

**PENENTUAN DIVERSITI GENETIK PADI TANAH KERING SABAH  
DENGAN MENGGUNAKAN PENANDA MIKROSATELIT**

**LEE WEI PENG**

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

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

**Mac 2004**



**UMS**  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

## BORANG PENGESAHAN STATUS TESIS@

JUDUL: Peneritian Diversiti Genetik pada Tanah Reing Sabah dengan menggunakan penanda mikrosatelit

Ijazah: Sarjana Muda Sains dengan Kepujian

SESI PENGAJIAN: 2001 /2002

Saya LEE WEI PENG

(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 sabaja.
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: 74, Jln Sg Fajar  
Indah 8A. TMN Sg Fajar  
Indah 42100 Klang. Selangor. W.E.

Nama Penyelia

Tarikh: 15/03/04

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.

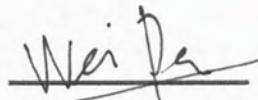
@ Tesis dimaksudkan sebagai tesis bagi Ijazah Doktor Falsafah dan Sarjana secara penyelidikan, atau disertasi bagi pengajian secara kerja kursus dan penyelidikan, atau Laporan Projek Sarjana Muda (LPSM).



## PENGAKUAN

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

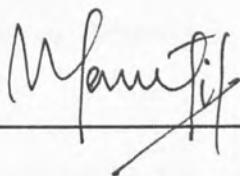
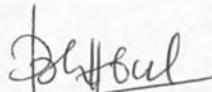
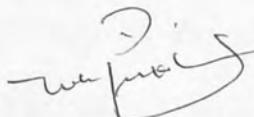
09 Mac 2004

  
LEE WEIPENG

HS2001-1312



**UMS**  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

**DIPERAKUKAN OLEH****TANDATANGAN****1.PENYELIA****(PROF. MADYA DR. MARIAM ABD. LATIP)****2.KO-PENYELIA****(DR. VIJAY KUMAR)****3.PEMERIKSA 1****(DR. ROZIAH KAMBUL)****4.PEMERIKSA 2****(CIK TEOH PEIK LIN)****5.DEKAN****(PROF. MADYA DR. AMRAN AHMED)**

## PENGHARGAAN

Saya ingin mengambil kesempatan ini untuk merakamkan penghargaan kepada Prof. Madya Dr. Mariam Abd. Latip selaku penyelia dalam kajian ini yang telah banyak memberikan tunjuk ajar, nasihat dan sokongan moral untuk menyiapkan disertasi ini.

Ucapan terima kasih yang tidak terhingga juga dirakamkan kepada Dr. Vijay Kumar, selaku ko-penyelia projek saya yang telah banyak menyumbang jasa dalam projek tahun akhir ini. Segala tunjuk ajar, nasihat, cadangan dan sokongan moral yang Dr. berikan saya amatlah dihargai.

Ucapan ini juga saya tujukan khas kepada pelajar pascasiswazah, Sekolah Sains dan Teknologi (Foo, Kak Helena dan Jagdish). Tidak dilupakan juga, diucapkan penghargaan istimewa kepada pelajar pascasiswazah, Institut Penyelidikan Bioteknologi: Awang dan Adrian Victor, yang telah banyak menyumbangkan jasa dan panduan kepada saya sewaktu menyiapkan projek ini.

Penghargaan ini juga diucapkan kepada semua kakitangan Institut Penyelidikan Bioteknologi dan Sekolah Sains dan Teknologi amnya, yang terlibat dalam menjayakan projek ini sama ada secara langsung ataupun tidak. Juga kepada pembantu makmal, SST: Christina, Kak Fatimah, Kak Doreen dan Kak Radizah.

Terima kasih yang tidak terhingga turut diucapkan kepada Chee Keat, Phei Chee, Pooi Lye, Kian Yong, Wee Theng dan semua rakan di Makmal Penyelidikan Bioteknologi yang telah banyak menyumbangkan idea dan sokongan moral kepada saya.

Dan yang akhir sekali kepada ibubapa dan keluarga yang dikasihi atas sokongan moral, nasihat dan semangat yang diberikan kepada saya.

## ABSTRAK

Kajian variasi dan hubungan di antara 20 sampel padi tanah kering Sabah yang dikumpulkan daripada beberapa lokasi geografi yang berlainan dianalisiskan dengan menggunakan lapan pasang primer mikrosatelite. Pasangan primer RM316 telah mengamplifikasi dua lokus yang berbeza dengan konsisten maka ia diskorkan sebagai dua lokus yang berlainan. Kesemua sembilan lokus yang diuji ke atas semua sampel padi adalah bersifat polimorfik. Sejumlah 38 alel telah berjaya dikenalpastikan dalam semua lokus dikaji. Jumlah alel per lokus yang diperolehi berjulat daripada dua hingga sembilan. Bacaan purata bilangan alel yang diperolehi dan alel jangkaan, masing-masing merupakan 4.2 dan 2.9. Tambahan juga, min heterozigositi cerapan dan jangkaan, masing-masing bernilai 0.4000 dan 0.5352. Daripada jumlah sembilan ujian ‘Chi-square’ yang telah dilakukan, didapati hanya satu yang lokus yang berada dalam persamaan Hardy Weinberg pada kebarangkalian,  $P = 0.05$ . Nilai frekuensi tertinggi dan terendah adalah 0.9500 pada lokus RM296 dan 0.0250 yang terdapat di lokus RM336. Dendrogram yang dibina berdasarkan nilai jarak genetik menunjukkan semua 20 sampel padi kajian dapat dikategorikan ke dalam dua kumpulan utama yang berkolerasi dengan taburan geografi asal sampel padi kajian. Ujikaji ini telah menunjukkan keberkesanan penanda mikrosatelite dalam mengesan polimorfisma yang membawa kepada identifikasi genotip dan penentuan diversiti genetik sampel kajian. Maka, aplikasi mikrosatelite harus digalakkan dalam program pembiakbakaan sewaktu fasa pemilihan tumbuhan dengan kromosom yang diinginkan daripada induk yang hampir sama secara genetik.

## ABSTRACT

The variation and relationships among 20 Sabah's upland rice samples collected from various geographical regions of Sabah were analyzed using eight microsatellite primer pairs. Primer pair RM316 amplified two loci consistently and was scored independently. All nine loci examined in all plant samples were polymorphic. A total of 38 allele were identified within nine loci. The number of alleles observed per locus ranged from two to nine. The means of observed and effective alleles were 4.2 and 2.9, respectively. In addition, the mean observed and expected heterozygosities were 0.4 and 0.5352, respectively. Out of nine Chi-square tests that had been carried out, only one were in accordance with Hardy Weinberg Equilibrium at probability,  $P = 0.05$ . The highest and lowest overall allele frequencies were 0.9500 and 0.0250, found in locus RM296 and locus RM336, respectively. The dendrogram constructed from the genetic distance values showed that all of the 20 plant samples were grouped into two major clusters which correlated with the origin geographical location of each plant sample. The results demonstrate the utility of microsatellite markers for detecting polymorphism leading to genotype identification and for estimating genetic diversity. Thus, these hypervariable microsatellites should promote the selection of plant which carry desired chromosomes from genetically similar parents in breeding programs.

## KANDUNGAN

	Muka Surat
PENGAKUAN	ii
PENGESAHAN	iii
PENGHARGAAN	iv-v
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
SENARAI KANDUNGAN	viii-x
SENARAI JADUAL	xi
SENARAI RAJAH	xii-xiii
SENARAI SINGKATAN	xiv

<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b>	1
--------------------------	---

1.1 Pengenalan	1
1.2 Objektif Kajian	2

<b>BAB 2 ULASAN PEPUSTAKAAN</b>	3
---------------------------------	---

2.1 <i>Oryza sativa</i>	3
2.2 Populasi genetik	5
2.2.1 Persamaan Hardy-Weinberg	5
2.2.2 Frekuensi alel dan polimorfisma	6
2.2.3 Heterozigosity	7
2.3 Penanda genetik	8
2.3.1 Penanda morfologi	8
2.3.2 Penanda biokimia	9
2.3.3 Penanda molekul	10
i. AFLP	10
ii. RFLP	10
iii. RAPD	11
iv. Mikrosatelit/SSR	12
2.4 Gel elektroforesis	



2.4.1 Gel agaros	16
2.4.2 Gel agaros MetaPhor	17
2.5 Tindakbalas rantai polimerase	19
<b>BAB 3 BAHAN DAN KAEADAH</b>	23
3.1 Bahan sampel kajian	23
3.2 Metologi kajian	26
3.2.1 Penyediaan sampel padi	28
3.2.2 Kaedah proses pengekstrakan DNA	28
3.2.3 Penentuan kualiti dan kuantiti DNA dengan 0.8% gel agaros	30
3.2.4 Mikrosatelite dan amplifikasi tindakbalas rantai Polimerase (PCR)	31
3.2.5 Analisis produk PCR dengan elektroforesis 3% gel agaros MetaPhor	34
3.2.6 Penskoran jalur	35
3.2.7 Analisis data	37
i. Ujian persamaan Hardy-Weinberg	37
ii. Heterozigositi	39
iii. Jarak genetik	40
<b>BAB 4 KEPUTUSAN</b>	41
4.1 Pengekstrakan DNA	41
4.2 Amplifikasi lokus mikrosatelite	43
4.3 Penskoran jalur	43
4.4 Analisis data	47
4.4.1 Bilangan dan frekuensi alel	47
4.4.2 Persamaan Hardy-Weinberg (HWE)	56
4.4.3 Darjah heterozigositi, H	58
4.4.4 Jarak genetik dan identiti sampel	60
<b>BAB 5 PERBINCANGAN</b>	63
5.1 Isolasi DNA	63
5.2 Elektroforesis produk PCR	64



5.3 Amplifikasi lokus mikrosatelit	65
5.4 Penskoran dan penafsiran data	66
5.5 Analisis data	68
5.5.1 Bilangan dan frekuensi alel	68
5.5.2 Persamaan Hardy-Weinberg	69
5.5.3 Heterozigositi	70
5.5.4 Jarak genetik	71

<b>BAB 6 KESIMPULAN</b>	74
-------------------------	----

<b>RUJUKAN</b>	76
----------------	----

<b>LAMPIRAN</b>	88
-----------------	----



## SENARAI JADUAL

No. Jadual	Halaman
2.1 Parameter-parameter dalam pengoptimaan reaksi PCR.	20
3.1 Koleksi sampel padi tanah kering dan lokasinya di Sabah.	24
3.2 Maklumat primer mikrosatelite padi (RM).	33
4.1 Taburan genotip pada lokus berlainan dalam kesemua sampel padi kajian.	44
4.2 Rumusan statistik bilangan alel bagi semua lokus mikrosatelite kajian.	49
4.3 Frekuensi alel-alel dalam genom sampel padi kajian pada setiap lokus yang berlainan.	50
4.4 Ujian ‘Chi-square’ bagi persamaan Hardy-Weinberg bagi lokus berlainan berdasarkan 20 koleksi padi tanah kering Sabah.	57
4.5 Ringkasan statistik bacaan heterozigositi bagi kesemua lokus yang diujikan.	59
4.6 Penilaian identiti genetik (pepenjuru atas) dan jarak genetik (pepenjuru bawah) bagi 20 sampel padi kajian (Nei's, 1978).	61

## SENARAI RAJAH

No. Rajah	Halaman
2.1 Gel agarose Metaphor pada 3.5% mempunyai kesan resolusi yang hampir sama dengan penggunaan 8% gel poliakrimida.	18
3.1 Lokasi-lokasi di mana bahan sampel biji benih padi kajian diperolehi daripada Tuaran, Tamparuli dan Ranau in Sabah.	25
3.2 Carta aliran metodologi kajian.	27
3.3 Skema penskoran jalur produk PCR.	36
4.1 Profil kualiti genomik DNA bagi 20 sampel padi kajian setelah dielektroforesiskan dengan 0.8% gel agaros.	42
4.2 Profil mikrosatelite bagi lokus RM206 bagi kesemua sampel padi kajian setelah dielektroforesiskan pada 3% gel agaros Metaphor.	45
4.3 Profil mikrosatelite bagi lokus RM296 bagi beberapa koleksi sampel padi kajian yang menunjukkan jalur monomorfisma pada lokus ini.	46



No. Rajah	Halaman
4.4 Frekuensi alel pada lokus RM206.	51
4.5 Frekuensi alel pada lokus RM338.	51
4.6 Frekuensi alel pada lokus RM307.	52
4.7 Frekuensi alel pada lokus RM276.	52
4.8 Frekuensi alel pada lokus RM336.	53
4.9 Frekuensi alel pada lokus RM316A.	53
4.10 Frekuensi alel pada lokus RM316B.	54
4.11 Frekuensi alel pada lokus RM296.	54
4.12 Frekuensi alel pada lokus RM287.	55
4.13 Dendrogram menunjukkan hubungan genetik koleksi 20 sampel padi tanah kering Sabah. Gambarajah dendrogram dibina berdasarkan jarak genetik Nei's (1978).	62



## SENARAI SINGKATAN

AFLP	Amplified fragment length polymorphism
dH <sub>2</sub> O	Air suling (distilled water)
DNA	Asid deoksiribonukleik (deoxyribonucleic acid)
dNTP	Deoksiribonukleosid trifosfat (deoxyribonucleoside triphosphate)
EtBr	Etidium bromida (ethidium bromide)
EtOH	Etanol (ethanol)
g	Gravity (gravity)
kb	kilo pasangan bes (kilo base pair)
PCR	Tindakbalas rantai polimerase (Polymerase chain reaction)
RAPD	Random amplified polymorphic DNA
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RM	Mikrosatelit padi (rice microsatellite)
SSR	Simple Sequence Repeat
TAE	Tris-Aacetat-EDTA
TBE	Tris-Borik-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEN	Tris-EDTA-NaCl
μl	Mikroliter (microliter)



## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Pengenalan

Padi tanah kering merupakan salah satu jenis tanaman tradisional utama di negeri Sabah untuk penduduk tempatan. Akan tetapi, 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 ialah di antara salah satu tanaman yang berpotensi tinggi di Sabah kerana keadaan cuaca dan geografi yang membolehkan padi tanah kering ini beradaptasi dengan baik.

Pada masa kini, 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 polymorphic DNA’ (RAPD) dan mikrosatelit. Mikrosatelit atau juga dikenali sebagai ‘Simple Sequence Repeats’ (SSR) adalah lebih popular digunakan sebagai penanda

dalam bidang pembiakbakaan dan kajian genetik diversiti tumbuhan (Lu *et al.*, 1996). Ini adalah kerana mikrosatelite mempunyai kelebihan seperti bilangannya yang banyak, ‘hypervariability’ (kewujudan dalam bentuk alel yang berlainan), bersifat kodominan, senang diaplikasikan dan bebas daripada pengaruh persekitaran. Mikrosatelite berpunca dari variasi turutan bes-bes segmen DNA yang bersaiz pendek (1-6 pasangan bas) pada lokus tertentu (Brown, 1996).

Mikrosatelite sesuai digunakan sebagai penanda dalam mengesan kepelbagaiaan genetik dalam sesuatu populasi organisma. Ini disebabkan oleh perbezaan dalam kepanjangan turutan bes pada lokus SSR ini boleh dikesan dengan melakukan amplifikasi DNA sampel kajian melalui proses tindakbalas rantai polimerase (PCR). Produk PCR dinilai dengan menggunakan gel elektroforesis untuk menentukan perbezaan alel yang wujud pada sampel-sampel DNA yang dikajikan.

## **1.2 Objektif kajian**

Penyelidikan kajian ini dilakukan untuk:

- i. menentukan tahap polimorfisme dan kepelbagaiaan genetik tanaman padi tanah kering di Sabah,
- ii. menentukan jarak genetik di antara 20 sampel padi kajian,
- iii. mengkaji hubungan genetik sampel padi kajian melalui dendrogram yang dibina daripada bacaan jarak genetik.

## BAB 2

### ULASAN PERPUSTAKAAN

#### 2.1 *Oryza sativa*

Tanaman padi atau juga dikenali dengan nama botani *Oryza sativa*, merupakan tanaman bijirin yang terpenting di negara-negara membangun. Tumbuhan padi tergolong dalam tanaman bijirin rerumput semi-akuatik. *Gramineae* merupakan nama keluarga bagi padi dengan sub keluarganya sebagai *Oryzoideae*. Padi berada dalam kumpulan *Oryzae* dan nama genusnya ialah *Oryza* (Martin *et al.*, 1976). *O. sativa* adalah di antara tanaman monokot diploid ( $2n = 24$ ) dengan saiz genom ( $C = 0.6$  pg) yang paling kecil, iaitu dianggarkan lebih kurang 450 Mbp bertaburan di dalam 12 pasangan kromosom (McCouch *et al.*, 1988; Dean dan Schmidt, 1995).

Genus *Oryza* terdiri daripada 24 spesies yang berbeza, di mana *O. sativa* L. dan *O. glaberrima* merupakan dua spesies yang ditanam. Pada amnya, *O. sativa* L. ditanam secara meluas di seluruh dunia manakala *O. glaberrima* pula hanya ditanam di sebahagian kawasan barat Afrika. Tambahan juga, terdapat sejenis padi liar *Zizania*

*aquatica* yang ditanam di sekitar kawasan ‘Great Lakes’ di Amerika di mana ciri morfologinya lebih mirip kepada tumbuhan ‘oat’ berbanding dengan padi (Juliano, 1993). *O. sativa* L. dibahagikan kepada subspecies *japonica*, *indica* dan *javanica*. Selain daripada itu, tanaman padi juga boleh dikategorikan dengan berdasarkan cara penanaman, iaitu seperti padi tanah kering dan padi sawah. Padi tanah kering disubkumpulkan kepada padi Kedinga yang ditanamkan di kawasan tanah rendah dalam keadaan tanah tidak berair, dan padi bukit (atau juga dinamakan padi huma) yang ditanam di sekitar kaki bukit tanpa saliran air yang baik. Padi sawah pula merupakan tanaman padi yang ditanamkan dalam tanah berair. Selain daripada itu, piawaian pengelasan padi turut diperkenalkan oleh ‘International Rice Research Institute’ pada tahun 1975 yang berasaskan kepada keadaan penanaman padi yang digunakan (Mackill *et al.*, 1996). Ia dapat dikategorikan kepada ‘tall and semi-dwarf rices’, ‘tall rices’ dan ‘floating rices’.

Padi tanah kering adalah salah satu tanaman tradisional yang masih banyak ditanam oleh petani jenis sara diri. Ia sesuai ditanam di negeri Sabah, di mana ia dapat beradaptasi dengan baik pada cuaca yang kering dan keadaan geografi yang berbukit-bukau. Oleh kerana tanaman padi ini selalu memberikan hasil yang rendah dan mengalami masalah senang diserang penyakit maka ia tidak ditanamkan secara komersial oleh petani tempatan. Walau bagaimanapun, masih kurang kajian dan kemajuan genetik dilakukan terhadap padi tanah kering ini.

## 2.2 Populasi genetik

Populasi genetik merupakan kajian organisasi dan dinamik takungan gen dalam sesuatu populasi. Ia termasuklah fenomena variasi genetik, transmisi perubahan gen daripada induk kepada anak dan perubahan takungan gen yang berlaku dalam sesebuah populasi yang disebabkan oleh tekanan evolusi. Variasi genetik berlaku apabila suatu alel mengalami mutasi dalam kandungan gen, maka mutasi memainkan peranan yang penting sebagai sumber kepelbagaian genotip populasi. Oleh yang demikian, pengetahuan genetik diversiti sesuatu populasi organisma membekalkan asas kepada adaptasi dan evolusi populasi spesies yang penting dalam pemuliharaan variasi gen.

### 2.2.1 Persamaan Hardy-Weinberg

Pada tahun 1908, G. H. Hardy, seorang pakar matematik British dan Wilhelm Weinberg, seorang pakar fizik German masing-masing telah menerbitkan laporan yang mengaitkan hubungan di antara frekuensi alel dengan frekuensi genotip dalam bentuk formulasi matematik (Snustad dan Simmons, 1999). Persamaan ini kini dikenali sebagai prinsip Hardy-Weinberg yang mendefinisikan frekuensi genotip mono lokus setelah pengawanan secara rawak satu generasi boleh ditunjukkan oleh suatu fungsi alel secara binomial (dwialel) atau multinomial (kepelbagaian alel) (Hedrick, 1999).

Menurut Klug dan Cummings (1997), keseimbangan Hardy-Weinberg dihasilkan dengan membuat jangkaan;

- a. pengawanan berlaku secara rawak dalam populasi,
- b. tiada berlakunya pemilihan semulajadi,
- c. generasi-generasi adalah tidak saling bertindihan,
- d. populasi adalah terasing, di mana tiada aliran gen ke dalam populasi ataupun keluar daripada populasi, tanpa berlakunya imigrasi,
- e. saiz populasi adalah besar,
- f. tiada mutasi berlaku pada lokus tersebut.

Maka, prinsip Hardy-Weinberg menggambarkan kandungan genetik di dalam populasi diploid dalam bentuk alel dan bukannya dalam fungsi frekuensi genotip.

### **2.2.2 Frekuensi alel dan polimorfisma**

Pada asasnya, teori genetik populasi adalah bersamaan dengan teori frekuensi alel. Frekuensi alel merupakan kebarangkalian alel yang tertentu secara rawak dalam sesebuah populasi (Snustad dan Simmons, 1999) dan ia juga berperanan sebagai salah satu parameter yang penting dalam kajian evolusi, ini adalah disebabkan perubahan takung gen dalam sesuatu populasi dipengaruhi oleh perubahan frekuensi gen.

Polimorfisma genetik berlaku apabila bacaan frekuensi kedua tertinggi bagi alel tersebut adalah lebih daripada 0.01 (Snustad dan Simmons, 1999). Ia juga

disamaertikan dengan suatu alel yang paling umum pada gen tersebut mempunyai bacaan frekuensi yang kurang daripada 0.95 (Hartl dan Clark, 1989).

### **2.2.3 Heterozigositi alel**

Bacaan heterozigositi ialah petunjuk yang paling umum diaplikasikan dalam pengukuran variasi genetik dalam sesebuah takungan gen, di mana individu dalam populasi tersebut adalah diploid yang bersifat homozigus ataupun heterozigus pada suatu lokus tertentu. Nilai diversiti gen, yang didefinisikan sebagai 1 tolak jumlah kuasa dua frekuensi alel pada suatu lokus tertentu. Bagi spesies organisma yang melakukan pengawanan secara rawak, bacaan heterozigositi mempunyai nilai yang hampir sama dengan diversiti gen, maka, kadang-kala kedua-dua parameter ini disamagunakan (Weir, 1990). Heterozigositi biasanya digunakan dalam kuantifikasi amanu variasi genetik yang berdasarkan polimorfik lokus.

## 2.3 Penanda genetik

Penciptaan penanda genetik merupakan hasil kejayaan yang amat penting dalam bidang pembiakbakaan dan kajian populasi genetik organisma. Secara amnya, ia dapat dikategorikan kepada 3 kumpulan, iaitu penanda morfologi, penanda biokimia dan penanda molekul.

### 2.3.1 Penanda morfologi

Penanda morfologi merupakan teknik yang paling awal diaplikasikan dalam kajian kepelbagaiannya tumbuhan. Ia dilakukan dengan mengambilkira ciri-ciri fizikal dan tumbesaran tanaman, contohnya warna daun dan bunga, saiz dan bentuk daun, ketinggian pokok, serta ciri ketoleransian kepada serangan penyakit dan serangga. Penanda ini mempunyai ciri kebolehan pembiakbakaan yang tinggi dan stabil memberikan sifat polimorfisnya yang sesuai sebagai suatu penanda yang cepat dan ringkas pengaplikasiannya (Alvarez *et al.*, 2000). Kajian genetik padi selama 70 tahun yang lalu telah berjaya menghasilkan peta rangkaian (linkage map) kromosom padi berdasarkan penggunaan penanda morfologi.

Walau bagaimanapun, majoriti penanda morfologi adalah didapati mengandungi lokus mutan yang kurang sesuai dalam mengesan kepelbagaiannya dalam populasi pembiakbakaan. Keadaan ini disebabkan alel-alel pada lokus mutan tersebut kebanyakannya bersifat resesif dan ini menjadi faktor penghad dalam pemilihan ciri pembiakbakaan (McCouch *et al.*, 1988). Selain daripada itu, penanda morfologi juga

amat dipengaruhi oleh faktor persekitaran tumbuhan yang menyebabkan kejadian keputusan kurang memuaskan.

### 2.3.2 Penanda biokimia

Penanda biokimia diaplikasi berasaskan kepada elektroforesis protein. Isozim merupakan penanda yang paling biasa digunakan. Isozim merupakan suatu enzim dalam bentuk molekular yang berlainan dengan spesifikasi substrat yang sama tetapi dengan mobiliti elektroforetik yang berbeza (Markert dan Moller, 1959). Oleh yang demikian, proses elektroforesis enzim yang terlibat dapat menunjukkan perbezaan genetik yang terhasil daripada proses mutasi organisma. Jalur yang kelihatan pada gel setelah dilakukan pewarnaan dinamakan sebagai zimogram. Kelebihan penggunaan penanda ini termasuklah ciri kodominannya dan hanya memerlukan amaun sampel yang sedikit yang sesuai diambilkan dari mana-mana bahagian tumbuhan sahaja.

Pada masa kini sebanyak 47 lokus isozim yang dapat dikesangkan pada tanaman padi, dengan 32 daripadanya telah disusunaturkan ke dalam lokasi kromosom padi (Brar *et al.*, 1991). Selain daripada itu, analisis peta rangkaian yang berdasarkan penggunaan penanda isozim juga telah berjaya memetakan 36 lokus pada kromosom tanaman padi (Glaszmann, 1985). Keberkesanannya penanda biokimia ini telah banyak membantu dalam analisis polimorfisme dan lokasi gen yang mengkodkan enzim menjadikannya sebagai suatu penanda genetik yang amat penting dalam kajian populasi genetik.

## RUJUKAN

- Akagi, H., Yokozeki, Y., Inagaki, A. dan Fujimura, T., 1997. Highly polymorphic microsatellites of rice consist of AT repeats, and a classification of closely related cultivars with these microsatellite loci. *Theor Appl Genet* **94**, 61–67.
- Alvarez, A., Fuentes, J. L., Deus, J. E., Miriam, C. D. dan Cornie, M. T., 2000. Genetic analysis in rice mutans using isozyme and morphological markers. *Cultivos Tropicales* **21**, 39-44.
- Alvarez, A. E., van de Wiel, C. C. M., Smulders, M. J. M. dan Vosman, B., 2001. Use of microsatellites to evaluate genetic diversity and species relationship in the genus *Lycopersicon*. *Theor Appl Genet* **103**, 1283-1292.
- Aquadro, C. F., Noon, W. A., Begun, D. J. dan Danforth, B. N., 1998. RFLP analysis using heterologous probes. Dlm: Hoelzel, A. R. (pnyt.), *Molecular genetic analysis of populations*. Oxford University Press, New York. m.s.151-152.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. dan Struhl, K. (pnyt.), 1999. *Short Protocols in Molecular Biology*. Ed. ke-4. John Wiley & Sons, Inc., London. m.s. 62-78.
- Barnum, S. R., 1998. *Biotechnology. An Introduction*. Wadsworth Publishing Company, New York. m.s. 180-181.



**UMS**  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

Blair, M. W., Panaud, O. dan McCouch, S. R., 1999. Inter-simple repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa L.*). *Theor Appl Genet* **98**, 780-792.

Brar, D. S., Delos Reyes, B. G., Panaud, O., Sanchenz, A. dan Khush, G. S., 1991. Genetic mapping in rice using isozyme and RFLP markers. Dlm: Rice Genetics II. Philipines, IRRI. m.s.137-145.

Brown, S. M., 1996. Development and application of simple sequence repeat (SSR) loci for plant genome analysis. *Methods of Genome Analysis in Plants*. m.s.147-162.

Brown, S. M., Hopkins, M. S., Mitchell, S. E., Senior, M. L., Wang, T. Y., Duncan, R. R., Gonzalez-Candelas, F. dan Kresovich, S., 1996. Multiple methods for the identification of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Theor Appl Genet* **93**, 190–198.

Chen, Y., Temnykh, S., Xu, Y., Cho, Y .G. dan McCouch, S. R., 1997. Development of a microsatellite framework map providing genome wide coverage in rice (*Oryza sativa L.*). *Theor Appl Genet* **95**, 553-567.

- Cho, Y. G., Ishii, T., Temnykh, S., Chen, X., Lipovich, L., McCouch, S. R., Park, W. D., Ayres, N. dan Cartinhour, S., 2000. Diversity of microsatellite derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* **100**, 713-721.
- Davis, L. G., Kuehl, W. M. dan Battey, J. F., 1994. *Basic Methods in Molecular Biology*. Edisi ke-2. Prentice Hall, London. m.s. 124-140.
- Dean, C. dan Schmidt, R., 1995. Plant Genome: A Current Molecular Description. *Annu. Rev. Plant Physiology and Mol. Biol.* **46**, 395-418.
- Djè, Y., Heuertz, M., Lefèvre, C. dan Vekemans, X., 2000. Assessment of genetic diversity within and among germplasm accessions in cultivated sorghum using microsatellite markers. *Theor Appl Genet* **100**, 918-925.
- Fuentes, J. L., Escobar, F., Alvarez, A., Gallego, G., Miriam, C. D., Ferrer, M., Dues, J. E. dan Tohme, J. M., 1999. Analysis of genetic diversity in Cuban rice varieties using isozyme, RAPD and AFLP markers. *Euphytica* **109**, 107-115.
- Gao, L. Z. dan Hong, S. G. D. Y., 2000. Allozyme variation and population genetic structure of common wild rice *Oryza rufipogon* Griff. in China. *Theor Appl Genet* **101**, 494-502.

- Glaszmann, J. C., 1985. A varietal classification of Asian cultivated rice (*Oryza sativa* L.) based on isozyme polymorphism. Dlm: Rice Genetics. Philipines: IRRI, m.s.83-90.
- Hartl, D. L. dan Clark, A. G., 1989. *Principles of Populations Genetics*. Edisi ke-2. Sinauer Associates, Inc. Publishers, California. m.s.16-19.
- Hauge, X. Y. dan Litt, M., 1993. A study of the origin of 'shadow bands' seen when typing dinucleotide repeat polymorphisms by the PCR. *Human Molecular Genetics* 2, 411-415.
- Hedrick, P. W., 1999. *Genetics of populations*. Jones and Barlett Publishers, London. m.s. 73-85.
- Hoelzel, A. R. dan Green, A., 1998. PCR protocols and population analysis by direct DNA sequencing and PCR-based DNA fingerprinting. Dlm: Hoelzel, A.R. (pnyt), *Molecular genetic analysis of populations*. Oxford University Press, New York. m.s.230-232.
- Hokanson, S. C., Szewc-McFadden, A. K., Lamboy, W. F. dan McFerson, J. R., 1998. Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in *Malus 'domestica* borkh. Core subset collection. *Theor Appl Genet* 97, 671-683.

Huang, W. G, Cipriani, G., Morgante, M. dan Testolin, R., 1998. Microsatellite DNA in *Actinidia chinensis*: isolation, characterization, and homology in related species. *Theor Appl Genet* **97**, 1269-1278.

Joseph, S. S., 1998. The analysis of Microsatellites by Silver Staining of Nondenaturing Polyacrylamide Gels. Dlm: Tietz, D. (pynt.), *Nucleic Acid Electrophoresis*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York. ms. 162-169.

Juliano, B. O., 1993. *Rice in Human Nutrition*. International Rice Research Institute, Rome, Italy. m.s.94-96.

Karcher, S. J., 1995. *Molecular Biology: A Project Approach*. Academic Press, Inc. London. m.s.78-227.

Klug, W. S. dan Cummings, M., 1997. *Concepts of Genetics*. Edisi ke-5. Prentice Hall. London. m.s. 235-250.

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 methods. *Theor Appl Genet* **93**, 1103-1111.

Mackill, D. J., 1995. Classifying Japonica rice cultivars with RAPD markers. *Crop Sci* **35**, 889-894.

- Maguire, T. L., Peakall, R. dan Saenger, P., 2002. Comparative analysis of genetic diversity in the mangrove species *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. (Avicenniaceae) detected by AFLPs and SSRs. *Theor Appl Genet* **104**, 388-398.
- Markert, C. L. dan Moller, F. F., 1959. Multiple form of enzymes: tissue, ontogenetic and species patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* **45**, 753-763.
- Martin, H. J., Leonard, H. W. dan Stamp, L. D., 1976. *Principle of Field Crops Production*. 3th Edition. Macmillan Publishing Co. Inc., New York. m.s. 101-115.
- McCouch, S. R., Kochert, G., Yu, Z. H., Wang, Z. Y., Khush, G. S., Coffman, W. R. dan Tanksley, S. D., 1988. Molecular mapping of rice chromosomes. *Theor Appl Genet* **76**, 815-829.
- McCouch, S. R., Chen, X., Panaud, O., Temnykh, S., Xu, Y., Chao, Y. G., Huang, N., Ishii, T. dan Blair, M., 1997. Microsatellite markers development, mapping and applications in rice genetics and breeding. *Plant Mol. Biol.* **35**, 88-99.
- Miesfeld, R. L., 1999. *Applied Molecular Genetics*. John Wiley & Sons, Inc., Canada. m.s. 143-172.

Miller, S.A., Dykes, D. D. dan Polesky, H.F., 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* **16**, 1215.

Miura, Y., Wake, H. dan Kato, T., 1999. TBE, or not TBE; that is the question: Beneficial usage of tris-borate for obtaining a higher resolution of small DNA fragments by agarose gel electrophoresis. *Nagoya Medical Journal* **43**, 1-6.

Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* **89**, 583-590.

Olufowote, J. O., Xu, Y., Chen, X., Park, W. D., Beachell, H. M, Dilday, R. H., Goto, M. dan McCouch, S. R., 1997. Comparative evaluation of within-cultivar variation of rice (*Oryza sativa* L.) using microsatellite and RFLP markers. *Genome* **40**, 370-378.

Paetkau, D., Waits, L. P., Clarkson, P. L., Craighead, L. dan Strobeck, C., 1997. An emperical evaluation of genetic distances stastistic using microsatellite data from bear (Ursidae) populations. *Genetics* **147**, 1943-1957.

Palombi, M. dan Damiano, C., 2002. Comparison between RAPD and SSR molecular markers in detecting genetic variation in kiwifruit (*Actinidia deliciosa* A. Chev). *Plant Cell Reports* **20**, 1060-1066.

Panaud, O., Chen, X. dan McCouch, S. R., 1996. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa L.*) *Mol Gen Genet* **252**, 597-607.

Pérez, J. A., Maca, N. dan Larruga, J. M., 1999. Expanding informativeness of microsatellite motifs through the analysis of heteroduplexes: a case applied to *Solanum tuberosum*. *Theor Appl Genet* **99**, 481-486.

Plaschke, J., Ganal, M. W. dan Roder, M. S., 1995. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theor Appl Genet* **91**, 1001-1007.

Prasad, M., Varshney, R. K., Roy, J. K., Balyan, H. S. dan Gupta, P. K., 2000. The use of microsatellites for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat. *Theor Appl Genet* **100**, 584-592.

Qian, W., Ge, S. dan Hong, D. Y., 2001. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers. *Theor Appl Genet* **102**, 440-449.

Ren, F., Lu, B. R., Li, S., Huang, J. dan Zhu, Y., 2003. A comparative study of genetic relationship among the AA-genome *Oryza* species using RAPD dan SSR markers. *Theor Appl Genet* **108**, 113-120.

Sambrook, J. dan Russell, D. W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Volume 1. Ed. ke-3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. m.s. 5.2-5.47.

Schlötterer, C., 1998. Microsatellites. Dlm: Hoelzel, A.R. (pnyt), *Molecular genetic analysis of populations*. Oxford University Press, New York. m.s.237-261.

Seidman, L. A. dan Moore, C. J., 2000. *Basic Laboratory Methods for Biotechnology. Textbook and laboratory Reference*. Prentice Hall, New Jersey. m.s. 417-423.

Singh, S., Vijaykumar, C. H. M., Xu, W., Bagali, P. G., Sarakarung, S., Singh, R. K., Singh, O. N., Singh, V. P. dan Li, Z., 2002. Microsatellite assay of Rainfed Lowland Genotypes. *Rice Genetics Newsletter* **19**,15-18.

Snustad, P. D. dan Simmons, M. J., 1999. *Principles of Genetics*. Ed. ke-2. John Wiley & Sons, Inc., New York. m.s.774-804.

Stellwagen, N. C., 1998. DNA Gel Electrophoresis. Dlm: Tietz, D. (pnyt.), *Nucleic Acid Electrophoresis*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York. ms. 1-45.

Sun, C. Q., Wang, X. K., Li, Z. C., Yoshimura, A. dan Iwata, N., 2001. Comparison of genetic diversity of common wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) dan cultivated rice (*O. sativa* L.) using RFLP. *Theor Appl Genet* **102**, 157-162.

Takezaki, N. dan Nei, M., 1996. Genetic Distances and Reconstruction of Phylogenetic Trees From Microsatellite DNA. *Genetics* **144**, 389-399.

Temnykh, S., Park, W. D., Ayres, N., Cartinhour, S., Hauck, N., Lipovich, L., Cho, Y. G., Ishii, T. dan McCouch, S. R., 2000. Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* **100**, 697-712.

Teulat, B., Aldam, C., Trehin, R., Lebrun, P., Barker, J. H. A., Arnord, G. M., Karp, A., Baudouin, L. dan Rogmon, F., 2000. An analysis of genetic diversity in coconut (*Cocos nucifera*) populations from across the geographic range using sequence-tagged microsatellites (SSRs) and AFLPs. *Theor Appl Genet* **100**, 764-771.

Thomas, B. R., Macdonald, S. E., Hicks, M., Adams, D. L. dan Hodgetts, R. B., 1999. Effects of reforestation methods on genetic diversity of lodgepole pine: an assessment using microsatellite and randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theor Appl Genet* **98**, 793- 801.

Kumar, S. V., 2003. Isolation, characterization and application of DNA microsatellite markers in mungbean (*Vigna radiata* L. wilczek) and other selected legumes. *Doctor of Philosophy*. Universiti Putra Malaysia.

Virk, P. S., Newbury, H. J., Jackson, M. T. dan Ford-Lloyd, B. V., 1995. The identification of duplicate accessions within a rice germplasm collection using RAPD analysis. *Theor Appl Genet* **90**, 1049–1055.

Weir, B. S., 1990. Sampling Properties of Gene Diversity. Dlm: Brown, H. D. A., Clegg, M. T., Kahler, A. L. dan Weir, B. S. (pnyt), *Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources*. Sinauer Associates, Inc. Publishers, California. m.s.23-43.

Welsh, J. dan McCollard, J., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* **18**, 7213-7218.

Wu, K. S. dan Tanksley, S. D., 1993. Abundance polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Mol Gen Genet* **214**, 225-235.

Yang, G. P, Saghai Maroof, M. A., Xu, C. G., Zhang, Q. dan Biyashev, R. M., 1994. Comparative analysis of microsatellite DNA polymorphism in landraces and cultivars of rice. *Mol Gen Genet* **245**, 187-194.

Yeh, F. C., Yang, R. C., Boyle, T., Ye, B. J. dan Mao, J., 1997. *POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis*. Agric-Food and Forestry Molecular Biology Centre, University of Alberta, Canada.

Your complete guide for DNA separation and analysis. The Source books. FMC BioProducts, Inc.

Yu, S. B., Xu, W. J., Vijaykumar, C. H. M., Ali, J., Fu, B. Y., Jiang, Y. Z., Marghirang, R., Domingo, J., Aquino, C., Virmani, S. S. dan Li, Z. K., 2003. Molecular diversity and multilocus organization of the parental lines used in the International Rice Molecular Breeding Program. *Theor Appl Genet* **108**, 131-140.

Zheng, K., Huang, N., Bennett, J. dan Khush, S. G. 1995. PCR-based marker-assisted selection in rice breeding. *IRRI Discussion Paper Series No.12*, 6-14.

Zhou, H. F., Xie, Z. W. dan Ge, S., 2003. Microsatellite analysis of genetic diversity and population genetic structure of a wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) in China. *Theor Appl Genet* **107**, 332-339.