

Pencirian Jujukan Genom Mitokondria Spesies *Rafflesia* (Rafflesiaceae) di Semenanjung Malaysia

(Characterisation of Mitochondrial Genome Sequences of *Rafflesia* Species (Rafflesiaceae) in Peninsular Malaysia)

QIONG CHIN, MOHD-NOOR MAT-ISA, MOHD-FAIZAL ABU-BAKAR, NORFARHAN MOHD-ASSAAD & KIEW-LIAN WAN*

ABSTRAK

Rafflesia terkenal sebagai tumbuhan yang menghasilkan bunga tunggal yang terbesar di dunia. Namun, ia semakin jarang ditemui dan ialah spesies dalam bahaya. Sistem pengelasan spesies *Rafflesia* ialah komponen penting dalam usaha pemuliharaan lazimnya bergantung kepada pencirian morfologi bunga. Walau bagaimanapun, pendekatan molekul, termasuk yang berasaskan kepada jujukan genom mitokondria (mtDNA), berupaya menyediakan kaedah pengelasan yang lebih berkesan. Untuk meneroka kemungkinan ini, jujukan mtDNA empat spesies *Rafflesia* di Semenanjung Malaysia, iaitu *R. cantleyi*, *R. azlanii*, *R. kerrii* dan *R. sharifah-hapsahiae* telah dihimpun dan dicirikan dalam kajian ini. Bacaan jujukan mtDNA untuk setiap spesies kajian pada mulanya telah ditentukan masing-masing daripada set data genom keseluruhan menggunakan pendekatan pemetaan berbantuan rujukan. Proses penghimpunan secara de novo dan perancahan kemudiannya telah dijalankan ke atas bacaan jujukan yang telah dikenal pasti untuk menghasilkan jujukan mtDNA bagi *R. cantleyi* (441,992 pb), *R. azlanii* (472,723 pb), *R. kerrii* (500,932 pb) dan *R. sharifah-hapsahiae* (453,747 pb). Seterusnya, anotasi mtDNA bagi setiap spesies telah mengenal pasti sekurang-kurangnya 31 gen pengekodan protein, enam gen tRNA dan tiga rRNA. Perbandingan gen mitokondria mendapati bahawa beberapa gen seperti *cob*, *rpl10*, *mttB* dan *ccmB* mempamerkan orientasi yang berbeza dalam spesies *Rafflesia* yang tertentu manakala analisis penjajaran jujukan berganda menunjukkan jujukan gen *nad1* adalah berbeza antara keempat-empat spesies *Rafflesia* yang dikaji. Analisis filogenetik dengan menggunakan jujukan bagi tujuh gen pengekodan protein yang terpelihara berupaya membezakan spesies *Rafflesia* yang dikaji. Kesimpulannya, hasil pencirian jujukan mtDNA menunjukkan bahawa jujukan gen mitokondria yang khusus berupaya membezakan spesies *Rafflesia* yang dikaji dan berpotensi untuk digunakan bagi tujuan pengenalpastian serta pengelasan spesies *Rafflesia* dalam usaha pemuliharaan organisma yang unik ini.

Kata kunci: Genomik perbandingan; kepelbagaian genetik; penanda molekul; *Rafflesia*

ABSTRACT

Rafflesia is well-known as a plant that produces the largest single flower in the world. However, it is an increasingly rare and endangered species. The *Rafflesia* species classification system, which is an important component in conservation efforts usually depends on the morphological characterisation of the flower. However, molecular approaches, including those based on mitochondrial genome (mtDNA) sequences, may provide a more effective classification method. To explore this possibility, mtDNA sequences of four *Rafflesia* species in Peninsular Malaysia, namely *R. cantleyi*, *R. azlanii*, *R. kerrii* and *R. sharifah-hapsahiae* were assembled and characterised in this study. mtDNA sequencing reads for each of the four species were initially identified from their respective whole genome data sets using the reference-assisted mapping approach. De novo assembly and scaffolding processes were then carried out on the identified mtDNA sequencing reads to produce mtDNA sequences for *R. cantleyi* (441,992 bp), *R. azlanii* (472,723 bp), *R. kerrii* (500,932 bp) and *R. sharifah-hapsahiae* (453,747 bp). Subsequently, annotation of mtDNA for each species identified at least 31 protein coding, six tRNA and three rRNA genes. Comparative gene analysis showed that several genes such as *cob*, *rpl10*, *mttB* and *ccmB* display different orientation in certain *Rafflesia* species while multiple sequence alignment analysis showed that the *nad1* gene sequence is different between the four *Rafflesia* species studied. Phylogenetic analysis using seven conserved protein coding gene sequences were able to differentiate the *Rafflesia* species studied. In conclusion,

the results of mtDNA sequence characterisation indicate that specific mitochondrial gene sequences are capable of distinguishing the Rafflesia species studied, and have the potential to be used for identification and classification of Rafflesia species in efforts to conserve this unique organism.

Keywords: Comparative genomics; genetic diversity; molecular marker; Rafflesia

PENGENALAN

Rafflesia R. Br (Rafflesiaceae) atau bunga pakma merupakan sejenis genus tumbuhan endofit yang berbunga besar dengan ukuran diameter mencecah sehingga satu meter (Hidayati & Walck 2016). Kudup *Rafflesia* boleh mengambil masa sehingga sembilan bulan untuk berkembang menjadi struktur bunga. Namun begitu, bunganya hanya mekar antara empat hingga tujuh hari sahaja sebelum menunjukkan tandatanda awal kematian seperti kelayuan, perubahan warna kelopak dan hilang kesegahan (Nais 2001). Tumbuhan holoparasit ini juga mempunyai ciri yang unik, iaitu ia tidak mempunyai daun, batang dan akar (Sofiyanti & Choong 2012; Sofiyanti et al. 2016). Tambahan pula, *Rafflesia* tidak memiliki keupayaan untuk menjalankan proses fotosintesis dan bergantung kepada perumahannya yang spesifik, iaitu *Tetrastigma* untuk mendapatkan nutrisi dan mineral (Molina et al. 2014; Wicaksono et al. 2016). Gaya hidup *Rafflesia*, termasuk biologi reproduktif (kitaran berbunga yang panjang dan jangka hayat bunga yang pendek), kekhususan perumah dan ancaman penyahutanan telah dikenal pasti sebagai punca utama yang mengakibatkan penurunan bilangan populasi *Rafflesia* (Barkman et al. 2017; Mat-Salleh 2007; Tolod et al. 2020).

Setakat ini, lebih daripada 30 spesies *Rafflesia* telah dikenal pasti dan tumbuhan ini boleh didapati di negara Asia Tenggara seperti Thailand, Filipina, Indonesia dan Malaysia (Lestari et al. 2020; Pelsner et al. 2019). Daripada jumlah ini, tujuh spesies *Rafflesia* boleh dijumpai di Semenanjung Malaysia, termasuk *R. cantleyi* Solms-Laubach, *R. azlanii* Latiff & Wong, *R. kerrii* Meijer dan *R. sharifah-hapsahiae* Adam, Mohamed, Aizat-Juhari & Wan (Adam et al. 2016, 2013; Mat Yunoh 2020). Pengelasan pelbagai spesies *Rafflesia* secara konvensional dilakukan dengan merujuk kepada morfologi bunga yang hanya mampu menyediakan maklumat terhadap penentuan spesies *Rafflesia* dari segi pandangan luar sahaja. Kajian biologi molekul semasa mengenai *Rafflesia* adalah lebih tertumpu kepada pencirian transkriptom (Amini et al. 2019, 2017; Lee et al. 2016; Ng et al. 2018). Selain itu, kajian mengenai gen mitokondria juga telah

dijalankan dalam usaha untuk memahami hubungan evolusi *Rafflesia* kerana gen mitokondria mengalami kadar mutasi yang lebih rendah berbanding dengan gen nuklear (Barkman et al. 2004). Beberapa kajian lain berkaitan gen mitokondria juga telah dijalankan terhadap genus *Rafflesia*, seperti kajian pemindahan gen secara mendatar (Davis & Wurdack 2004), hubungan evolusi dan kepelbagaian (Barkman et al. 2004; Bendiksby et al. 2010; Xi et al. 2013) dan kemungkinan kehilangan genom kloroplas (cpDNA) (Molina et al. 2014). Sehubungan itu, kajian yang tertumpu kepada pencirian dan perbandingan jujukan genom mitokondria (mtDNA) spesies *Rafflesia* perlu dijalankan memandangkan ia berupaya menyumbang kepada pengelasan spesies secara lebih berkesan seterusnya meningkatkan kesedaran terhadap pemuliharaan tumbuhan ini.

Dalam kajian ini, bacaan jujukan mtDNA empat spesies *Rafflesia* yang terdapat di Semenanjung Malaysia iaitu *R. cantleyi*, *R. azlanii*, *R. kerrii* dan *R. sharifah-hapsahiae* telah diperolehi dan dihipun. Jujukan mtDNA yang dihasilkan telah dianotasi dan dibandingkan untuk mengenal pasti kepelbagaian genetik bagi empat spesies *Rafflesia* ini. Seterusnya, beberapa gen mitokondria telah digunakan dalam pembinaan semula pohon filogenetik bagi menilai kegunaan jujukan mtDNA dalam pencirian perhubungan antara spesies. Pemahaman yang diperolehi ini boleh dijadikan sebagai asas untuk membangunkan strategi pengenalpastian dan pengelasan spesies *Rafflesia* pada peringkat molekul.

BAHAN DAN KAEDAH

PENGHIMPUNAN JUJUKAN MTDNA SPESIES *Rafflesia*

Bacaan jujukan mtDNA spesies *Rafflesia* telah dikenal pasti dan diasingkan dari set data keseluruhan genom melalui pendekatan pemetaan berbantuan rujukan dan seterusnya bacaan jujukan mtDNA tersebut telah diasingkan dan dihipun serta diperincikan untuk menghasilkan jujukan mtDNA masing-masing untuk spesies *Rafflesia* berkenaan. Set data keseluruhan genom untuk kajian ini terdiri dari jujukan hujung berpasangan

Illumina keseluruhan genom spesies *Rafflesia*, iaitu *R. cantleyi* dan *R. sharifah-hapsahiae* yang telah disampel di Pahang, Malaysia, dan *R. azlanii* serta *R. kerrii* yang telah disampel di Perak, Malaysia. Untuk mengenal pasti bacaan jujukan mtDNA *R. cantleyi* kajian, jujukan mtDNA *R. cantleyi* yang telah dijana oleh Xi et al. (2013) telah terlebih dahulu dimuat turun dan dihimpun serta diperancahkan dengan menggunakan perisian ABySS (Simpson et al. 2009). Proses pemetaan bacaan keseluruhan genom *R. cantleyi* kajian kepada jujukan mtDNA rujukan *R. cantleyi* terhimpun ini seterusnya telah dilakukan dengan menggunakan perisian Bowtie2 (Langmead & Salzberg 2012). Bacaan jujukan mtDNA spesies *R. cantleyi* kajian yang telah dipetakan kepada jujukan mtDNA rujukan ini telah diasingkan dan diproses menggunakan perisian SolexaQA++ (Cox et al. 2010) bagi menyingkirkan bacaan yang mempunyai kualiti skor Phred rendah ($< Q20$) dan pendek (< 50 pb). Seterusnya, proses penghimpunan dengan menggunakan perisian Velvet (Zerbino 2010) telah dijalankan. Ini diikuti dengan proses perancahan dengan menggunakan perisian SSPACE (Boetzer et al. 2010) untuk mendapatkan kerangka jujukan mtDNA *R. cantleyi* kajian yang terhimpun. Hasil yang diperoleh mendapati perhimpunan jujukan mtDNA *R. cantleyi* kajian mempamerkan statistik penghimpunan yang lebih baik daripada perhimpunan jujukan mtDNA *R. cantleyi* (Xi et al. 2013) yang telah dimuat turun. Oleh itu, untuk mengenal pasti bacaan jujukan mtDNA spesies *Rafflesia* kajian yang lain, jujukan mtDNA *R. cantleyi* kajian yang terjana telah digunakan sebagai jujukan mtDNA rujukan. Proses pemetaan telah dilakukan dengan menggunakan perisian Bowtie2. Bacaan jujukan mtDNA spesies *Rafflesia* yang telah dipetakan kepada jujukan mtDNA *R. cantleyi* kajian ini telah diasingkan dan seterusnya telah diproses, dihimpun serta diperancahkan dengan keadah yang sama, seperti yang telah dihuraikan.

PENCIRIAN SAIZ SERTA KANDUNGAN GEN DALAM JUJUKAN MTDNA SPESIES *Rafflesia*

Saiz mtDNA spesies *Rafflesia* yang diperoleh telah dianggarkan dengan menggunakan perisian KmerGenie (Chikhi & Medvedev 2014). Kelimpahan k -mer bagi data mtDNA setiap spesies *Rafflesia* perlu dianggarkan terlebih dahulu untuk mendapatkan nilai k -mer genom terbeza (*distinct*) yang paling tinggi berbanding dengan hasil menggunakan set k -mer yang lain. Oleh itu, sempadan di antara puncak yang sepadan dengan kawasan bacaan

tunggal dan lembah permulaan yang sepadan dengan ralat jujukan telah masing-masing dikenal pasti dalam analisis penganggaran saiz mtDNA ini bagi setiap spesies *Rafflesia*. Saiz mtDNA dianggar berdasarkan pengiraan nisbah jumlah nilai k -mer genom terbeza yang bermula dari lembah permulaan sepadan dengan ralat jujukan dan dibahagikan dengan nilai bilangan jujukan kedalaman k -mer yang memberi nilai puncak bagi k -mer genom terbeza. Seterusnya, kandungan gen mtDNA *Rafflesia* terhimpun telah ditentukan dengan menggunakan pelayan sesawang MITOFY (Alverson et al. 2010). Penyusunan kandungan mtDNA kemudiannya telah dijalankan berdasarkan hasil penentuan panjang dan kedudukan gen mtDNA spesies *Rafflesia* dengan menggunakan GenomeVx (Conant & Wolfe 2008).

ANALISIS PERBANDINGAN JUJUKAN MTDNA SPESIES *Rafflesia*

Analisis perbandingan jujukan spesies *Rafflesia* masing-masing telah dilaksanakan bagi setiap gen pengekodan protein mitokondria yang terpelihara iaitu *atp1*, *atp6*, *cob*, *matR*, *nad1*, *nad6* dan *rps3* dengan menggunakan perisian ClustalOmega (Sievers & Higgins 2018). Dalam kajian ini, jujukan gen mitokondria daripada *Rhizanthus lowii* dan *Sapria himalayana* (Jadual 1) telah dimuat turun daripada pangkalan data GenBank (Benson et al. 2015). Setelah kesemua tujuh gen mitokondria dibandingkan melalui analisis penjajaran jujukan berganda, pohon filogenetik telah dibina menggunakan gabungan multilokus gen mitokondria terpelihara dengan *R. lowii* dan *S. himalayana* sebagai kumpulan luar (*outgroup*). Analisis filogenetik telah dijalankan berdasarkan kaedah kebolehjadian maksimum (*maximum likelihood*) menggunakan model evolusi penggantian nukleotida GTR (*General Time Reversible*) dengan kadar keheterogenan Gamma melalui perisian RAxML dan nilai butstrap (*bootstrap*) sebanyak 1000 kali (Stamatakis 2014). RAxML merupakan perisian yang popular dan banyak digunakan untuk menjalankan analisis filogenetik menggunakan kaedah kebolehjadian maksimum bagi data berskala besar. Perisian ini mengintegrasikan model evolusi GTR dengan algoritma pencarian pokok yang pantas tetapi menghasilkan skor kebolehjadian yang baik bagi mengurangkan beban pengkomputeran tanpa menjejaskan ketepatan hasil analisis filogeni (Surveswaran et al. 2018). Akhirnya, pohon filogenetik telah dipamerkan dengan menggunakan FigTree (Rambaut 2009).

JADUAL 1. Gen mitokondria bagi spesies *Rhizanthus lowii* dan *Sapria himalayana* yang dimuat turun daripada pangkalan data GenBank untuk tujuan pengelasan spesies *Rafflesia*

Spesies	Nama gen	Nombor capaian	Rujukan
<i>R. lowii</i>	<i>atp1</i>	EU280947	Barkman et al. (2007)
	<i>atp6</i>	EU882283	Barkman et al. (2008)
	<i>cob</i>	FJ670320	Wurdack & Davis (2009)
	<i>matR</i>	FJ670389	Wurdack & Davis (2009)
	<i>nad1</i>	EU882338	Barkman et al. (2008)
	<i>nad6</i>	FJ669546	Wurdack & Davis (2009)
	<i>rps3</i>	FJ669643	Wurdack & Davis (2009)
<i>S. himalayana</i>	<i>atp1</i>	AY739076	Nickrent et al. (2004)
	<i>atp6</i>	EU882268	Barkman et al. (2008)
	<i>cob</i>	EF135619	Davis et al. (2007)
	<i>matR</i>	AY674561	Davis & Wurdack (2004)
	<i>nad1</i>	AY674768	Davis & Wurdack (2004)
	<i>nad6</i>	EF135397	Davis et al. (2007)
	<i>rps3</i>	EF135484	Davis et al. (2007)

HASIL

PERHIMPUNAN JUJUKAN MTDNA SPESIES *Rafflesia*

Penghimpunan *de novo* jujukan mtDNA spesies *Rafflesia* telah dijalankan kerana tumbuhan ini masih tidak mempunyai genom rujukan yang lengkap dalam pangkalan data awam. Penghimpunan jujukan mtDNA spesies *Rafflesia* menggunakan perisian Velvet telah menghasilkan sebanyak 50 kontig dengan jumlah panjang 400,252 pb bagi *R. cantleyi*, 50 kontig dengan jumlah panjang 435,759 pb bagi *R. azlanii*, 46 kontig dengan jumlah panjang 462,839 pb bagi *R. kerri* dan 41 kontig dengan jumlah panjang 432,119 pb bagi *R. sharifah-hapsahiae* (Jadual 2). Seterusnya, proses perancahan telah dilakukan menggunakan perisian SSPACE terhadap kontig yang terhasil. Kaedah ini boleh menaksir susunan, jarak dan orientasi kontig terhimpun dan menghimpunkan bacaan kontig bersela yang bertindih ke dalam perancah. SSPACE telah menghasilkan sebanyak 21 perancah dengan jumlah panjang 441,992 pb bagi *R. cantleyi*, 38 perancah dengan jumlah panjang 472,723 pb bagi *R. azlanii*, 36 perancah dengan jumlah panjang 500,923 pb bagi *R. kerrii* dan 34 perancah dengan jumlah panjang 453,747 pb bagi *R. sharifah-hapsahiae* (Jadual 2). Jumlah bilangan perancah

yang dihasilkan melalui proses ini didapati adalah lebih rendah dengan jumlah jujukan yang lebih panjang berbanding dengan bilangan dan jumlah jujukan kontig yang diperoleh.

SAIZ DAN KANDUNGAN GEN MTDNA SPESIES *Rafflesia*

Bagi tujuan penganggaran saiz mtDNA, anggaran nilai *k*-mer terbaik telah dikenal pasti dengan menggunakan perisian KmerGenie. Saiz mtDNA spesies *Rafflesia* telah dianggarkan berdasarkan nilai kedudukan puncak yang dibandingkan dengan graf taburan Poisson dan ini telah menghasilkan masing-masing sebanyak 445,084 pb, 480,550 pb, 512,426 pb dan 466,577 pb bagi spesies *R. cantleyi*, *R. azlanii*, *R. kerrii* dan *R. sharifah-hapsahiae*. Anggaran saiz mtDNA ini adalah berdasarkan kepada bentuk histogram dengan nilai *k*-mer yang optimum, iaitu masing-masing sebanyak 69, 71, 81 dan 71, yang didapati bersesuaian bagi spesies *R. cantleyi*, *R. azlanii*, *R. kerrii* dan *R. sharifah-hapsahiae* (Jadual 3). Kebanyakan jurang yang ada dalam jujukan mtDNA *Rafflesia* telah diisikan oleh KmerGenie (Simpson 2014). Oleh itu, saiz jujukan mtDNA yang masih belum lengkap juga telah dianggarkan melalui perbandingan saiz mtDNA terhimpun dengan saiz mtDNA yang dianggarkan

dengan menggunakan KmerGenie. Jadual 3 menunjukkan terdapat sebanyak 3,092 pb (0.69%), 7,827 pb (1.63%), 11,494 pb (2.24%) dan 12,830 pb (2.75%) jujukan mtDNA yang dijangka masih belum dilengkapkan bagi spesies *R. cantleyi*, *R. azlanii*, *R. kerrii* dan *R. sharifah-hapsahiae* melalui proses penghimpunan mtDNA secara *de novo*.

Kandungan gen dalam mtDNA spesies *Rafflesia* telah dianotasi berdasarkan tiga kategori gen yang utama, iaitu gen pengekodan protein, tRNA, dan rRNA. Pencarian gen telah dilakukan berdasarkan pencarian persamaan homolog jujukan mtDNA dengan pangkalan data bagi 41 gen pengekodan protein, 21 gen tRNA dan tiga gen rRNA menggunakan BLAST oleh MITOFY. Hasil analisis ini menunjukkan kehadiran sekurang-kurangnya 40 daripada 65 gen mitokondria di dalam mtDNA setiap spesies *Rafflesia* yang dikaji (Jadual 4, Rajah 1). Sembilan gen pengekodan protein tidak dapat dikenal pasti di dalam kesemua spesies *Rafflesia*, iaitu gen *ccmFc*, *cox3*, *rps10*, *rps11*, *rps13*, *rps14*, *rps19*, *sdh3* dan *sdh4*, sementara gen *rpl2* didapati hanya hadir dalam jujukan mtDNA *R. cantleyi* dan *R. sharifah-hapsahiae*. Gen tRNA iaitu *trnC*, *trnE*, *trnG*, *trnM*, *trnP* dan *trnS* telah dikenal pasti dalam keempat-empat jujukan mtDNA *Rafflesia*. Kesemua jujukan mtDNA *Rafflesia* didapati mengandungi ketiga-tiga gen rRNA. Secara keseluruhannya, terdapat sekurang-kurangnya 31 daripada 41 gen pengekodan protein, enam daripada 21 tRNA dan kesemua tiga gen rRNA telah dikenal pasti dalam mtDNA spesies *Rafflesia* yang dikaji.

Hasil analisis anotasi ini turut menunjukkan kedudukan dan organisasi gen dalam jujukan mtDNA *Rafflesia*. Kandungan gen mitokondria yang dianotasi seperti gen pengekodan protein, tRNA dan rRNA telah dibahagikan berdasarkan fungsi masing-masing untuk tujuan pengelasan jenis gen yang terdapat dalam jujukan mtDNA *Rafflesia* (Rajah 1). Secara keseluruhannya, organisasi gen dalam keempat-empat spesies *Rafflesia* ini didapati berbeza antara satu sama lain. Namun demikian, organisasi gen mitokondria *R. cantleyi* adalah lebih serupa dengan *R. sharifah-hapsahiae* manakala organisasi gen mitokondria *R. azlanii* pula adalah lebih menghampiri *R. kerrii*. Misalnya, orientasi gen *cob* bagi kedua-dua *R. cantleyi* dan *R. sharifah-hapsahiae* adalah dalam orientasi kebelakang manakala bagi *R. azlanii* dan *R. kerrii* pula, ia adalah dalam orientasi hadapan. Begitu juga dengan gen *rpl10* yang mempamerkan orientasi hadapan bagi *R. cantleyi* dan *R. sharifah-hapsahiae*, manakala ia tersusun dalam orientasi kebelakang bagi dua spesies *Rafflesia* yang lain. Di samping itu, gen *mttB* dan *ccmB* juga telah dikesan mempunyai perbezaan orientasi unik, masing-masing di dalam spesies *R. azlanii* dan *R. sharifah-hapsahiae*. Walau bagaimanapun, secara keseluruhannya tahap sinteni bagi keempat-empat mtDNA adalah rendah dan ini memberikan implikasi bahawa penyusunan semula gen mtDNA berlaku sewaktu penspesiesan (Rajah 1).

JADUAL 2. Statistik penghimpunan dan perancangan data mtDNA bagi *R. cantleyi* (Xi et al. 2013) dan spesies *Rafflesia* kajian, iaitu *R. cantleyi*, *R. azlanii*, *R. kerrii* dan *R. sharifah-hapsahiae*

	<i>R. cantleyi</i> (Xi et al. 2013)	<i>R. cantleyi</i>	<i>R. azlanii</i>	<i>R. kerrii</i>	<i>R. sharifah-hapsahiae</i>
Selepas penghimpunan					
Bilangan kontig	231	50	50	46	41
Jumlah panjang jujukan kontig (pb)	547,325	400,252	435,759	462,839	432,119
Saiz maksimum kontig (pb)	41,381	21,610	29,939	25,024	21,797
Saiz minimum kontig (pb)	501	196	150	150	150
Purata saiz kontig (pb)	2,369	8,005	8,715	10,061	10,539
N50 (pb)	11,520	14,618	15,680	18,127	17,204
Kandungan GC (%)	45.13	44.24	44.39	45.18	45.07
Selepas proses perancangan					
Bilangan bacaan perancah	209	21	38	36	34
Jumlah panjang jujukan perancah (pb)	547,921	441,992	472,723	500,932	453,747
Saiz maksimum perancah (pb)	41,381	101,039	57,974	38,870	39,549
Saiz minimum perancah (pb)	501	196	150	150	150
Purata saiz perancah (pb)	2,622	21,047	12,440	13,914	13,345
N50 (pb)	15,114	33,485	18,046	21,293	18,854
Kandungan GC (%)	44.95	40.64	38.66	35.63	40.12

JADUAL 3. Statistik penganggaran saiz mtDNA *Rafflesia*

	<i>R. cantleyi</i>	<i>R. azlanii</i>	<i>R. kerrii</i>	<i>R. sharifah-hapsahiae</i>
Panjang <i>k</i> -mer	69	71	81	71
Jumlah taburan <i>k</i> -mer	141,599,892	15,377,603	5,124,275	3,732,614
Saiz mtDNA yang dianggarkan (pb)	445,084	480,550	512,426	466,577
Jumlah saiz mtDNA terhimpun (pb)	441,992	471,723	500,932	453,747
Jumlah saiz mtDNA yang tidak diperoleh (pb)	3,092	7,827	11,494	12,830
Peratus mtDNA yang belum dilengkapi (%)	0.69	1.63	2.24	2.75

JADUAL 4. Anotasi kandungan gen pengekodan protein, tRNA dan rRNA dalam jujukan mtDNA *R. cantleyi*, *R. azlanii*, *R. kerrii* dan *R. sharifah-hapsahiae*

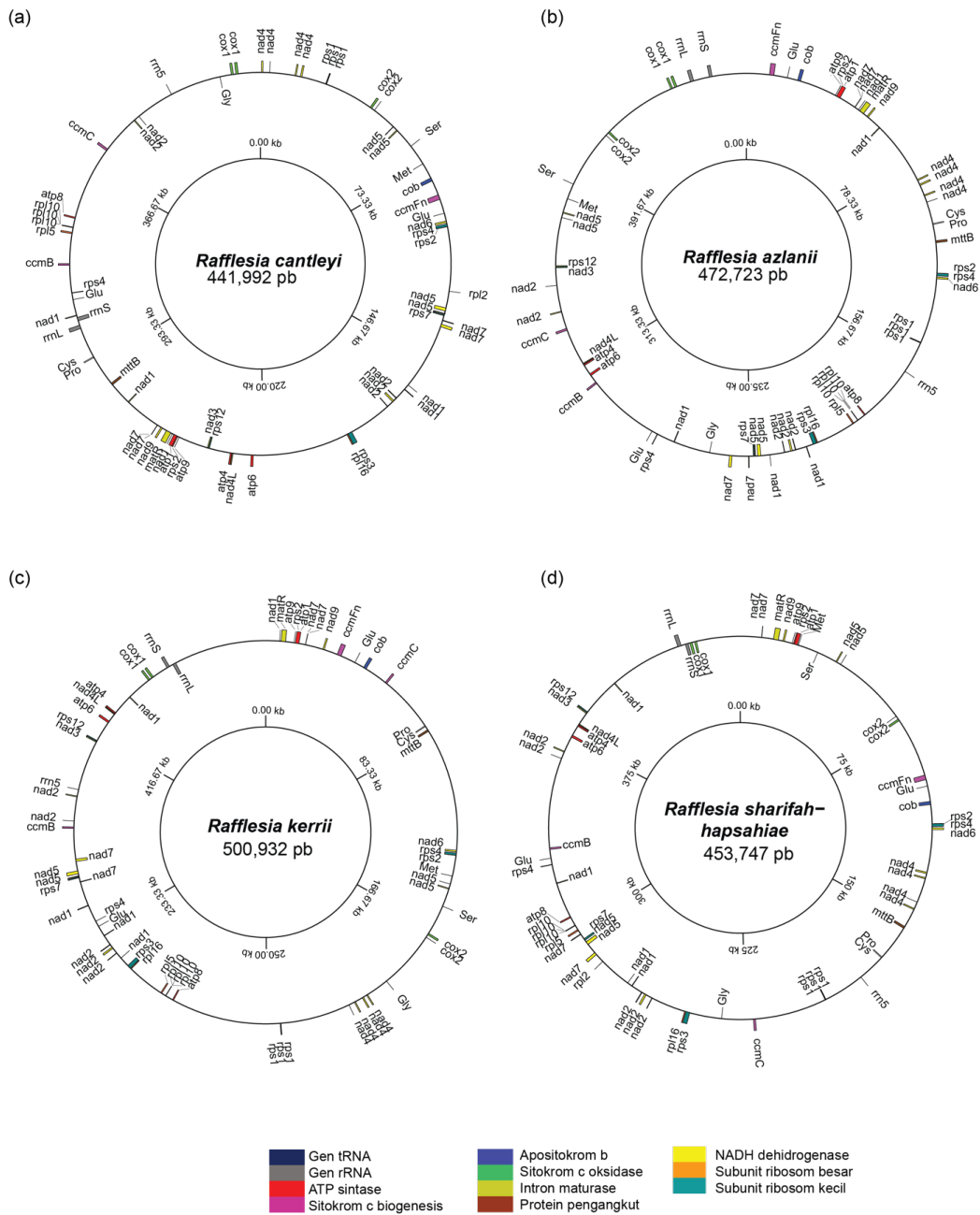
Padanan gen	<i>R. cantleyi</i>		<i>R. azlanii</i>		<i>R. kerrii</i>		<i>R. sharifah-hapsahiae</i>	
	Saiz (pb)	Jenis bebenang	Saiz (pb)	Jenis bebenang	Saiz (pb)	Jenis bebenang	Saiz (pb)	Jenis bebenang
Gen pengekodan protein								
<i>atp1</i>	√	1530 +	1530 +	1530 +	1530 +	1530 +	1530 +	1530 +
<i>atp4</i>	√	543 +	543 -	543 -	543 -	543 -	543 -	543 -
<i>atp6</i>	√	801 +	801 -	801 -	801 +	801 +	801 -	801 -
<i>atp8</i>	√	459 +	459 -	459 -	459 -	459 -	459 +	459 +
<i>atp9</i>	√	102 +	102 +	102 +	102 +	102 +	102 +	102 +
<i>cemB</i>	√	618 +	618 +	618 +	618 +	618 +	618 -	618 -
<i>cemC</i>	√	756 +	756 +	756 +	756 +	756 +	756 +	756 +
<i>cemFc</i>	x	tiada	tiada	tiada	tiada	tiada	tiada	tiada
<i>cemFn</i>	√	1761 -	1761 +	1743 +	1743 +	1761 +	1761 -	1761 -
<i>cob</i>	√	1170 -	1170 +	1170 +	1170 +	1170 +	1170 -	1170 -
<i>cox1</i>	√	840 +	840 +	840 +	840 +	840 +	840 -	840 -
		726 +	726 +	723 +	723 +	726 +	726 -	726 -
<i>cox2</i>	√	699 +	699 -	699 +	699 +	699 +	699 -	699 -
		78 +	78 -	78 +	78 +	78 +	78 -	78 -
<i>cox3</i>	x	tiada	tiada	tiada	tiada	tiada	tiada	tiada
<i>matR</i>	√	1821 +	1821 +	1821 +	1821 +	1821 +	1821 +	1821 +
<i>mttB</i>	√	765 -	765 +	765 -	765 -	765 -	765 -	765 -
<i>nad1</i>	√	309 -	309 -	309 -	309 -	309 -	309 -	309 -
		255 +	255 -	255 +	255 +	255 +	255 -	255 -

		195	+	195	+	195	-	195	-
		132	+	132	+	132	-	132	-
		57	+	57	+	57	+		
<i>nad2</i>	√	645	-	645	-	645	+	645	+
		351	-	351	+	351	+	351	+
		219	-	219	-	219	+	219	+
		162	-	162	-	162	+	162	+
		141	-	141	+	141	+	141	+
<i>nad3</i>	√	357	-	357	-	357	+	357	+
<i>nad4</i>	√	546	+	546	+	546	+	546	-
		462	+	462	+	462	+	462	-
		459	+	459	+	459	+	459	-
		87	+	87	+	87	+	87	-
<i>nad4L</i>	√	297	+	297	-	297	+	297	-
<i>nad5</i>	√	1203	-	1203	-	1203	+	1203	-
		396	-	396	-	396	-	396	+
		237	-	237	-	237	+	237	-
		144	-	144	-	144	-	144	+
<i>nad6</i>	√	653	-	648	+	648	-	648	+
<i>nad7</i>	√	969	+	969	+	969	-	969	+
		207	+	207	+	207	-	207	+
		126	+	126	+	126	+	126	+
		45	+	45	+	45	+	45	+
<i>nad9</i>	√	570	+	570	+	570	+	570	+
<i>rpl2</i>	√/x	93	+	tiada		tiada		93	+
<i>rpl5</i>	√	501	+	507	-	507	-	501	+
<i>rpl10</i>	√	144	+	144	-	144	-	144	+
		75	+	75	-	75	-	75	+
		45	+	45	-	45	-	45	+
<i>rpl16</i>	√	408	+	408	-	408	-	408	+
<i>rps1</i>	√	180	-	180	-	180	+	180	-
		129	+	129	-	129	+	129	-
		120	+	123	-	120	+	123	-
<i>rps2</i>	√	141	+	141	+	141	+	141	+
		102	-	102	+	102	-	102	+
<i>rps3</i>	√	1560	+	1560	-	1560	-	1560	+
<i>rps4</i>	√	1008	-	1008	+	1008	-	1008	+
		153	-	153	+	153	-	150	+
<i>rps7</i>	√	336	-	336	-	336	+	666	-
<i>rps10</i>	x	tiada		tiada		tiada		tiada	

<i>rps11</i>	x	tiada		tiada		tiada		tiada	
<i>rps12</i>	√	375	-	375	-	375	+	375	+
<i>rps13</i>	x	tiada		tiada		tiada		tiada	
<i>rps14</i>	x	tiada		tiada		tiada		tiada	
<i>rps19</i>	x	tiada		tiada		tiada		tiada	
<i>sdh3</i>	x	tiada		tiada		tiada		tiada	
<i>sdh4</i>	x	tiada		tiada		tiada		tiada	
Gen tRNA									
<i>trnA</i> (Ala)	x	tiada		tiada		tiada		tiada	
<i>trnC</i> (Cys)	√	74	+	39	+	39	-	74	+
<i>trnD</i> (Asp)	x	tiada		tiada		tiada		tiada	
<i>trnE</i> (Glu)	√	72	+	72	+	72	+	72	+
		72	-	72	+	72	-	72	+
<i>trnF</i> (Phe)	x	tiada		tiada		tiada		tiada	
<i>trnG</i> (Gly)	√	72	-	72	-	72	+	72	-
<i>trnH</i> (His)	x	tiada		tiada		tiada		tiada	
<i>trnI</i> (Ile)	x	tiada		tiada		tiada		tiada	
<i>trnK</i> (Lys)	x	tiada		tiada		tiada		tiada	
<i>trnL</i> (Leu)	x	tiada		tiada		tiada		tiada	
<i>trnM</i> (Met)	√	74	-	74	-	74	-	74	+
<i>trnN</i> (Asn)	x	tiada		tiada		tiada		tiada	
<i>trnP</i> (Pro)	√	75	+	75	+	75	+	75	-
<i>trnQ</i> (Gln)	x	tiada		tiada		tiada		tiada	
<i>trnR</i> (Arg)	x	tiada		tiada		tiada		tiada	
<i>trnS</i> (Ser)	√	87	+	87	+	87	+	87	-
<i>trnT</i> (Thr)	x	tiada		tiada		tiada		tiada	
<i>trnV</i> (Val)	x	tiada		tiada		tiada		tiada	
<i>trnW</i> (Trp)	x	tiada		tiada		tiada		tiada	
<i>trnY</i> (Tyr)	x	tiada		tiada		tiada		tiada	
Gen rRNA									

<i>rrn5s</i>	√	115	+	115	+	115	+	115	+
<i>rrnL</i>	√	1267	+	1267	+	1267	+	1267	+
<i>rrnS</i>	√	1270	-	1090	+	1082	+	1090	-

Baris berbeza bagi gen yang sama menunjukkan pengesanan gen homolog. √ = ada padanan dengan pangkalan data gen mitokondria, x = tiada padanan dengan pangkalan data gen mitokondria. Tanda (+) dan (-) menunjukkan arah gen secara kehadapan atau ke belakang, warna yang sama menunjukkan peratus identiti sebanyak 100% bagi gen yang sama, warna yang berbeza menunjukkan kepelbagaian jujukan bagi gen yang sama



RAJAH 1. Peta bulatan mtDNA spesies *Rafflesia*. (a) *R. cantleyi*, (b) *R. azlanii*, (c) *R. kerrii* dan (d) *R. sharifah-hapsahiae*. Gen yang berada di luar bulatan merupakan gen yang dikodkan pada bebenang (+) manakala gen yang berada di dalam bulatan merupakan gen yang dikodkan pada bebenang (-). Gen-gen telah diwarnakan masing-masing berdasarkan kumpulan berfungsi

PERBANDINGAN JUJUKAN DAN PEMBINAAN POHON
FILOGENETIK MENGGUNAKAN GEN MITOKONDRIA
SPESIES *Rafflesia*

Analisis penjajaran jujukan berganda telah dilakukan untuk setiap gen mitokondria daripada jujukan mtDNA keempat-empat spesies *Rafflesia* untuk mengenal pasti persamaan dan perbezaan antara jujukan gen mitokondria tersebut. Hasil analisis penjajaran ini mencadangkan bahawa gen mitokondria seperti *nad1* yang menunjukkan perbezaan antara keempat-empat spesies *Rafflesia* yang dikaji, sesuai digunakan dalam pembezaan spesies *Rafflesia*. Seterusnya, sebanyak tujuh jujukan gen mitokondria yang terpelihara, iaitu *atp1*, *atp6*, *cob*, *matR*, *nad1*, *nad6* dan *rps3*, telah digunakan secara gabungan untuk membina pohon filogenetik bagi membezakan spesies *Rafflesia* yang dikaji. Dua ahli lain dalam keluarga Rafflesiaceae iaitu *Rhizanthus* dan *Sapria* yang berdekatan dengan *Rafflesia* telah digunakan sebagai kumpulan luar dalam analisis ini bagi meningkatkan kebolehan mendiskriminasi spesies *Rafflesia* kajian. Jujukan gen mitokondria keempat-empat spesies *Rafflesia* ini masing-masing telah disunting secara manual berikutan penjajaran jujukan berganda gen secara individu bagi memastikan hanya maklumat yang terpelihara digunakan dalam analisis filogenetik.

Hasil analisis jarak berpasangan (*pairwise distance*) bagi gabungan tujuh jujukan gen mitokondria ini menunjukkan spesies *Rafflesia* dan spesies kumpulan luar mempunyai peratus identiti yang melebihi 60%. Hasil analisis ini juga menunjukkan bahawa jarak berpasangan antara jujukan *R. cantleyi* dengan *R. sharifah-hapsahiae* mempunyai peratus identiti yang paling tinggi, iaitu sebanyak 87.45%. *R. cantleyi* juga mempamerkan persamaan identiti sebanyak 78.18% dengan *R. kerrii* dan 66.07% dengan *R. azlanii*. Skor matriks identiti ini juga menunjukkan bahawa *R. azlanii* mempunyai persamaan identiti yang lebih hampir dengan *R. kerrii* dengan peratus identiti sebanyak 84.89% (Jadual 5).

Pohon filogenetik kemudiannya telah dibina dengan menggunakan tujuh jujukan gen mitokondria yang diperolehi daripada analisis penjajaran jujukan berganda. Hasil pohon filogenetik ini menunjukkan bahawa tujuh jujukan gen mitokondria terpelihara yang digunakan dapat membezakan spesies *Rafflesia* dengan menunjukkan nilai bootstrap 100% antara spesies *Rafflesia*. Terdapat dua nod cabang dalam pohon filogenetik yang dibina ini, iaitu satu nod mengandungi spesies *R. cantleyi* dan *R. sharifah-hapsahiae* manakala nod yang lagi satu pula mengandungi spesies *R. azlanii* dan *R. kerrii* (Rajah 2).

Hasil ini menunjukkan perkaitan yang lebih dekat antara *R. cantleyi* dengan *R. sharifah-hapsahiae* manakala *R. azlanii* pula lebih menghampiri kepada *R. kerrii*.

PERBINCANGAN

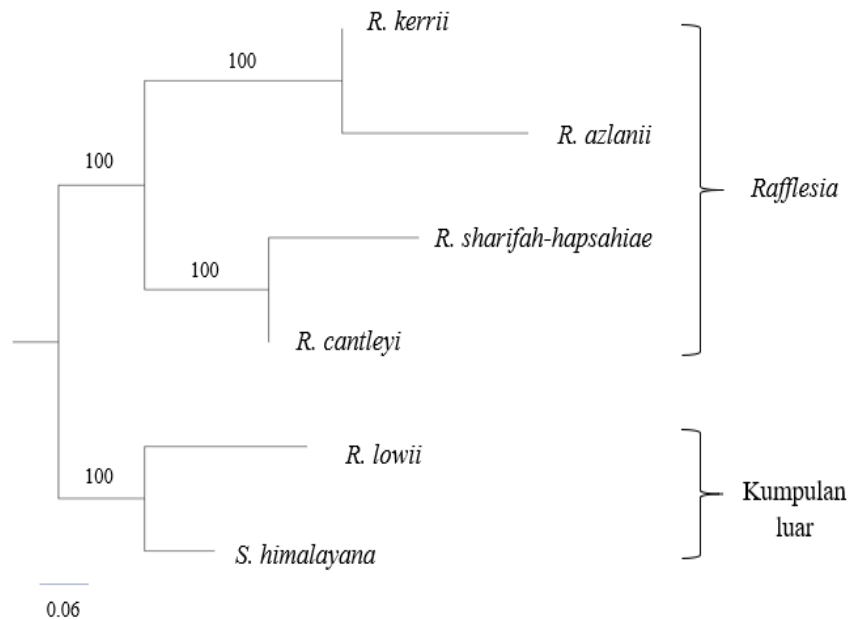
Rafflesia mempamerkan morfologi yang unik, terutamanya bunga merah yang bersaiz besar dengan lima lob perigon dan bercorak bintik putih pada permukaannya (Nais 2001). Morfologi bunga *Rafflesia* biasa digunakan untuk membezakan spesies *Rafflesia* bagi tujuan pengenalpastian taksonomi. Namun, kaedah pengelasan berdasarkan morfologi ini telah menjadi rumit apabila spesies baharu yang mempunyai ciri morfologi yang serupa ditemui. Pembinaan sistematik tumbuhan berdasarkan kaedah morfologi merupakan cabaran utama kepada ahli botani disebabkan tahap homoplasi yang tinggi antara spesies *Rafflesia* (Barkman et al. 2008; Bendiksby et al. 2010). Kaedah molekul, yang berasaskan kepada jujukan mtDNA, merupakan alternatif yang berkesan dalam pembezaan spesies. Ini telah ditunjukkan dalam pembinaan hubungan genetik antara spesies *Rafflesia* dari lokaliti berbeza iaitu Borneo, Indonesia (Sumatera dan Kepulauan Jawa), Semenanjung Malaysia dan Filipina (Bendiksby et al. 2010). Penanda molekul ini juga telah didapati berguna dalam pembinaan semula hubungan filogenetik spesies *Rafflesia* untuk meramalkan julat leluhur, serta kadar dan corak penyebaran spesies ini (Pelser et al. 2019). Oleh itu, dalam kajian ini, potensi jujukan mtDNA untuk menyediakan kaedah alternatif bagi membezakan spesies *Rafflesia* pada peringkat molekul telah dikaji dengan lebih lanjut.

Jujukan mtDNA daripada empat spesies *Rafflesia* di Semenanjung Malaysia, iaitu *R. cantleyi*, *R. azlanii*, *R. kerrii* dan *R. sharifah-hapsahiae* telah dihimpun dan dicirikan dalam kajian ini. Pada mulanya, pendekatan pemetaan kepada jujukan mtDNA rujukan telah digunakan bagi memperoleh bacaan jujukan mtDNA dari set data genom keseluruhan. Untuk *R. cantleyi* kajian, jujukan mtDNA yang telah dijana dari bacaan jujukan *R. cantleyi* yang telah diterbitkan (Xi et al. 2013), telah digunakan sebagai jujukan mtDNA rujukan, manakala bagi spesies *Rafflesia* kajian yang lain, jujukan mtDNA yang telah dijana dari bacaan jujukan *R. cantleyi* kajian telah digunakan sebagai jujukan mtDNA rujukan. Penghimpunan *de novo* bacaan jujukan mtDNA yang telah dikenal pasti telah dijalankan menggunakan kaedah pengoptimuman Velvet kerana tumbuhan parasit ini masih tidak mempunyai genom rujukan lengkap dalam pangkalan data awam. Velvet telah dipilih untuk

JADUAL 5. Peta haba peratus matriks identiti bagi *Rhizanthus lowii*, *Sapria himalayana*, dan empat spesies *Rafflesia* melalui analisis penjajaran jujukan berganda tujuh gen yang terpelihara

Species	<i>R. lowii</i>	<i>S. himalayana</i>	<i>R. cantleyi</i>	<i>R. sharifah-hapsahiae</i>	<i>R. azlanii</i>	<i>R. kerrii</i>
<i>R. lowii</i>	100.00	82.48	71.58	67.14	68.88	70.60
<i>S. himalayana</i>	82.48	100.00	76.82	72.42	70.72	72.10
<i>R. cantleyi</i>	71.58	76.82	100.00	87.45	66.07	78.18
<i>R. sharifah-hapsahiae</i>	67.14	72.42	87.45	100.00	71.99	68.46
<i>R. azlanii</i>	68.88	70.71	66.07	71.99	100.00	84.89
<i>R. kerrii</i>	70.60	72.10	78.18	68.46	84.89	100.00

Warna menunjukkan kecerunan nilai peratus persamaan: warna oren gelap = persamaan identiti 100%, warna putih = peratus identiti paling rendah (66.07%)



RAJAH 2. Analisis filogenetik bagi gen mitokondria berbilang untuk spesies *Rafflesia*, *Rhizanthus* dan *Sapria*. Tujuh jujukan gen mitokondria yang terpelihara antara spesies *Rafflesia*, *Rhizanthus* dan *Sapria*, iaitu *atp1*, *atp6*, *cob*, *matR*, *nad1*, *nad6* dan *rps3* digunakan untuk membina pohon filogenetik melalui kaedah kebolehdajian maksimum menggunakan model GTR dalam program RAxML dengan 1000 kali replikat

menghimpunkan jujukan mtDNA spesies *Rafflesia* kajian kerana perisian ini dibina dengan kecekapan penggunaan memori yang rendah selain mengambil masa yang lebih pendek untuk menghimpun set data hujung berpasangan (Khan et al. 2018). Panjang cincangan atau *k*-mer yang

optimum adalah penting kerana parameter yang telah dioptimumkan boleh mengimbas ruang parameter tersebut secara automatik untuk menghasilkan perhimpunan terbaik dari segi kepekaan dan ketentuan (Zerbino 2010). Seterusnya, proses perancangan telah dilakukan

menggunakan SSPACE terhadap kontig yang dihasilkan oleh Velvet. Kaedah ini boleh menaksirkan susunan, jarak dan orientasi kontig terhimpun dan menggabungkan bacaan kontig ke dalam perancah. SSPACE dipilih untuk langkah perancahan dalam kajian ini kerana ia berupaya meningkatkan kecekapan pemasangan antara kontig dan bekerja sama dengan Bowtie2 secara berkesan dalam proses pemetaan dan penghimpunan yang perlu dijalankan (Hunt et al. 2014). Bilangan perancah didapati lebih rendah berbanding dengan bilangan kontig selepas proses penghimpunan dan perancahan dijalankan. Ini adalah kerana SSPACE selalu bermula dengan membina bacaan perancah pertama daripada kontig yang paling panjang dan menggabungkan sebanyak mungkin kontig yang mempunyai pertindihan untuk mendapat bacaan perancah (Hunt et al. 2014). Tindakan penyambungan satu kontig dengan kontig lain ini juga menyebabkan bacaan perancah adalah lebih panjang berbanding dengan panjang bacaan kontig yang diperolehi (Boetzer et al. 2010). Proses perancahan yang mengambil kira parameter penting seperti kualiti bacaan adalah amat penting dalam penghasilan perhimpunan jujukan panjang bagi memastikan lebih banyak data bermakna dapat digunakan dalam analisis perbandingan jujukan mtDNA spesies *Rafflesia*.

Pencirian jujukan mtDNA menunjukkan saiz yang berbeza dalam kalangan mtDNA spesies *Rafflesia*. Kajian lepas juga menunjukkan saiz yang dinamik dalam kalangan mtDNA tumbuhan disebabkan oleh kadar kehilangan dan penggandaan gen yang tinggi (Chang et al. 2013; Choi et al. 2019; Huang et al. 2020; Palmer et al. 2000). Analisis perbandingan mtDNA spesies angiosperma menunjukkan pola mozek bagi kandungan gen (Sloan et al. 2012). Perubahan yang berlaku pada jujukan gen menyebabkan anotasi berdasarkan kaedah pencarian persamaan homolog kurang berkesan. Selain itu, gen mitokondria mungkin tidak dapat dikesan dalam mtDNA kerana gen mitokondria tersebut telah digantikan oleh gen lain yang berupaya memainkan peranan yang sama atau serupa dan sudah tersedia ada dalam mtDNA. Penggantian gen didapati sering berlaku antara mtDNA, cpDNA dan genom nuklear (nDNA) dalam tumbuhan (Adams et al. 2002a; Mollier et al. 2002; Van de Paer et al. 2018). Begitu juga dengan proses pemindahan gen daripada mtDNA ke nDNA yang didapati berlaku secara berterusan dalam kalangan organisma eukariot, termasuk tumbuhan (Adams et al. 2002b; Adams & Palmer 2003). Saiz mtDNA didapati semakin berkurang dalam tempoh simbiosis yang panjang kerana berlakunya

pemindahan gen dari mtDNA ke nDNA dalam tumbuhan (Yamauchi 2005). Perubahan organisasi mtDNA yang sangat kompleks ini mungkin berkait rapat dengan keupayaan dan keperluan tumbuhan untuk menghadapi perubahan dalam persekitarannya. Oleh itu, organisasi kebanyakan gen tumbuhan yang terlibat dalam aktiviti pertumbuhan dan perkembangan mungkin berubah untuk menyesuaikan perubahan yang dihadapi oleh tumbuhan (Pichersky & Gerats 2011).

Walaupun gen mitokondria banyak digunakan dalam kajian taksonomi haiwan, gen ini kurang diberi perhatian dalam kajian tumbuhan disebabkan oleh kepelbagaian struktur genom serta kadar mutasi yang rendah antara spesies tumbuhan (Van de Paer et al. 2018). Namun demikian, ketersediaan data jujukan mtDNA telah membuka peluang baharu bagi penerokaan potensi jujukan tersebut dalam kajian evolusi spesies tumbuhan. Gen mitokondria pernah digunakan untuk tujuan perbandingan antara spesies *Rafflesia* (Bendiksby et al. 2010; Nikolov et al. 2013). Walau bagaimanapun, kajian perbandingan terdahulu yang menggunakan gabungan gen subunit kecil RNA ribosom dan beberapa gen mitokondria tidak berupaya membezakan antara tiga spesies *Rafflesia* iaitu *R. cantleyi*, *R. azlanii* dan *R. kerrii*, yang mana ketiga-tiga spesies ini didapati dikategorikan dalam satu klad yang sama (Bendiksby et al. 2010). Selain itu, hubungan filogenetik antara spesies *Rafflesia* dengan tumbuhan lain juga telah dikaji, walaupun akhirnya perbezaan interspesies *Rafflesia* tidak berjaya dilakukan pada peringkat molekul kerana polimorfisme jujukan gen mitokondria yang digunakan adalah rendah (Barkman et al. 2008, 2007; Bendiksby et al. 2010). Hasil tersebut adalah bersesuaian dengan keputusan kajian ini yang menunjukkan bahawa jujukan penanda yang digunakan seperti gen *matR* mempunyai tahap pemeliharaan yang tinggi. Ini mencadangkan bahawa analisis perbandingan gen yang terdapat dalam mtDNA berupaya untuk mengenal pasti penanda genetik yang lebih berguna bagi pembezaan spesies *Rafflesia* pada peringkat molekul.

Dalam kajian ini, analisis perbandingan jujukan telah mengenal pasti potensi penggunaan gen mitokondria individu bagi tujuan pembezaan spesies *Rafflesia* yang dikaji. mtDNA tumbuhan mempunyai saiz yang besar dengan kapasiti pengekodan yang tinggi, kadar mutasi yang rendah dalam gen mitokondria dan kadar penyesuaian semula yang tinggi (Wynn & Christensen 2019). Kajian yang dijalankan oleh Shedge et al. (2010) mendapati bahawa mtDNA tumbuhan boleh dicirikan dengan pelbagai jenis gabungan seperti kehadiran

gen berulang, serta penyelitan dan pengembangan atau pengurangan gen. Hasil kajian ini menunjukkan terdapat perbezaan dalam jujukan dan organisasi gen mitokondria antara spesies *Rafflesia* yang dikaji. Kewujudan gen individu dalam mtDNA seperti gen *nad1* yang mempamerkan jujukan yang berbeza antara empat spesies *Rafflesia* yang dikaji mencadangkan kegunaan gen tersebut dalam pembezaan spesies *Rafflesia*, manakala gen mitokondria seperti *cob*, *rpl10*, *mttB* dan *ccmB* yang mempunyai orientasi yang berbeza dalam spesies *Rafflesia* tertentu boleh digunakan dalam pembangunan kod bar DNA bagi pengenalpastian spesies *Rafflesia* tersebut.

Di samping itu, hasil kajian ini juga menunjukkan bahawa penggunaan gen mitokondria gabungan yang terdiri dari *atp1*, *atp6*, *cob*, *matR*, *nad1*, *nad6* dan *rps3* berupaya meleraikan perkaitan filogeni bagi empat spesies *Rafflesia* yang dikaji. Penggunaan data yang lebih komprehensif daripada mtDNA menghasilkan lebih banyak tapak bermaklumat yang berupaya untuk meleraikan perkaitan hubungan evolusi antara spesies yang tidak dapat dijelaskan sebelum ini (Van de Paer et al. 2018). Kaedah ini menawarkan kemungkinan untuk membangunkan kod bar DNA yang khusus bagi spesies *Rafflesia* yang dikaji. Pembangunan kod bar DNA untuk tumbuhan adalah amat mencabar kerana pengenalpastian kawasan ataupun jujukan yang berkualiti dan khusus dalam genom diperlukan untuk membolehkan pengecaman spesies dalam variasi intraspesies (Hollingsworth et al. 2011). Walaupun maklumat di peringkat molekul adalah penting dalam pembangunan kod bar DNA tumbuhan, namun pencirian morfologi dan geografi pensampelan juga diperlukan untuk tujuan pengesahan kod bar DNA tersebut (Vere et al. 2015). Oleh itu, selain pengenalpastian kepelbagaian genetik mtDNA, pencirian morfologi dan lokasi pensampelan juga perlu dititikberatkan dalam usaha untuk membangunkan kod bar DNA bagi spesies *Rafflesia*.

KESIMPULAN

Dalam kajian ini, perhimpunan jujukan mtDNA bagi setiap spesies *Rafflesia* telah berjaya dihasilkan. Analisis perhimpunan ini telah berjaya mencirikan kandungan gen dalam jujukan mtDNA spesies *Rafflesia* tersebut. Di samping itu, kajian ini telah berjaya mengesahkan bahawa jujukan mtDNA empat spesies *Rafflesia* tempatan yang dikaji mempunyai persamaan dan perbezaan antara satu sama lain melalui analisis penjajaran jujukan berganda. Hasil analisis perbandingan ini telah

mengenal pasti jujukan gen mitokondria yang khusus kepada spesies *Rafflesia* yang tertentu dan berpotensi untuk digunakan bagi membezakan spesies *Rafflesia* tempatan. Hasil kajian ini juga boleh diperkembangkan untuk diaplikasikan dalam spesies *Rafflesia* yang lain, termasuklah *Rafflesia* natif di kawasan geografi yang berbeza. Secara keseluruhannya, kajian ini telah menunjukkan bahawa perbandingan jujukan mtDNA berupaya memberikan pemahaman baharu tentang kepelbagaian genetik spesies *Rafflesia* serta menyediakan sumber untuk membangunkan strategi pengecaman dan pengelasan spesies yang lebih berkesan bagi organisma yang unik ini.

PENGHARGAAN

Kajian ini dibiayai melalui Geran Universiti Penyelidikan Universiti Kebangsaan Malaysia (GUP-2016-008).

RUJUKAN

- Adam, J.H., Juhari, M.A.A., Mohamed, R., Wahad, N.A.A., Arshad, S., Kamaruzaman, M.P., Mohd Raih, M.F. & Wan, K.L. 2016. *Rafflesia tuanku-halimii* n. (Rafflesiaceae), a new species from Peninsular Malaysia. *Sains Malaysiana* 45(11): 1589-1595.
- Adam, J.H., Mohamed, R., Juhari, M.A.A., Nik Ariff, N.N.F. & Wan, K.L. 2013. *Rafflesia sharifah-hapsahiae* (Rafflesiaceae), a new species from Peninsular Malaysia. *Turkish Journal of Botany* 37: 1038-1044.
- Adams, K.L. & Palmer, J.D. 2003. Evolution of mitochondrial gene content: Gene loss and transfer to the nucleus. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29(3): 380-395.
- Adams, K.L., Daley, D.O., Whelan, J. & Palmer, J.D. 2002a. Genes for two mitochondrial ribosomal proteins in flowering plants are derived from their chloroplast or cytosolic counterparts. *Plant Cell* 14(4): 931-943.
- Adams, K.L., Qiu, Y.L., Stoutemyer, M. & Palmer, J.D. 2002b. Punctuated evolution of mitochondrial gene content: High and variable rates of mitochondrial gene loss and transfer to the nucleus during angiosperm evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(15): 9905-9912.
- Alverson, A.J., Wei, X., Rice, D.W., Stern, D.B., Barry, K. & Palmer, J.D. 2010. Insights into the evolution of mitochondria genome size from complete sequences of *Citrullus lanatus* and *Cucurbita pepo* (cucurbitaceae). *Molecular Biology and Evolution* 27(6): 1436-1448.
- Amini, S., Rosli, K., Abu-Bakar, M.F., Alias, H., Mat-Isa, M.N., Juhari, M.A.A., Haji-Adam, J., Goh, H.H. & Wan, K.L. 2019. Transcriptome landscape of *Rafflesia cantleyi* floral buds reveals insights into the roles of transcription factors and phytohormones in flower development. *PLoS ONE* 14(12): e0226338.

- Amini, S., Alias, H., Aizat-Juhari, M.A., Mat-Isa, M.N., Adam, J.H., Goh, H.H. & Wan, K.L. 2017. RNA-seq data from different developmental stages of *Rafflesia cantleyi* floral buds. *Genomics Data* 14: 5-6.
- Barkman, T.J., Klooster, M.R., Gaddis, K.D., Franzone, B., Calhoun, S., Manickam, S., Vessabutr, S., Sasirat, S. & Davis, C.C. 2017. Reading between the vines: Hosts as islands for extreme holoparasitic plants. *American Journal of Botany* 104(9): 1382-1389.
- Barkman, T.J., Bendiksby, M., Lim, S.H., Salleh, K.M., Nais, J., Madulid, D. & Schumacher, T. 2008. Accelerated rates of floral evolution at the upper size limit for flowers. *Current Biology* 18(19): 1508-1513.
- Barkman, T.J., McNeal, J.R., Lim, S.H., Coat, G., Croom, H.B., Young, N.D. & dePamphilis, C.W. 2007. Mitochondrial DNA suggests at least 11 origins of parasitism in angiosperms and reveals genomic chimerism in parasitic plants. *BMC Evolutionary Biology* 7(1): 248-263.
- Barkman, T.J., Lim, S.H., Salleh, K.M. & Nais, J. 2004. Mitochondrial DNA sequences reveal the photosynthetic relatives of *Rafflesia*, the world's largest flower. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(3): 787-792.
- Bendiksby, M., Schumacher, T., Gussarova, G., Nais, J., Mat-Salleh, K., Soyanti, N., Madulid, D., Smith, S.A. & Barkman, T. 2010. Elucidating the evolutionary history of the southeast asian, holoparasitic, giant-flowered Rafflesiaceae: Pliocene vicariance, morphological convergence and character displacement. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57(2): 620-633.
- Benson, D.A., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J. & Sayers, E.W. 2015. GenBank. *Nucleic Acids Research* 43(D1): D30-35.
- Boetzer, M., Henkel, C.V., Jansen, H.J., Butler, D. & Pirovano, W. 2010. Scaffolding pre-assembled contigs using SSPACE. *Bioinformatics* 27(4): 578-579.
- Chang, S., Wang, Y., Lu, J., Gai, J., Li, J., Chu, P., Guan, R. & Zhao, T. 2013. The mitochondrial genome of soybean reveals complex genome structures and gene evolution at intercellular and phylogenetic levels. *PLoS ONE* 8(6): e56502.
- Chikhi, R. & Medvedev, P. 2014. Informed and automated *k*-mer size selection for genome assembly. *Bioinformatics* 30(1): 31-37.
- Choi, I.S., Schwarz, E.N., Ruhlman, T.A., Khyami, M.A., Sabir, J.S.M., Hajarrah, N.H., Sabir, M.J., Rabah, S.O. & Jansen, R.K. 2019. Fluctuations in fabaceae mitochondrial genome size and content are both ancient and recent. *BMC Plant Biology* 19: 448.
- Conant, G.C. & Wolfe, K.H. 2008. GenomeVx: Simple web-based creation of editable circular chromosome maps. *Bioinformatics* 24(6): 861-862.
- Cox, M.P., Peterson, D.A. & Biggs, P.J. 2010. SolexaQA: At-a-glance quality assessment of Illumina second-generation sequencing data. *BMC Genomics* 11: 485.
- Davis, C.C. & Wurdack, K.J. 2004. Host-to-parasite gene transfer in flowering plants: Phylogenetic evidence from Malpighiales. *Science* 305(5684): 676-678.
- Davis, C.C., Latvis, M., Nickrent, D.L., Wurdack, K.J. & Baum, D.A. 2007. Floral gigantism in Rafflesiaceae. *Science* 315(5820): 1812.
- Hidayati, S.N. & Walck, J.L. 2016. A review of the biology of *Rafflesia*: What do we know and what's next? *Buletin Kebun Raya* 19(2): 67-78.
- Hollingsworth, P.M., Graham, S.W. & Little, D.P. 2011. Choosing and using a plant DNA barcode. *PLoS ONE* 6(5): e19254.
- Huang, S., Shi, Y. & Chen, M. 2020. Mitochondrial genome sequencing and phylogenetic analysis of cynodon dactylon x cynodon transvaalensis. *Turkish Journal of Botany* 44(1): 14-24.
- Hunt, M., Newbold, C., Berriman, M. & Otto, T.D. 2014. A comprehensive evaluation of assembly scaffolding tools. *Genome Biology* 15(3): R42.
- Khan, A.R., Pervez, M.T., Babar, M.E., Naveed, N. & Shoaib, M. 2018. A comprehensive study of *de novo* genome assemblers: Current challenges and future prospective. *Evolutionary Bioinformatics Online* 14: 1-8.
- Langmead, B. & Salzberg, S.L. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* 9(4): 357-359.
- Lee, X.W., Mat-Isa, M.N., Mohd-Elias, N.A., Aizat-Juhari, M.A., Goh, H.H., Dear, P.H., Chow, K.S., Adam, J.H., Mohamed, R., Firdaus-Raih, M. & Wan, K.L. 2016. Perigone lobe transcriptome analysis provides insights into *Rafflesia cantleyi* flower development. *PLoS ONE* 11(12): e0167958.
- Lestari, D., Mahyuni, R. & Iryadi, R. 2020. *Rafflesia pricei* Meijer (Rafflesiaceae): A new locality in Borneo. *Berita Biologi* 19(2): 177-184.
- Mat-Salleh, K. 2007. *Magnificent Flower of Sabah: Rafflesia*. Malaysia: Natural History Publications (Borneo).
- Mat Yunoh, S.M. 2020. Notes on a ten-perigoned *Rafflesia azlanii* from the Royal Belum State Park, Perak, Peninsular Malaysia. *Malayan Nature Journal* 72(1): 11-17.
- Molina, J., Hazzouri, K.M., Nickrent, D., Geisler, M., Meyer, R.S., Pentony, M.M., Flowers, J.M., Pelsler, P., Barcelona, J., Inovejas, S.A., Uy, I., Yuan, W., Wilkins, O., Michel, C.I., Locklear, S., Concepcion, G.P. & Purugganan, M.D. 2014. Possible loss of the chloroplast genome in the parasitic flowering plant *Rafflesia lagascae* (Rafflesiaceae). *Molecular Biology and Evolution* 31(4): 793-803.
- Mollier, P., Hoffmann, B., Debast, C. & Small, L. 2002. The gene encoding *Arabidopsis thaliana* mitochondrial ribosomal protein S13 is a recent duplication of the gene encoding plastid S13. *Current Genetics* 40(6): 405-409.
- Nais, J. 2001. *Rafflesia of the World*. Malaysia: Natural History Publications (Borneo).
- Ng, S.M., Lee, X.W., Mat-Isa, M.N., Aizat-Juhari, M.A., Adam, J.H., Mohamed, R., Wan, K.L. & Firdaus-Raih, M. 2018. Comparative analysis of nucleus-encoded plastid-targeting proteins in *Rafflesia cantleyi* against photosynthetic and non-

- photosynthetic representatives reveals orthologous systems with potentially divergent functions. *Scientific Reports* 8: 17258.
- Nickrent, D.L., Blarer, A., Qiu, Y.L., Vidal-Russell, R. & Anderson, F.E. 2004. Phylogenetic inference in *Rafflesiales*: The influence of rate heterogeneity and horizontal gene transfer. *BMC Evolutionary Biology* 4(40): 40-56.
- Nikolov, L.A., Endress, P.K., Sugumaran, M., Sasirat, S., Vessabutr, S., Kramer, E.M. & Davis, C.C. 2013. Developmental origins of the world's largest flower, *Rafflesiaceae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(46): 18578-18583.
- Palmer, J.D., Adams, K.L., Cho, Y.R., Parkinson, C.L., Qiu, Y.L. & Song, K.M. 2000. Dynamic evolution of plant mitochondrial genomes: Mobile genes and introns and highly variable mutation rates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(13): 6960-6966.
- Pelster, P.B., Nickrent, N.L., van Ee, B.W. & Barcelona, J.F. 2019. A phylogenetics and biogeographic study of *Rafflesia* (*Rafflesiaceae*) in the Philippines: Limited dispersal and high island endemism. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 139: 106555.
- Pichersky, E. & Gerats, T. 2011. The plant genome: An evolutionary perspective on structure and function. *The Plant Journal* 66: 1-3.
- Rambaut, A. 2009. *FigTree v1.2.2* ed. 19. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>. Assessed on 25 Nov 2018.
- Shedge, V., Davila, J., Arrieta-Montiel, M.P., Mohammed, S. & Mackenzie, S.A. 2010. Extensive rearrangement of the *Arabidopsis* mitochondrial genome elicits cellular conditions for thermotolerance. *Plant Physiology* 152(4): 1960-1970.
- Sievers, F. & Higgins, D.G. 2018. Clustal omega for making accurate alignments of many protrain sequences. *Protein Science* 27(1): 135-145.
- Simpson, J.T. 2014. Exploring genome characteristics and sequence quality without a reference. *Bioinformatics* 30(9): 1228-1235.
- Simpson, J.T., Wong, K., Jackman, S.D., Schein, J.E., Jones, S.J.M. & Birol, I. 2009. ABySS: A parallel assembler for short read sequence data. *Genome Research* 19(6): 1117-1123.
- Sloan, D.B., Alverson, A.J., Chuckalovcak, J.P., Wu, M., McCauley, D.E., Palmer, J.D. & Taylor, D.R. 2012. Rapid evolution of enormous, multichromosomal genomes in flowering plant mitochondria with exceptionally high mutation rates. *PLoS Biology* 10(1): e1001241.
- Sofiyanti, N. & Choong, C.Y. 2012. Morphology of ovule, seed and pollen grain of *Rafflesia* r. br (*Rafflesiaceae*). *Bangladesh Journal of Plant Taxonomy* 19(2): 109-117.
- Sofiyanti, N., Mat-Salleh, K., Mahmud, K., Mazlan, N.Z., Hasein, M.R.A. & Burslem, D.F.R.P. 2016. *Rafflesia parvimaculata* (*Rafflesiaceae*), a new species of *Rafflesia* from Peninsular Malaysia. *Phytotaxa* 253(3): 207-213.
- Stamatakis, A. 2014. RAXML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30(9): 1312-1313.
- Surveswaran, S., Gowda, V. & Sun, M. 2018. Using an integrated approach to identify cryptic species, a divergence patterns and hybrids species in asian ladies' tresses orchids (*spiranthes*, *orchidaceae*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 124: 106-121.
- Tolod, J.R., Galindon, J.M.M., Atienza, R.R., Duya, M.V., Fernando, E.S. & Ong, P.S. 2020. Flower and fruit development and life history of *Rafflesia consueloae* (*Rafflesiaceae*). *Philippine Journal of Science* 150(S1): 321-334.
- Van de Paer, C., Bouchez, O. & Besnard, G. 2018. Prospects on the evolutionary mitogenomics of plants: A case study on the olive family (*oleaceae*). *Molecular Ecology Resources* 18(3): 407-423.
- Vere, N.D., Rich, T.C.G., Trinder, S.A. & Long, C. 2015. DNA barcoding for plants. *Methods in Molecular Biology* 1245: 101-118.
- Wicaksono, A., Mursidawati, S., Sukamto, L.A. & Silva, J.A.T.A. 2016. *Rafflesia* spp.: Propagation and conservation. *Planta* 244(2): 289-296.
- Wurdack, K.J. & Davis, C.C. 2009. Malpighiales phylogenetics: Gaining ground on one of the most recalcitrant clades in the angiosperm tree of life. *American Journal of Botany* 96(8): 1551-1570.
- Wynn, E.L. & Christensen, A.C. 2019. Repeats of unusual size in plant mitochondrial genomes: Identification, incidence and evolution. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 9(2): 549-559.
- Xi, Z.X., Wang, Y.G., Bradley, R.K., Sugumaran, M., Marx, C.J., Rest, J.S. & Davis, C.C. 2013. Massive mitochondrial gene transfer in a parasitic flowering plant clade. *PLoS Genetics* 9(2): e1003265.
- Yamauchi, A. 2005. Rate of gene transfer from mitochondria to nucleus: Effects of cytoplasmic inheritance system and intensity of intracellular competition. *Genetics* 171(3): 1387-1396.
- Zerbino, D.R. 2010. Using the Velvet *de novo* assembler for short-read sequencing technologies. *Current Protocols in Bioinformatics* 31: 1-12.
- Qiong Chin, Mohd-Noor Mat-Isa & Kiew-Lian Wan*
 Jabatan Sains Biologi dan Bioteknologi
 Fakulti Sains dan Teknologi
 Universiti Kebangsaan Malaysia
 43600 UKM Bangi, Selangor Darul Ehsan
 Malaysia
- Mohd-Noor Mat-Isa & Mohd-Faizal Abu-Bakar
 Malaysia Genome Institute
 Jalan Bangi
 43000 Kajang, Selangor Darul Ehsan
 Malaysia

Norfarhan Mohd-Assaad
Jabatan Fizik Gunaan
Fakulti Sains dan Teknologi
Universiti Kebangsaan Malaysia
43600 UKM Bangi, Selangor Darul Ehsan
Malaysia

*Pengarang untuk surat-menyurat; email: klwan@ukm.edu.my

Diserahkan: 8 Februari 2021

Diterima: 25 Mei 2021