

## PENILAIAN VARIASI GENETIK PADI TANAH KERING (*Oryza sativa* L.) DI SABAH DENGAN MENGGUNAKAN PENANDA MIKROSATELIT

**NUR FIRDAUS ABD RAHIM**

**DISERTASI INI DIKEMUKAKAN UNTUK MEMENUHI SEBAHAGIAN  
DARIPADA SYARAT MEMPEROLEHI IJAZAH SARJANA MUDA SAINS  
DENGAN KEPUJIAN**

**PROGRAM TEKNOLOGI TUMBUHAN  
SEKOLAH SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH**

FEBRUARI 2005



## UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

## BORANG PENGESAHAN STATUS TESIS@

JUDUL: Penilaian Variasi Genetik pada tanah leling  
(Oryza sativa L.) di Sabah menggunakan penanda mikrosatelit

Ijazah: Sarjana Muda Sains dengan kepujian (teknologi  
+ umwahan)

SESI PENGAJIAN: 2002 - 2005

Saya Nur. Firdaus bt Abd Rahim  
(HURUF BESAR)

mengaku membenarkan tesis (LPS/Sarjana/Doktor Falsafah)\* ini disimpan di Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dengan syarat-syarat kegunaan seperti berikut:

1. Tesis adalah hak milik Universiti Malaysia Sabah.
2. Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dibenarkan membuat salinan untuk tujuan pengajian sahaja.
3. Perpustakaan dibenarkan membuat salinan tesis ini sebagai bahan pertukaran antara institusi pengajian tinggi.
4. \*\*Sila tandakan (/)

SULIT

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

TERHAD

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

TIDAK TERHAD

Disahkan oleh

(TANDATANGAN PENULIS)

(TANDATANGAN PUSTAKAWAN)

Alamat Tetap: J-8401 Tmn  
Kepong Tawau 1, RU 9000  
Awam Kepong, 77000  
Johor, Malaysia.

Prof Madya Dr Mohd

Nama Penyelia  
Abd Latip

Tarikh: 30/3/05

Tarikh: \_\_\_\_\_

CATATAN: \* Potong yang tidak berkenaan.

\*\* Jika tesis ini SULIT atau TERHAD, sila lampirkan surat daripada pihak berkuasa/organisasi  
berkenaan dengan menyatakan sekali sebab dan tempoh tesis ini perlu dikelaskan sebagai SULIT  
dan TERHAD.

@ Tesis dimaksudkan sebagai tesis bagi ijazah Doktor Falsafah dan Sarjana secara penyelidikan, atau  
disertasi bagi pengajian secara kerja kursus dan penyelidikan, atau Laporan Projek Sarjana Muda  
(LPSM).



**PENGAKUAN**

Saya akui karya ini adalah hasil kerja saya sendiri kecuali nukilan dan ringkasan yang setiap satunya dijelaskan sumbernya.

21 Februari 2005



---

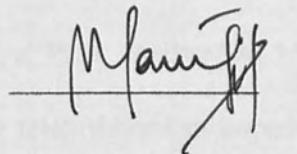
NUR FIRDAUS ABD RAHIM  
HS2002-4126

**DIPERAKUKAN OLEH**

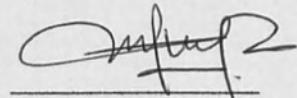
Tandatangan

**1. PENYELIA**

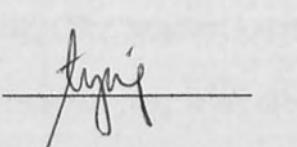
(Prof. Madya Dr. Hajah Mariam Abd Latip)

**2. PEMERIKSA 1**

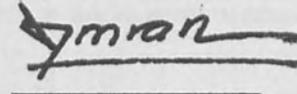
(Dr. Vijay Kumar)

**3. PEMERIKSA 2**

(Cik Chee Fong Tyng)

**4. DEKAN**

(Prof. Madya Dr. Amran Ahmad)



## PENGHARGAAN

Bersyukur ke hadrat illahi kerana dengan rahmatNya penulisan disertasi ini berjaya disiapkan. Ingin saya mengambil kesempatan yang terluang ini untuk menyampaikan ucapan terima kasih kepada Penyelia saya, Prof. Madya Dr. Mariam Abd Latip di atas segala tunjuk ajar dan bimbingan yang telah diberikan kepada saya sepanjang tempoh kajian ini dijalankan.

Tidak lupa juga kepada kakitangan Makmal Genetik, Cik Christina, kakitangan makmal Penyelidikan Bioteknologi, Cik Rokiah , di atas bantuan yang telah diberikan sepanjang tempoh saya menjalankan kajian ini. Kerjasama anda semua amat saya hargai.

Ucapan terima kasih yang tidak terhingga juga kepada para pelajar Pascasiswazah Sekolah Sains dan Teknologi , Cik Helena dan pelajar pascasiswazah Institut Penyelidikan Bioteknologi, En Awang Mohammad Sagaf Abu Bakar yang banyak memberikan nasihat dan panduan kepada saya untuk menyiapkan projek ini.

Akhir kata, terima kasih juga diucapkan kepada keluarga saya yang tercinta serta semua rakan yang terlibat secara langsung atau tidak langsung dalam memberikan sokongan kepada saya bagi menyiapkan projek tahun akhir ini.

## ABSTRAK

Variasi genetik dan hubungan di antara sampel padi tanah kering yang dikumpulkan dari Tuaran, Ranau, Tamparuli, Beluran, Lahad Datu dan Keningau telah dianalisa dengan menggunakan enam pasangan primer mikrosatelite. Sebanyak enam lokus dalam sampel adalah polimorfik. Bilangan alel yang ditemui ialah sebanyak 17 alel. Min bilangan alel yang dicerap dan min bilangan alel efektif masing-masing adalah 2.833 dan 1.994. Di samping itu, min heterozigositi dicerap dan dijangka mempunyai perbezaan yang besar iaitu 0.476. Frekuensi alel tertinggi adalah 0.8 dijumpai pada lokus RM312 dan frekuensi alel yang terendah iaitu 0.1 dijumpai pada lokus RM124, RM154 dan RM321. Dendogram yang dibina menunjukkan terdapat satu kumpulan. Ujikaji ini menunjukkan bahawa penanda mikrosatelite adalah berkesan dalam menentukan variasi genetik padi tanah kering ini.

## ABSTRACT

The genetic variation and relationship among Sabah upland rice samples collected from Tuaran, Ranau, Tamparuli, Beluran, Lahad Datu and Keningau were analyzed using six primer pairs of microsatellite. All six loci examined in all plants were polymorphic. Seventeen alleles was found. The mean number of alleles observed were 2.833 and mean number alleles effective were 1.994. Beside that, the mean observed and expected heterozygosities showed big differences of 0.476. The highest allele frequencies were 0.8 was found in locus RM312 and the lowest alleles frequencies were 0.1, was found in locus RM124, RM154 and RM321. The dendrogram constructed from genetic distance of all samples showed one group. This test showed that SSR markers were effective in detected genetic variation among upland rice.

## **KANDUNGAN**

	Halaman
PENGAKUAN	ii
PENGESAHAN	iii
PENGHARGAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
SENARAI KANDUNGAN	vii
SENARAI JADUAL	x
SENARAI RAJAH	xi
SENARAI SINGKATAN	xii
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b>	<b>1</b>
1.1 Pengenalan	1
1.2 Objektif	2
<b>BAB 2 ULASAN PERPUSTAKAAN</b>	<b>3</b>
2.1 <i>Oryza sativa</i> L.	3
2.2 Variasi genetik	4
2.2.1 Kepentingan variasi genetik	4
2.2.2 Pengukuran variasi genetik	5
2.2.3 Penanda genetik molekular	6
i. AFLP	6
ii. RFLP	7
iii. RAPD	7

iv. Mikrosatelite/ SSR	8
2.3 Kepelbagaian genetik <i>Oryza sativa</i> , L	9
2.3.1 Frekuensi alel, polimorfisma dan heterozigositi	10
<b>BAB 3 BAHAN DAN KAEADAH</b>	12
3.1 Bahan sampel kajian	12
3.2 Metodologi kajian	12
3.2.1 Penyediaan sampel padi	16
3.2.2 Kaedah pengekstrakkan DNA	17
3.2.3 Penentuan kualiti DNA menggunakan 0.8% gel agaros	17
3.2.4 Mikrosatelite dan amplifikasi tindakbalas rantai polimerase	18
3.2.5 Elektroforesis 3% gel Agaros MetaPhor	21
3.2.6 Penskoran jalur	21
3.2.7 Analisis data	22
i. Ujian persamaan Hardy –Wienberg	22
ii. Heterozigositi	23
iii. Jarak genetik	25
<b>BAB 4 KEPUTUSAN</b>	26
4.1 Pengekstrakan DNA	26
4.2 Tindakbalas Rantai Polimerase	27
4.3 Penskoran melalui berat molekul	27
4.4 Analisa data	29
4.4.1 Bilangan alel	29



4.4.2 Frekuensi alel	30
4.4.3 Persamaan Hardy –Wienberg	31
4.4.4 Indeks pemasangan	32
4.4.5 Darjah heterozigositi	33
4.4.6 Jarak genetik dan identiti sampel	34
 <b>BAB 5 PERBINCANGAN</b>	 38
5.1 Pengekstrakan DNA	38
5.2 Elektroforesis 0.8% agaros	39
5.3 Tindakbalas PCR	40
5.4 Penskoran jalur	41
5.5 Kepelbagaian genetik padi tanah kering	41
 <b>BAB 6 KESIMPULAN</b>	 45
<b>RUJUKAN</b>	46
<b>LAMPIRAN</b>	51



## **SENARAI JADUAL**

No. Jadual	Halaman
3.1 Koleksi padi tanah kering dan lokasinya di Sabah.	13
3.2 Primer mikrosatelite padi.	20
4.1 Rumusan statistik bilangan alel bagi semua lokus mikrosatelite kajian.	29
4.2 Frekuensi alel yang dapat dicerap pada ke enam-enam primer mikrosatelite padi.	30
4.4 Analisis keputusan persamaan Hardy-Wienberg .	31
4.5 Indeks pemasangan bagi alel-alel pada setiap lokus.	32
4.6 Ringkasan statistik nilai darjah heterozogositi dan homozigositi	33
4.7 Jarak genetik dan identiti genetik.	35

## **SENARAI RAJAH**

No.Rajah	Halaman
3.1 Lokasi-lokasi sampel biji benih padi kajian diperolehi iaitu Tuaran, Tamparuli, Ranau, Beluran, Keningau dan Lahad Datu.	14
3.2 Carta aliran metodologi kajian.	15
4.1 Profil kualiti genomik DNA yang terhasil setelah diuji menggunakan 0.8% gel agaros.	26
4.2 Profil mikrosatelite bagi lokus 321 bagi kesemua sampel padi kajian setelah dielektroforesiskan menggunakan 3% agaros Metaphor	28
4.3 Dendogram berdasarkan jarak genetik 20 sampel padi tanah kering di Sabah.	36



## SENARAI SINGKATAN

AFLP	(Amplified Fragment Length Polymorphism)
AP- PCR	(Arbitrarily Primer PCR).
dH <sub>2</sub> O	Air suling
DAF	(DNA Amplification fingerprinting)
DNA	Asid deoksiribosa (deoxyribonucleic acid)
dNTP	Deoksiribonukleosid trifosfat
EtBr	Ethidium bromida
EtOH	Etanol
g	Gram
H <sub>e</sub>	Heterozigositi jangkaan
H <sub>o</sub>	Heterozigositi cerapan
HWE	Persamaan Hardy-Wienberg
kb	Kilo pasangan bes (kilo base pair)
mg	Miligram
ml	Mililiter
PAGE	(Polyacrylamide gel electrophoresis)
PCR	Tindakbalas rantai polimerase (polymerase chain reaction)
QTLs	(Quantification Trait loci)
RAPD	(Random Amplified Polymorphism)
RFLP	(Restriction Fragment Length Polymorphism)
RM	Mikrosatelit padi (Rice microsatellite)
SSR	(Simple Sequence Repeats)
SSLP	(Simple Sequence Length Polymorphism)

TAE	Tris-Asetat-EDTA
TBE	Tris-Borik-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEN	Tris-EDTA- NaCl
UV	Sinar ultra ungu
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{g}$	Mikrogram
%	Peratus
$\chi^2$	khi kuasa dua

## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Pengenalan

Padi tanah kering *Oryza sativa*, L adalah merupakan tanaman tradisional di negeri Sabah. Padi jenis ini kurang popular dan jarang mendapat perhatian di kalangan petani tempatan berbanding padi sawah memandangkan produktiviti padi tanah kering yang kurang memuaskan. Walau bagaimanapun, tanaman ini adalah salah satu tanaman yang berpotensi tinggi di Sabah kerana keadaan cuaca dan geografi yang membolehkan padi tanah kering ini beradaptasi dengan baik. Untuk memperbaiki mutu padi tanah kering ini, kajian tentang variasi genetik perlu dijalankan.

Pada masa ini, penggunaan penanda genetik molekul menjadi pilihan utama dalam penyelidikan penentuan dan identifikasi genotip tumbuhan berbanding dengan teknik lain. Jenis penanda molekul yang biasa digunakan termasuklah ‘Restriction Fragment Length Polymorphism’ (RFLP), ‘Amplified Fragment Length Polymorphism’ (AFLP), Random Amplified Polymorphism DNA’s (RAPD) dan mikrosatelit. Mikrosatelit atau juga dikenali sebagai ‘Simple Sequence Repeats’ (SSR) atau ‘Simple Sequence Length Polymorphism’ (SSLP) adalah lebih popular digunakan sebagai penanda dalam bidang pembiakbakaan dan kajian genetik diversiti tumbuhan (Lu *et al.*,

1996). Ini adalah kerana mikrosatelit mempunyai kelebihan seperti bilangannya yang banyak, ‘hypervariability’ (kewujudan dalam bentuk alel yang berlainan), bersifat kodominan, senang diaplikasikan dan bebas dari pengaruh persekitaran. Mikrosatelit berpunca dari variasi turutan bes –bes segmen Asid dioksiribonukleik (DNA) yang bersaiz pendek (1-6 pasangan bes ) pada lokus tertentu (Brown, 1996).

Mikrosatelit sesuai digunakan sebagai penanda dalam mengesan kepelbagaiannya genetik dalam satu populasi organisma. Ini disebabkan oleh perbezaan dalam kepanjangan turutan bes pada lokus SSR ini boleh dikesan dengan melakukan amplifikasi sampel melalui proses tindakbalas rantai polimerase. Produk PCR dinilai dengan menggunakan gel elektoforesis untuk menentukan perbezaan alel yang wujud pada sampel-sampel DNA yang dikaji.

## **1.2 Objektif kajian**

Tujuan penyelidikan ini adalah untuk:

- i. menentukan tahap polimorfisme dan variasi genetik di antara 20 sampel padi tanah kering yang ditanam di Sabah
- ii. mengkaji hubungan genetik sampel padi kajian melalui dendogram yang dibina daripada bacaan jarak genetik.

## BAB 2

### ULASAN PERPUSTAKAAN

#### 2.1 *Oryza sativa L.*

Padi (*Oryza sativa L.*) adalah merupakan tanaman makanan yang penting di dunia. Kira-kira dua pertiga penduduk dunia makan nasi setiap hari. Asia adalah pusat pengeluaran padi yang terbesar di dunia (Pruitt, 2002). Padi bukit yang ditanam di Asia merangkumi 11.6 million hektar atau 53% dari keluasan kawasan penanaman (Tran, 1986). Tumbuhan ini tergolong dalam famili *Gramineae*, sub famili *Oryzoideae*, kumpulan *Oryzae* dan genus *Oryza* (Martin *et al.*, 1976). *Oryza sativa L.* dibahagikan kepada tiga subspesies iaitu *japonica*, *indica* dan *javanica*. Selain mengikut cara penanaman, ia boleh dibahagikan kepada dua jenis iaitu padi sawah dan padi tanah kering. Padi sawah adalah padi yang ditanam dalam keadaan yang berair. Padi tanah kering pula didifinaskan sebagai padi yang di tanam dalam keadaan kering dan hanya bergantung pada air hujan untuk menyeimbangkan kelembapannya, ia tidak memerlukan takungan atau pengumpulan air di atas tanah dan tidak memerlukan pembajakkan (De Datta, 1975).

Di Malaysia, padi jenis ini banyak ditanam di Sabah kerana ia adalah tanaman tradisional bagi penduduk negeri Sabah. Keadaan muka bumi Sabah sesuai untuk penanamannya. Namun begitu, padi ini tidak dikomersialkan kerana kurang memberikan hasil dan selalu diserang penyakit. Kajian genetik dan kemajuan genetik juga masih kurang dijalankan ke atas padi bukit ini.

## 2.2 Variasi genetik

Variasi genetik ialah kepelbagaiian maklumat genetik sesuatu individu di dalam spesies yang sama iaitu diversiti intraspesifik ataupun antara spesies iaitu diversiti interspesifik (Klug dan Cumming, 2002). Variasi genetik berlaku disebabkan oleh perubahan terhadap kandungan gen dalam satu alel yang disebabkan oleh mutasi, rekombinasi dan migrasi. Variasi genetik tidak terhad kepada manusia atau haiwan sahaja ia juga merangkumi tumbuh-tumbuhan. Variasi genetik telah ditentukan kepada lebih 1,400 flora dan telah dapat menentukan zon berdiversiti tinggi (Virchow, 1999) manakala kajian variasi genetik pada padi juga telah dijalankan.

### 2.2.1 Kepentingan variasi genetik

Variasi genetik penting dalam bidang pemuliharaan genetik dan pembibakkanaan. Bagi pemuliharaan genetik ia diperlukan bagi perkembangan sesuatu populasi untuk beradaptasi dengan perubahan persekitaran. Perubahan ini termasuklah perubahan cuaca, pencemaran, pengenalan terhadap pesaing-pesaing nobel, peningkatan jumlah penyakit, racun perosak dan parasit. Populasi yang mempunyai variasi genetik yang tinggi mempunyai kebarangkalian yang tinggi untuk tidak pupus manakala sebaliknya

bagi populasi yang kurang variasi genetik (Frankham dan Ballou, 2002). Salah satu contoh tumbuhan yang beradaptasi terhadap perubahan persekitaran pencemaran logam berat ialah *Agrositis tenuis* dan ‘bunch grass’ (Frankham *et al.*, 2002). Dalam pembiakbakaan, maklumat genetik yang pelbagai dapat menentukan hubungan antara populasi. Ia bertujuan untuk memperbaiki baka sesuatu individu dengan penghasilan baka baru. Contohnya penghasilan baka baru bagi padi dan tumbuhan lain seperti gandum, jagung dan kacang soya.

### 2.2.2 Pengukuran variasi genetik

Variasi genetik dinilai dengan berdasarkan ciri kuantitatif seperti perbezaan fenotip antara spesies, seperti perbezaan warna biji benih, ketinggian dan warna bunga. Selain ia juga dinilai dari segi genotip, dimana perubahan alel diambil kira. Kini, penilaian variasi genetik boleh dilakukan secara molekul. Cara molekul ini termasuklah melalui teknik pemisahan protein menggunakan elektroforesis dan berdasarkan profil DNA atau asid nukleik (Frankham dan Ballou, 2002).

Teknik profil DNA ini melibatkan penggunaan penanda molekul asid nukleik yang melibatkan jujukan DNA dan analisis fragmen terhad. Perkembangan dalam penggunaan ini telah meningkat dengan adanya teknik PCR (Westman dan Kresovich, 1997) Beberapa faktor dalam pemilihan penanda genetik iaitu, apa yang ingin di ukur, bagaimana keputusan boleh diperolehi, sumber mencukupi termasuk teknikal, peralatan, masa, kemahiran, keperluan automasi dan kos yang berkesan.

Penanda genetik yang baik mestilah berupaya menentukan variasi genetik seperti kebolehwarisan dan perbezaan antara individu atau populasi, senang untuk diukur dan memberikan keputusan yang boleh dibandingkan dengan kajian yang lain. Beberapa jenis penanda molekul adalah seperti ‘Amplified Fragment Length Polymorphism’ (AFLP), ‘Restriction Fragment Length Polymorphism’ (RFLP), ‘Random Amplified Polymorphism’ (RAPD) dan ‘Simple Sequence Repeats’ (SSR).

### **2.2.3 Penanda genetik molekul**

#### **i. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)**

‘Amplified Fragment Length Polymorphism’ (AFLP) adalah penanda genetik yang melibatkan pemanjangan PCR berasaskan polimorfisma. Ia murah dan senang diamplifikasi (Kearsy, 1997). AFLP berupaya menentukan variasi genetik pada amaun yang tersangat kecil dalam populasi genetik. Ia sangat berguna bagi penyelidikan spesies yang terancam. AFLP boleh dijana dengan memotong fragmen DNA menggunakan dua enzim pembatas kemudian bebenang pendek tunggal dimasukkan kepada hujung fragmen yang telah dipotong. Penanda ini menghasilkan corak cap jari yang berlainan bagi setiap individu. Ia sesuai untuk menilai variasi genetik terutamanya dalam bidang pemuliharaan genetik (Klug dan Cumming, 2003)

## **ii. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)**

‘Restriction Fragment Length Polymorphism’ (RFLP) adalah penanda genetik yang digunakan secara meluas di dalam penyelidikan kejuruteraan genetik. Di antara kebaikan RFLP adalah potensinya yang tidak terhad kepada jumlah fragmen yang besar . Ia juga dapat menentukan genotip sebenar. RFLP juga dapat menentukan genotip walaupun pada lokus tunggal. RFLP lokus boleh ditentukan pada mana-mana sahaja tahap perkembangan dan di mana-mana bahagian tumbuhan. Empat aplikasi pananda RFLP dalam pembiakbakaan tumbuhan iaitu; (1) individu RFLPs digunakan untuk menandakan gen tunggal; (2) kebanyakkan RFLP tersebar melalui genom dan boleh digunakan untuk menentukan ciri individu atau populasi; (3) boleh digunakan untuk menganalisis trait kuantitatif ; dan (4) ia juga boleh digunakan untuk memilih trait lokus kuantitatif berdasarkan penyatuan QTLs dan penanda RFLP (Figdore, 1988)

## **iii. Random Amplified Polymorphism DNAs (RAPD)**

‘Random Amplified Polymorphism DNAs’ (RAPD) adalah penanda yang ringkas . DNA yang digunakan amat sedikit dan memerlukan aturan dan amplifikasi. Penanda ini tidak melibatkan penggunaan bahan radioaktif, ia murah, dan dominan. Ia berupaya untuk membezakan heterozigot dan homozigot dalam semua jumlah produk (Kearsy, 1997).

Modifikasi terhadap penanda ini telah dilakukan dimana terdapat dua hasil modifikasi iaitu ‘DNA Amplification fingerprinting’ (DAF) dan ‘Arbitrarily Primer

PCR' (AP-PCR). DAF menggunakan primer rawak pendek iaitu 5-8bp dan menunjukkan bilangan produk amplifikasi yang besar menggunakan elektroforesis gel poliakrilimida (PAGE). AP-PCR pula menggunakan primer yang panjang dan juga PAGE.

#### iv. Mikrosatelit (SSR)

Pananda mikrosatelit ataupun SSR ialah satu jujukan DNA yang ditemui pada awal 1980 (Ashworth *et al.*, 2004). Unit ulangan mikrosatelit adalah 1-5 bp panjang. Ia berpotensi untuk menjadi penanda genetik yang baik kerana mempunyai tahap kebolehubahan yang tinggi, kodominan, mempunyai tahap penghasilan yang baik dan mempunyai kesatuan dengan kawasan ‘non coding’ di dalam genom (Temnich *et al.*, 2000). Selain itu ia juga adalah penanda yang menunjukkan tahap polimorfismnya yang tinggi disebabkan kekerapan mutasi yang berlaku. Ciri mikrosatelit ini menjadikannya ideal untuk pemetaan genom bagi kajian populasi genetik dan kajian diversiti.

*Arabidopsis thaliana* merupakan model tumbuhan yang pertama menggunakan SSR untuk menentukan variasi genetiknya. Mikrosatelit wujud dalam kuantiti yang banyak dan tertabur secara seragam dalam genom organisma (Brown, 1996). Kini terdapat 57.8 mb jujukan DNA padi dikaji untuk menentukan frekuensi dan taburan genom SSR dan sebanyak 200 penanda SSR telah dihasilkan dan disinambungkan dengan peta padi (Mahalaksmi *et al.*, 2002). Selain SSR, terdapat penanda yang sama fungsi dengannya iaitu ‘Inter Simple Sequence Repeats’ (ISSR) dan Chloroplast

microsatellite (cpSSR), tetapi ia selalunya terdiri dari 1 bp contohnya (T)n (Robinson dan Harris, 1999).

Protokol mikrosatelite ini mudah. Bermula dengan rekaan primer diikuti dengan program PCR yang bergantung kepada cara satu-satu primer itu dikesan samada secara ‘flourescent’ atau radioaktif. Setelah itu produk PCR dipisahkan dengan menggunakan PAGE dan dikesan dibawah cahaya ultra ungu atau filem x-ray (Robinson dan Harris, 1999). Kelebihan mikrosatelite yang kodominan meningkatkan keberkesanan dan ketepatan pengukuran populasi genetik berbanding dengan pananda lain seperti AFLP dan RAPDs (Robinson dan Harris, 1999).

### **2.3 Kepelbagaian genetik *Oryza sativa* L.**

Kajian tentang kepelbagaian genetik merupakan satu bidang kajian yang mengkaji tentang kepelbagaian sesuatu organisma itu. Dalam genetik, kajian seperti ini digolongkan dalam satu bahagian iaitu populasi genetik. Populasi genetik membawa maksud kajian yang dilakukan terhadap takungan gen dalam satu populasi.

Beberapa contoh kajian tentang diversiti genetik ialah pada tumbuhan spesis *Gramineae* termasuklah padi, jagung dan barli (Kantetey *et al.*, 2002) Kajian kepelbagaian terhadap genus *Oryza sativa* ini juga membantu dalam menjawab persoalan yang berhubung dengan domestikasi, spesifikasi, poliploid dan adaptasi ekologi yang tidak terjawab dengan mengkaji padi secara am sahaja (Vaugan *et al.*, 2003). Selain itu, kajian juga dijalankan untuk pemuliharaan terhadap spesis padi liar yang terancam seperti kajian yang dilakukan di Yunnan, China (Cheng *et al.*, 2004)

Penggunaan mikrosatelit dalam kajian diversiti genetik padi juga semakin meluas. Bukan sahaja padi di Malaysia, malah di beberapa negara yang mempunyai padi seperti di Filipina (Sebastian *et al.*, 1998) dan China (Zhou *et al.*, 2003) Lebih daripada 500 set penanda mikrosatelit padi yang telah dihasilkan (McCouch *et al.*, 2001). Kemajuan terhadap kajian ini memungkinkan peningkatan kualiti yang baik terhadap penghasilan tanaman padi.

### **2.3.1 Frekuensi alel , polimorfisma dan heterozigositi.**

Secara amnya, teori genetik populasi adalah bersamaan dengan teori frekuensi alel. Frekuensi alel adalah kebarangkalian alel tertentu yang wujud secara rawak di dalam sesebuah populasi (Frankham *et al.*, 2002). Ia juga berperanan sebagai salah satu parameter yang penting dalam kajian evolusi, ini adalah disebabkan oleh perubahan takungan gen dalam satu populasi dan dipengaruhi oleh perubahan frekuensi gen.

Polimorfisma ialah ketidaksinambungan variasi genetik yang hadir pada bentuk yang berbeza atau jenis di antara ahli yang terdapat pada lokus tunggal. Polimorfisma genetik berlaku apabila bacaan frekuensi tertinggi bagi alel tersebut adalah lebih daripada 0.01 (Snustad dan Simmons, 1999). Ia juga sama ertinya dengan satu alel yang paling umum pada gen tersebut mempunyai bacaan frekuensi yang kurang daripada 0.95 (Klug dan Cumming, 2003)

Heterozigositi adalah petunjuk paling umum yang diaplikasikan dalam pengukuran variasi genetik dalam sesebuah takungan gen, di mana individu dalam populasi tersebut adalah diploid yang bersifat homozigous dan heterozigous pada satu

## RUJUKAN

- Ashworth, V.E.T.M., Kobayashib, A.M.C., De la crusa, M. dan Clegga, M.T., 2004. Microsatellite marker in Avokado (*Persea Americana Mill*): development of dinucleotide and trinucleotide markers. *Scientia Horticulture* **101** (2), 255-267
- Avise, J.C., 1993. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*, Chapman & Hall, New York.
- Branchard, M., Leon, K. dan Leroy, X.J., 2000. Plant genomic instability detected by microsatellite primers. *Electronic Journal of Biotechnology* **3** (2)
- Brown, S.M., 1996. Development and application of Simple Sequence Repeat (SSR) loci for plant genome analysis. *Method of Genome Analysis in Plant*. 147-162
- De Datta, S.K., 1975. The climates of upland rice. *Major research in Upland Rice*. IRRI, Los Banos, Philippines.
- Figdore, S.S., 1998. Application of RFLPs to problems in plant breeding. Dlm: Zakri, A.H. (pnyt.) *Plant Breeding and Genetic Engineering*. SABRAO, Malaysia.
- Frankham, R. dan Ballou, J.D., 2002. *Introduction to Conservation Genetic*. Cambridge University Press, Australia. 45-94
- Hedrick, P.W., 1999. *Genetic of Population*. Jones and Barlett Publisher, London

Hillis, D.M. dan Moritz (pnyt) (1990) Molecular systematic. Sinauer Associates, Sunderland, MA, 588

Jensen, A.H., 1998. PCR troubleshooting, help, suggestion and advice, National Veterinary Institute, Oslo, Norway

Kantety, R.V., Rota, M.L., Matthew, D.E dan Sorells, M.E., 2002. Data mining of simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat. *Plant Molecular Biology* **48** 501-510

Karcher, S.J., 1995. Molecular Biology : A project Approach. Academic press, Inc.London.

Kearsy, M.J., 1997. Genetic resource and plant breeding Dlm: Callow, J.A., Ford-Lloyd, B.V., dan Newbury, H.J (pnyt) *Biotechnology and Plant genetic Resource*. CAB International, UK, 201-202.

Klug, W.S. dan Cumming, M.R., 2003. *Concept of genetic*. Prentice Hall, New Jersey. 633-693

Lodhi, M.A., Ye, G.N., Weeden, N.F. dan Reisch, B.I., 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars *vitis* species and ampelopsis. *Plant Molecular Biology Report* **12** (1): 6-13

- Lu, J., knox, M.R., Ambrose, M.J., brown, J.K.M. dan Ellis, T.H.N., 1996. comparative analysis of genetic diversity in pea assessed by RFLP and PCR based method. *Theory Application Genetic* **93**
- Mahalakshmi , V., Ortiz, R., Ramadevi, S. dan Aparna, P., 2002. Genomic sequence derived simple sequence repeas markers. A case study with *Medicago spp.* *Electronic Journal of Biotechnology* **5** (3)
- McCouch, S.R., Chen, X., Panaud, O., Temenykh, S., Xu, Y., Cho, Y.G., Huang, N., Ishii T., dan Blair, M., 1997. Microsatellite marker development, mapping and application of SSLP's in rice genetics and plant breeding. *Plant Molecular Biology*, **35** (1-2): 89-99
- McCouch, S.R., Teytelman, L., Xu, Y., Lobos, K.B., Clare, K., Walton, M., Fu, B., Maghirang, R., Li, Z., Xing, Y., Zhang, Q., Kono, I., Yano., M, Fjellstrom, R., Clerk, G.D., Schneider, D., Cartinhour, S., Ware, D., dan Stein, L.,2002. Development and mapping of 2240 new SSR marker for rice. ( )
- Martin, H.J., Leonard, H.W dan Stamp, L.D., 1976. Principle of field Crops production. 3th edition. Macmilan Publishing Co. Inc., New york.
- Nei, M., 1978. Estimation of average heterozigosity and genetic distance from the small number of individual. *Genetic* **89**, 583-590.

Ni, J., Colowit, P.M. dan Mackill, D.J., 2002. Evaluation of genetic diversity in Rice Subspecies using Microsatelite Marker. *Crop Science* **42**: 601-607

Paris, M. dan Jones M.G.K., 2002. Microsatellite genotyping by primer extension and Maldi-ToF Mass spectrometry. *Plant Molecular Biology* **20**, 259-263

Pruitt, A., 2000. The biology of rice. <http://www.planetrice.net>

Robinson, J.P dan Harris, S.A.1999, Amplified Fragment length polymorphism and microsatellite; a phenetic perspective (<http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/y/>)

Sebastian, L.S., Hipolito, L., Garcia, J.S., Tabano, D.A., Maramara, G.V dan Caldo, R.A., 1998a, Microsatellite Marker Analysis of the allele of Philipin Bred Mordern Rice, *Crop Science Society of Philipines* **23** (1), 21-27

Sebastian, L.S., Hipolito, L., Garcia, J.S., Tabano dan D.A., Maramara, 1998b, Application of Molecular Markers in identification and Establishment of Origin of Selected Philipine Rice Cultivar, *Crop Science Society of Philipines* **23** (1), 28-34

Singh, S., Vijay Kumar, C.H.M., Xu, W., Basali, P.G., Sarkarung, S., Singh, R.K., Singh, O.N., Singh, V.P. dan Li, Z., 2002 . Microsatellite assay of Rainfed Lowland Genotypes. *Rice Genetic Newsletter* **19**,15-18

Snustad, P.D. dan Simmons, M.J., 1999. *Principles of genetic*. Ed ke-2. John Wiley & Sons, Inc, New york .

Van Dat, T., 1986. An overview of Upland rice in the world . Dlm: *IRRI, Progress Upland Research* . IRRI, Philippines.

Temnykh, S., Park, W.D., Ayres, N., Cartinhour, S., Hauck, N., Lipovich., Cho, Y.G., Ishii, T. dan McCouch, S.R., 2000. Mapping and genome organization of microsatellite sequence in rice (*Oryza sativa* L.)

Virchow, D., 1999. *Conservation of Genetic Resource*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York.

Westman, A.L dan Kresovich, S., 1997. Use of molecular marker tecniqe for description of Plant genetic variation. Dlm: Callow, J.A., Ford-Lloyd, B.V., dan Newbury, H.J (pnyt) *Biotechnology and Plant genetic Resource*. CAB International, UK, 9-40.

Yeh, F.C., Yang, R.C., Boyle, T., B.J. dan Mao, J., 1997. POPGENE ,*the user friendly shareware for population genetic analysis*. Agric-food and forestry molecular centre, University of Alberta, Canada.

Zhou, H.F., Xie, Z.W., dan Ge, S., 2003. Microsatellite Analysis of Genetic Diversity and Population Structure of a Wild *Oryza rufipogon* Griff in China. *Theory Applied Genetic* **107**:332-339