordiglottis* is a valid synonym of *Thrixspermum* based on the inclusion of *Cordiglottis fulgens* in the sect. *Dendrocolla* clad. A concise morphological characteristic of eleven *Thrixspermum* species were documented.



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

SENARAI KANDUNGAN

	Halaman
TAJUK	i
PENGAKUAN	ii
PENGESAHAN	iii
PENGHARGAAN	iv
ABSTRAK	v
<i>ABSTRACT</i>	vi
SENARAI KANDUNGAN	viii
SENARAI JADUAL	xi
SENARAI RAJAH	xii
SENARAI SINGKATAN DAN SIMBOL	xv
SENARAI LAMPIRAN	xvi
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Kajian	1
1.2 Justifikasi Kajian	3
1.3 Hipotesis	5
1.4 Objektif	5
BAB 2 KAJIAN KEPUSTAKAAN	6
2.1 Genus <i>Thrixspermum</i>	6
2.1.1 Kepelbagaian dan Taburan	6
2.1.2 Senarai Lengkap Spesies <i>Thrixspermum</i> di Sabah	7
2.1.3 Taksonomi dan Morfologi	9
2.1.4 Habitat dan Ekologi	12
2.1.5 Masalah <i>Thrixspermum</i>	13
2.2 Sistematik dan Taksonomi	14
2.3 Filogeni dan Filogenetik	15
2.4 Genom DNA	16
2.5 Kodbar DNA	17
2.6 Primer	18
2.6.1 <i>Ribulose Biphosphate Carboxylase Large (rbcl)</i>	20

2.6.2	<i>Internal Transcribe Spacer (ITS)</i>	20
2.7	Kajian Molekular Lepas	22
BAB 3	KAEDAH KAJIAN	24
3.1	Lokasi Kajian	24
3.2	Kaedah Persampelan Spesimen	24
3.2.1	Spesimen Baucar Herbarium	24
3.2.2	Sampel untuk Molekular DNA	26
3.3	Koleksi Data Spesimen	26
3.4	Analisis Makmal	27
3.4.1	Pengestrakkan	27
3.4.2	Amplifikasi Tindak Balas Rantaian Polimeras (PCR)	30
3.4.3	Elektroforesis Gel Agaros	32
3.4.4	Penulinan dan Kitaran Jujukan	33
3.4.5	Pemendakkan dan Jujukan DNA	34
3.5	Analisis Data	35
3.5.1	Kodbar DNA	36
3.5.2	Analisis Filogenetik	36
3.5.3	Analisis Morfologi	37
BAB 4	KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN	39
4.1	Spesimen <i>Thrixspermum</i>	39
4.2	Hasil Pengestrakkan dan Produk PCR	40
4.3	Kodbar DNA	42
4.3.1	<i>Internal transcribe spacer (ITS)</i>	47
4.3.2	<i>Ribulose biphosphate carboxylase large (rbcL)</i>	47
4.4	Filogenetik	50
4.4.1	<i>Maximum Likelihood (ML)</i> dan <i>Bayesian Inference (BI)</i>	50
4.4.2	<i>Thrixspermum fulgens</i> (Sinonim <i>Cordiglottis fulgens</i>)	56
4.4.3	Perbandingan di antara Dua Primer Berbeza Analisis <i>Bayesian Inference</i>	57
4.5	Ciri-ciri Morfologi Spesies <i>Thrixspermum</i>	59
4.5.1	Seksyen <i>Thrixspermum</i>	60

4.5.2	Seksyen <i>Dendrocolla</i>	67
4.5.3	Seksyen <i>Katocolla</i>	71
4.5.4	Identifikasi Spesies Menerusi Ciri Unik Bukan Bunga	72

BAB 5 KESIMPULAN DAN CADANGAN	73
RUJUKAN	75
LAMPIRAN	85



SENARAI JADUAL

		Halaman
Jadual 2.1	Senarai spesies <i>Thrixspermum</i> di Sabah.	8
Jadual 3.1	Jenis primer dan jujukan.	30
Jadual 3.2	Top Taq PCR resepi.	30
Jadual 3.3	Go Tag PCR resepi.	31
Jadual 3.4	Protokol bagi rbcl primer.	31
Jadual 3.5	Protokol bagi ITS primer.	32
Jadual 3.6	Kuantiti reagen tindak balas.	34
Jadual 3.7	Protokol kitaran jujukan.	34
Jadual 3.8	Kuantiti reagen tindak balas pemendakan.	35
Jadual 4.1	Data dan nombor siri kemasukan GenBank spesimen.	45
Jadual 4.2	Hasil analisis ringkasan jarak antara jujukan (<i>Distant summary</i>) dalam genus.	46
Jadual 4.3	Senarai Jujukan Hampir Sama dalam Genebank	48

SENARAI RAJAH

		Halaman
Rajah 2.1	Dua jenis jambak bunga yang membezakan seksyen <i>Dendrocolla</i> dan <i>Thrixspermum</i> .	10
Rajah 2.2	Dua bentuk bunga yang sering ditemui bagi spesies <i>Thrixspermum</i> ; kelopak dan sepal pendek dan lebar (kiri), petal dan sepal panjang dan tirus (kanan).	12
Rajah 2.3	Contoh Kawasan ITS di Region Nuklear, ITS 4 Terletak di Kawasan 26sr RNA Manakala ITS 5 Terletak di Kawasan 18sr RNA.	21
Rajah 3.1	Peta Lokasi Kawasan Kerja Lapangan. Bintang Kuning Merujuk Kepada Kawasan Persampelan.	25
Rajah 3.2	Protokol analisis makmal.	27
Rajah 4.1	Hasil PCR Gel Agaros (a) Penanda ITS dan (b) Penanda rbcL	41
Rajah 4.2	Contoh maklumat spesimen (<i>Thrixspermum linusii</i>) dalam BOLD.	43
Rajah 4.3	Contoh data jujukan spesimen (<i>Thrixspermum linusii</i>) dalam pengkalan data kodbar (BOLD).	44
Rajah 4.4	Pokok filogenetik dengan 'proportional branch length' hasil analisis ML berdasarkan gabungan primer ITS dan rbcL. Warna biru: <i>Thrixspermum sek.</i> , merah: <i>Dendrocolla sek.</i> , hijau: <i>Katocolla sek.</i> , hitam: Outgroup. Segi empat mewakili nod untuk klad manakala segitiga mewakili nod bagi subklad.	51

Rajah 4.5	Pokok filogenetik dengan 'proportional branch length' hasil analisis ML berdasarkan gabungan primer ITS dan rbcL warna biru: <i>Thrixspermum sek.</i> , merah: <i>Dendrocolla sek.</i> , hijau: <i>Katocolla sek.</i> , hitam: Outgroup dan spesimen seksyen tidak diketahui. Segi empat mewakili nod untuk klad manakala segitiga mewakili nod bagi subklad.	52
Rajah 4.6	(a) Hasil analisis dengan menggunakan primer rbcL, (b) Hasil analisis dengan menggunakan primer ITS. Warna biru adalah spesimen dari seksyen <i>Thrixspermum</i> dan warna merah adalah spesimen dari seksyen <i>Dendrocolla</i>	58
Rajah 4.7	Contoh jambak bunga seksyen <i>Thrixspermum</i>	60
Rajah 4.8	<i>Thrixspermum acuminatissimum</i> ; A) habitat, B) jambak bunga, dan C) bunga.	61
Rajah 4.9	<i>Thrixspermum caudatum</i> ; A) bunga, B) habitat dan C) jambak bunga.	62
Rajah 4.10	<i>Thrixspermum chanianum</i> ; A) habitat, B) bunga, C) jambak bunga, dan D) daun.	63
Rajah 4.11	<i>Thrixspermum latisaccatum</i> ; A) habitat, B) bunga, C) jambak bunga, dan D) daun.	64
Rajah 4.12	<i>Thrixspermum tortum</i> ; A) habitat, B) jambak bunga dan bunga, dan C) daun.	65
Rajah 4.13	<i>Thrixspermum ventricosum</i> ; A) habitat, B) bunga, dan C) jambak bunga.	66
Rajah 4.14	Jambak bunga seksyen <i>Dendrocolla</i>	67
Rajah 4.15	<i>Thrixspermum fulgens</i> ; A) habitat, B) hadapan bunga, dan C) sisi bunga.	68

Rajah 4.16	<i>Thrixspermum linusii</i> ; A) habitat, B) bunga, dan C) daun.	69
Rajah 4.17	<i>Thrixspermum merguense</i> ; A) bunga dan jambak bunga, dan B) habitat.	70
Rajah 4.18	<i>Thrixspermum pensile</i> ; A) habitat dan B) daun.	71
Rajah 4.19	<i>Thrixspermum amplexicaule</i> ; A) habitat dan B) daun.	72



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

SENARAI SINGKATAN DAN SIMBOL

-	-	Negatif
°C	-	Darjah celsius
µl	-	Microlit
BI	-	<i>Bayesian Inference</i>
BOLD	-	<i>Barcoding of Life Database</i>
bp	-	Jujukan
cpDNA	-	DNA kloroplas
<i>et al.</i>	-	dan lain
ETBR	-	Ethidium bromida
GPS	-	Sistem kedudukan global
ITS	-	<i>Internal Transcribe Spacer</i>
M	-	Molar
ml	-	Mililiter
ML	-	<i>Maximum Likelihood</i>
mtDNA	-	DNA motokondrial
nrDNA	-	DNA nuklear
rbcl	-	<i>Ribulose Biphosphate Carboxylase Large</i>
rpm	-	Putaran seminit
sp.	-	Spesies
sp. nov.	-	Spesies nova
x g	-	Gforce

SENARAI LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran A ABI Chromatogram	85
Lampiran B Clustal W	87
Lampiran C Gambar spesimen	88
Lampiran D Halaman portal Cipress	93



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

BAB 1

Pengenalan

1.1 Latar Belakang Kajian

Thrixspermum merupakan salah satu daripada 800 genera dalam famili Orchidaceae. Genus ini kurang mendapat perhatian dari para pengkaji orkid kerana keadaan bunga efimeral iaitu tempoh masa bunga berkembang adalah singkat. Oleh yang demikian, kajian yang telah dijalankan ke atas genus ini adalah sedikit, mengakibatkan kurang maklumat yang boleh digunakan oleh para pengkaji orkid sebagai sumber rujukan (O'Byrn, Teck dan Vermuelen, 2015). Akibatnya, *Thrixspermum* merupakan satu genus yang kurang dikenali berbanding dengan genera lain seperti *Paphiopedilum* (orkid selipar). Perkataan *Thrixspermum* digunakan buat pertama kali oleh Juan Loreiro pada tahun 1790 (Mao, Rao, Nageswara dan Apong, 2010). *Thrixspermum* bermaksud bijih benih yang menyerupai bulu atau rerambut dan digambarkan seakan berbentuk sperma. Huraian biji benih tersebut berasal dari perkataan Yunani "*Thrix*" dan perkataan ini tepat menggambarkan rupa fizikal biji benih bagi kebanyakan spesies di dalam genus tersebut (Wood, Beaman, Lamb, Chew dan Beaman, 2011).

Thrixspermum adalah tumbuhan monopodial samada dari jenis epifit ataupun litofit. Orkid penumpang ini jarang ditemui tumbuh terus dari permukaan tanah. Jumlah spesies bagi genus ini dipercayai diantara 100 ke 150 spesies di seluruh dunia (Wood dan Chen, 2009; Seidenfaden, 1992). Manakala menurut O'Byrn *et al.* (2015) pula, hampir 170 spesies telah direkodkan dalam genus ini dan spesies tersebut telah disenaraikan oleh Govaerts *et al.* (2014). Borneo mencatatkan 52 spesies dan Sabah pula 42 spesies. Jumlah spesies di Sabah termasuk spesies baru yang direkodkan pada tahun 2016. Dari segi taburan geografi, genus ini boleh ditemui bermula dari kawasan Sri Lanka dan timur Himalaya ke kawasan kepulauan pasifik tetapi berpusat di Asia Tenggara dan kawasan serantaunya (Wood dan Crib, 1991; Comber, 2001). Sumatera kawasan *hotspot* yang merekodkan jumlah spesies dan endemisme tertinggi.

Kaedah sistematik bertujuan mengklasifikasikan hidupan pada satu kumpulan tertentu. Pada awalnya sistematik dilakukan berdasarkan maklumat ciri-ciri morfologi bagi setiap spesimen yang berjaya diperolehi dan kini, data DNA boleh digunakan dalam teknik klasifikasi. Dewasa ini, maklumat DNA digunakan dalam proses identifikasi dan jujukan DNA ini juga berfungsi sebagai satu kaedah piawaian dalam kerja-kerja identifikasi spesies (Laprise, 2010). Kaedah identifikasi dengan menggunakan jujukan DNA pendek juga dikenali sebagai teknik barcoding DNA. Hebert, Cywiska, Ball dan de Ward (2003), menyatakan bahawa penggunaan teknik ini dalam proses mengenalpasti meningkat naik atas faktor ketepatan dalam mengenalpasti spesies.

Kodbar DNA dan kajian filogenetik merupakan maklumat tambahan penting dalam mengenalpasti dan mengelaskan sebarang benda hidup sehingga ke peringkat spesies. Mengenalpasti orkid berdasarkan ciri-ciri morfologi sahaja adalah sukar terutamanya apabila sampel yang diperolehi daripada lapangan adalah tidak lengkap. Oleh kerana tempoh masa bunga *Thrixspermum* yang singkat, spesimen orkid yang diperolehi ketika kerja lapangan selalunya tidak lengkap, dan ini menyukarkan para penyelidik untuk mengenalpasti orkid tersebut. Dengan itu, data kodbar DNA adalah amat berguna untuk membantu mengenalpasti spesies orkid yang berada dalam keadaan seumpama itu. Dodson (2005) menyatakan bahawa kajian DNA dan RNA serta kajian kladistik menjanjikan bahawa hubungan filogenetik diantara setiap spesies dan genus akan lebih mudah difahami.

Terdapat pelbagai jenis primer yang boleh digunakan dalam kajian molekular dan jenis primer berbeza digunakan bagi mengamplifikasikan kawasan (region) DNA yang berbeza. Keseluruhan jujukan DNA bagi sesuatu organisma adalah sukar diperolehi, walau bagaimanapun sebahagian jujukan DNA sudah mencukupi bagi tujuan identifikasi spesies. Menurut Liu, Beyrend-Dur, dan Ban (2014), primer ITS kerap digunakan dalam kajian identifikasi Orchidaceae. *Consortium Barcode of Life* (CBOL) mencadangkan tiga primer yang sesuai digunakan untuk tujuan identifikasi tumbuhan iaitu trnH-psbA, matK dan rbcL (Laprise, 2010). Ketiga-tiga primer tersebut mengamplifikasi kawasan genom kloroplas. Bagi tujuan identifikasi yang tepat, penggunaan satu primer sahaja

adalah tidak kukuh. Oleh itu, penggunaan sekurang-kurangnya dua primer digalakkan agar dapat mengukuhkan hasil identifikasi spesies.

Sebanyak dua kajian molekular filogenetik telah dijalankan ke atas orkid subtribe Aeridinae dengan objektif untuk mengenalpasti hubungan filogenetik di antara genera orkid yang berada di dalam subtribe tersebut (Hidayat, Yukawa dan Ito; 2005). *Thrixspermum centipeda* dan *T. subulatum* adalah dua spesies orkid *Thrixspermum* yang digunakan di dalam kajian tersebut. Hasil kajian yang dijalankan hanya mewakili kurang dari dua peratus jumlah keseluruhan spesies bagi orkid genus *Thrixspermum* yang boleh ditemui diseluruh dunia. Sebaliknya, kajian filogenetik yang tertumpu kepada genus ini belum pernah dilakukan. Ini kerana, tujuan kajian filogenetik dilakukan adalah bagi menyelesaikan masalah taksonomi dan klasifikasi. Genus ini tidak mengalami masalah dari segi taksonomi namun mengalami masalah klasifikasi pada peringkat seksyen yang mengakibatkan kekeliruan dalam proses identifikasi spesies. Oleh itu, wajar kajian filogenetik dilakukan terhadap genus ini.

Berdasarkan data yang telah direkodkan di *National Centre of Biology Information* (NCBI), terdapat enam spesies *Thrixspermum* sahaja yang tersenarai di dalam pengkalan data tersebut. Rekod molekular data di NCBI jelas menunjukkan bahawa *Thrixspermum* mempunyai kurang dari sepuluh peratus data molekular yang telah dikaji dan status data bagi 96 peratus spesies *Thrixspermum* lain masih tidak diketahui. Kesimpulannya, kajian molekular tidak kiralah barkod DNA dan filogenetik terhadap *Thrixspermum* adalah tidak mencukupi. Maklumat tersebut amat diperlukan sebagai sumber rujukan untuk tujuan identifikasi spesies dan juga bagi kajian sistematik yang mendalam.

1.2 Justifikasi Kajian

Kajian terhadap genus *Thrixspermum* perlu dijalankan kerana genus ini sukar untuk dikenalpasti sehingga peringkat spesies. Ini kerana, bunga *Thrixspermum* berkembang dalam masa yang singkat di antara setengah hari ke satu hari dan hanya dua ke tiga kuntum bunga berkembang dalam satu-satu masa. Oleh yang demikian, banyak koleksi spesimen yang diperolehi sewaktu kerja lapangan adalah tidak lengkap. Seterusnya perkara tersebut mengakibatkan proses identifikasi sukar

dijalankan terhadap genus tersebut. Kaedah identifikasi melalui ciri-ciri morfologi memerlukan pengetahuan taksonomi yang mendalam beserta sumber rujukan yang sahih. Selain itu, spesimen yang diperolehi juga perlu lengkap di mana keseluruhan bahagian organ berjaya disampel. Menurut O'Byrn *et al.* (2015) lagi, ciri morfologi *Thrixspermum* dalam deskripsi asal adalah kurang baik disamping tiada kajian semakan menyeluruh pernah dilakukan ke atas genus. Kini proses identifikasi tidak terhad hanya dengan merujuk kepada morfologi.

Proses identifikasi spesies juga boleh dijalankan melalui kaedah Kodbar DNA, iaitu kaedah identifikasi yang dilakukan berdasarkan maklumat jujukan DNA (Hebert *et al.*, 2003). Kodbar DNA dianggap sebagai satu kaedah identifikasi yang boleh dipercayai. Kaedah ini tidak memerlukan kepakaran dalam bidang molekular. Melalui latihan yang singkat dalam kerja-kerja makmal dengan berpanduan manual daripada pembekal kit Qiagen sebagai contohnya, hasil jujukan DNA bagi sesuatu spesimen boleh diperolehi. Hasil jujukan itu kemudiannya boleh digunakan dalam proses identifikasi dengan merujuk kepada jujukan DNA sedia ada di pengkalan data Kodbar DNA. Oleh itu, satu rekod barkod DNA perlu disediakan terlebih dahulu sebagai sumber rujukan kelak. Melalui kajian ini, diharap satu rekod barkod DNA bersama maklumat ciri spesies berjaya dihasilkan. Ciri morfologi ringkas bagi spesimen yang digunakan dalam kajian ini akan didokumentasikan sebagai rujukan barkod DNA.

Genus ini mengalami masalah klasifikasi pada peringkat seksyen yang mengakibatkan kekeliruan identifikasi pada peringkat spesies terjadi. *Thrixspermum* terbahagi kepada tiga seksyen; *Thrixspermum*, *Dendrocolla* dan *Katocolla*. Pembahagian seksyen ini berdasarkan bentuk jambak bunga dan habitat batang. Pembahagian spesies kepada tiga kumpulan seksyen ini telah lama diperkenalkan oleh Schlechter (1911) dan masih dijadikan sebagai rujukan sehingga kini. Namun O'Byrne (2015) pernah menyatakan bahawa seksyen *Katocolla* tidak seharusnya dikekalkan bagi mengelakkan kekeliruan identifikasi spesies terjadi. Seksyen yang dicadangkan Schlechter ini berdasarkan ciri morfologi, dan tidak pernah disokong oleh sebarang data molekular. Menerusi kajian filogenetik, hasil analisis mungkin dapat menyokong pembahagian spesies mengikut seksyen.

Kajian molekular kini penting seiring dengan kemajuan bidang sains dan teknologi dan data molekular dapat mengukuhkan lagi bidang taksonomi sedia ada. Berdasarkan kajian molekular lepas yang dijalankan oleh Hidayat *et al.* (2005), hanya dua spesies *Thrixspermum* yang digunakan di dalam kajian tersebut dan data molekular di pengkalan data NCBI pula hanya merekodkan enam spesies *Thrixspermum* sahaja. Berdasarkan data molekular yang direkodkan, hanya empat peratus sahaja jumlah spesies yang telah dikaji dan selebihnya masih tidak diketahui. Dengan itu, kajian molekular terhadap genus *Thrixspermum* amat perlu dijalankan bagi menambah maklumat molekular sedia ada bagi genus ini.

1.3 Hipotesis

Barkod DNA akan menjadi satu maklumat tambahan berguna untuk identifikasi peringkat spesies *Thrixspermum* selain daripada merujuk kepada ciri-ciri morfologi. Kekeliruan sistem klasifikasi pada peringkat seksyen (*Thrixspermum*, *Dendrocolla* dan *Katocolla*) akan dapat dijelaskan melalui kaedah filogenetik dengan menggunakan dua gabungan gen dari kawasan nuklear DNA dan kloroplas. Genus sinonim *Cordiglottis fulgens* akan berada berhampiran dengan *Thrixspermum linusii* dalam hasil filogenetik analisis kerana ciri morfologi kedua-dua spesies adalah hampir sama.

1.4 Objektif

Kajian ini dijalankan bagi memudahkan para pengkaji orkid di masa hadapan untuk mengenalpasti spesies orkid dari genus *Thrixspermum* dan mengetahui hubungan filogenetik di antara spesies bagi genus tersebut dengan mencapai tiga objektif seperti berikut:

- a. Untuk menyediakan satu rekod data barkod DNA spesies orkid dari genus *Thrixspermum* yang terdapat di Sabah.
- b. Untuk menjelaskan kekeliruan hubungan di antara seksyen dalam genus *Thrixspermum* dengan menggunakan analisis molekular ITS dan rbcL berdasarkan kawasan nuklear ribosomal DNA dan kawasan kloroplas.
- c. Untuk mendokumentasikan ciri-ciri morfologi bagi spesies *Thrixspermum*

BAB 2

KAJIAN KEPUSTAKAAN

2.1 Genus *Thrixspermum*

2.1.1 Kepelbagaian dan Taburan

Orchidaceae merupakan famili terbesar bagi kumpulan Angiosperma yang turut dikenali sebagai tumbuhan berbunga, dan famili tersebut dikenali umum sebagai orkid. Tumbuhan berbunga ini telah lama berjaya menarik perhatian para pengkaji botani kerana nilai komersial dan estetikanya. Terdapat enam genera orkid yang popular iaitu *Cymbidium*, *Cypripedium*, *Dendrobium*, *Paphiopedillum*, *Vanilla*, dan *Vandae* (Deng, Zhang, Lin, Wang dan Liu, 2015). Orkid mempunyai 870 genera dan lebih 30,000 spesies boleh ditemui diseluruh dunia, dan lebih 100,000 variasi adalah kacukan (Cribb, Kell, Dixon dan Barrett, 2003). *Thrixspermum* merupakan salah satu genus yang boleh ditemui di dalam famili *Orchidaceae*.

Menurut Saidenfaden (1992), jumlah spesies sebenar bagi genus *Thrixspermum* masih tidak diketahui tetapi dipercayai berjumlah di antara 100 ke 150 spesies di seluruh dunia, manakala Wood *et al.* (2011) menyatakan bahawa genus tersebut mempunyai status maklumat yang tidak mencukupi dan hanya 100 spesies sahaja direkodkan setakat ini. Menurut O'Bryne *et al.* (2015), pada tahun 2014, Govearts dan rakan-rakannya telah merekodkan 170 spesies *Thrixspermum* di seluruh dunia. Namun begitu, *The Plant List* hanya merekodkan dan menerima 151 spesies *Thrixspermum* sahaja di dalam pengkalan data mereka. Jumlah spesies bagi genus ini dipercayai kian bertambah setiap tahun kerana penemuan spesies baru yang masih direkodkan.

Taburan spesies bagi genus ini tertumpu pada kawasan Asia Tenggara (Song, Meng, Wing dan Luo, 2009). Menurut Wood dan Crib (1991) dan Wood dan Chen (2009), taburan spesies tersebut bermula dari Sri Lanka dan kawasan timur Himalaya ke kepulauan Pasifik dengan pusat taburan yang tertumpu di Sumatera.

Negara Cina telah merekodkan 13 spesies *Thrixspermum* (Song *et al.*, 2009), manakala negara India telah mengenalpasti 11 spesies (Mao *et al.*, 2010). Thailand pula telah merekodkan 15 spesies termasuk satu spesies endemik di negara tersebut (Comber, 2001).

Semenanjung Malaysia mencatatkan 29 spesies orkid *Thrixspermum* dengan 13 spesies daripadanya adalah endemik, manakala Borneo yang merangkumi Sabah, Sarawak, Brunei dan Kalimantan menyenaraikan 24 spesies *Thrixspermum* (Wood dan Crib, 1991). Jumlah spesies terkini di Borneo bertambah dari jumlah spesies yang terdahulu iaitu sebanyak 31 spesies telah direkodkan (Wood dan Crib, 1991; Wood *et al.*, 2011; Majit *et al.*, 2014). Bagi negeri Sabah pula, terdapat 21 spesies *Thrixspermum* telah direkodkan setakat ini termasuk lima spesies endemik iaitu *T. crescentiforme*, *T. linusii*, *T. ventricosum*, *T. alabense* dan *T. triangulare* (Wood dan Crib, 1991; Wood *et al.*, 2011). Sumatera mempunyai jumlah kepelbagaian *Thrixspermum* tertinggi di seluruh dunia iaitu 38 spesies dimana 21 daripadanya adalah endemik (Comber, 2001).

2.1.2 Senarai Lengkap Spesies *Thrixspermum* di Sabah

Sabah mempunyai 40 spesies dan dua subspesies *Thrixspermum* (Jadual 2.1). Senarai terkini adalah berdasarkan beberapa rujukan yang telah diterbitkan iaitu Majit *et al.* (2014), O'Byrne (2005, 2006), O'Byrne dan Vermeulen (2009), Wood dan Crib (1991), Wood *et al.* (2011) dan Wood dan Lamb (2011). Sebanyak 26 spesies *Thrixspermum* adalah diterima dalam pangkalan data *The Plant List* (<http://www.theplantlist.org>) daripada 47 spesies yang telah diterbitkan di Sabah. Empat-belas spesies dan satu subspesies yang selebihnya baru sahaja diterbitkan pada tahun 2016. *Thrixspermum affine* telah ditukar status spesies kepada subspesies di bawah *T. acuminatissimum* (O'Byrne, 2016). Senarai ini tidak termasuk genus *Cordiglottis*, sinonim kepada *Thrixspermum*.