

## ABSTRACT

### GENETIC VARIABILITY STUDIES IN A SELECTED POPULATION OF *AZADIRACHTA EXCELSA* (SENTANG) WITH AFLP MARKER TECHNOLOGY

A maternal half-sib population of *Azadirachta excelsa* was established from seeds in a randomised complete block design with three replicates. 100 to 200 seeds were collected from each of the 13 selected mother trees. The mother trees were categorised into three groups *i.e.* large, medium and small according to their girth sizes. 50 progeny seedlings from each seedlot per replicate were planted in the experimental field. Genetic studies on phenotypic measurements and molecular marker analysis were carried out on the established *A. excelsa* population.

Measurements of quantitative traits including diameter breast height (Dbh) and total height were made. Mean Dbh of mother trees according to each category are highly correlated ( $r^2 = 0.99$ ) to mean Dbh of progeny trees from each respective category. Since Dbh is highly correlated to tree volume ( $r^2 = 0.96$ ), it can be taken as indicator for tree growth. The results based on phenotypic measurements of two and a half years old *A. excelsa* trees implicate that large trees (with high mean Dbh) tend to produce overall large size progeny trees. The estimated value of heritability for tree volume is 0.05 whilst for total height and Dbh, it is 0.06 and 0.09 respectively.

Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) marker system was used to analyse DNA samples extracted from leaves of *A. excelsa* trees in the population. A total of 64 primer-pair combinations were tested. Twelve primer-pairs that produce the highest number of clear and reproducible polymorphic bands were selected. An average of 40 scorable amplified fragments can be obtained from each primer-pair combination. These primer-pairs were used for molecular marker analysis.

A dendrogram that shows the relationship among various mother trees was constructed. The dendrogram provides a guide for selecting parental trees to carry out hybridization. For example, a cross between A1 and A2 mother trees is not advisable because they are closely related.

The mating system of the *A. excelsa* population was investigated using twenty-seven AFLP loci with the primer-pair combination EcoR I + AGG and Mse I + CAG. A multilocus mixed mating model was used to evaluate the mating system. The population was predominantly outcrossed ( $t_m = 0.810 \pm 0.086$ ) with no significant biparental mating ( $t_m - t_s = 0.125$ ,  $SE = 0.033$ ).

A strategy was developed to find markers linked to phenotypic traits under study. The strategy is a combination of Pseudotest cross and Bulk Segregant Analysis. It capitalised on the capability of AFLP marker system to produce a relatively large number of polymorphic bands per assay. By screening the mother trees population, the markers that occur very rarely in the population are assumed to be heterozygous. These markers were used to screen a small random sample of progeny trees from a selected seedlot. Rare occurrence of these markers indicates that the paternal parent could be homozygous null thus a test cross mating configuration is established. These selected segregating markers were then used to screen progeny trees with extreme phenotypic traits under study to increase the homozygous level of the trait. By applying this strategy, a putative marker at 75.5 bp was found to link to Dbh using E-AAC and M-CTC primer-pairs in B2 progeny trees. The marker was found to link to progeny trees with large Dbh. Using the same primer-pair combination, putative marker at 74 bp was found in trees with no forking characteristic. However, when a larger number of progeny samples were tested, the marker-trait linkage association disappeared. This could be caused by linkage equilibrium *i.e.* recombination occurs between the loci for the marker and gene coded for the trait because they are located far apart in the genome.

An *in vitro* micropropagation protocol for the production of *A. excelsa* plantlets has been established. Shoot tips cultured in MS medium supplemented with  $1 \text{ mgL}^{-1}$  BAP produced the highest number of shoots. Shoots were successfully induced from leaf cuttings. Leaf cuttings cultured on MS medium supplemented with  $2 \text{ mgL}^{-1}$  BAP,  $1.2 \text{ mgL}^{-1}$  kinetin and  $6 \text{ mgL}^{-1}$  adenine sulphate produced an average of 5 primordial shoots per leaf cutting. 25 % of these primordial shoots formed shoots with true leaves when cultured on MS medium supplemented with  $1 \text{ mgL}^{-1}$  BAP and  $12.5 \text{ mgL}^{-1}$  magnesium sulphate. 100 % of these shoots formed roots when they are transferred to medium supplemented with  $10 \text{ mgL}^{-1}$  NAA.

## ABSTRAK

### KAJIAN KEPELBAGAIAN GENETIK DALAM POPULASI TERPILIH *AZADIRACHTA EXCELSA* (SENTANG) MENGGUNAKAN TEKNOLOGI PENANDA AFLP

Sebuah populasi induk ibu separuh-sib *Azadirachta excelsa* telah ditubuhkan daripada biji benih dalam bentuk blok penuh rawak dengan tiga replikasi. 100 hingga 200 biji benih telah dipungut daripada setiap 13 pokok yang dipilih. Induk ibu dikategorikan kepada 3 kumpulan iaitu besar, sederhana dan kecil bergantung kepada saiz ukur lilit. 50 anak benih progeni daripada setiap lot biji benih bagi setiap replikasi telah ditanam dalam plot ujikaji. Kajian genetik bagi analisa fenotip dan penanda molekular telah dijalankan ke atas populasi *A. excelsa* yang ditubuhkan.

Pengukuran trait kuantitatif termasuk ukuran diameter aras dada (Dbh) dan jumlah ketinggian telah dilakukan. Min Dbh induk ibu berdasarkan kepada setiap kategori adalah berkait rapat ( $r^2=0.99$ ) dengan min Dbh pokok progeni daripada setiap kategori masing-masing. Oleh kerana Dbh berkait rapat dengan isipadu pokok ( $r^2=0.96$ ), ia boleh digunakan sebagai penunjuk tumbesaran pokok. Hasil kajian melalui pengiraan fenotip keatas pokok *A. excelsa* berusia dua setengah tahun menunjukkan bahawa pokok besar (dengan min Dbh yang tinggi) cenderung kepada penghasilan progeni yang mempunyai keseluruhan saiz yang besar. Nilai anggaran kebolehan mewaris untuk isipadu pokok ialah 0.05 sementara untuk jumlah ketinggian dan Dbh ialah masing-masing 0.06 dan 0.09.

Sistem penanda "Amplified fragment Length Polymorphism" (AFLP) telah digunakan untuk menganalisa sampel DNA yang diekstrak daripada daun pokok *A. excelsa* daripada populasi ini. Sejumlah 64 kombinasi primer telah diuji. Dua belas pasang primer yang menghasilkan jumlah tertinggi jalur polimorfik yang terang telah dipilih. Purata sebanyak 40 fragmen amplifikasi yang boleh diskor dan diamplifikasi-ulang boleh didapati daripada setiap kombinasi primer. Primer-primer ini telah digunakan untuk analisa penanda molekular.

Satu dendrogram yang menunjukkan hubungan antara pokok ibu telah dibina. Dendrogram ini memberikan petunjuk bagi memilih pokok induk untuk menjalankan kajian hibridisasi. Sebagai contoh kacukan antara pokok ibu A1 dan pokok ibu A2 tidak digalakkan kerana kerapatan hubungan mereka.

Kajian ke atas sistem pengawanan populasi *A. excelsa* telah dilakukan menggunakan dua puluh tujuh loci AFLP dengan kombinasi pasangan primer. *EcoRI* + AGC dan *MseI* + CAG. Model pengawanan bercampur multilokus telah digunakan untuk menilai sistem pengawanan. Kebanyakan dari populasi telah berkacuk luar ( $t_m = 0.810 + 0.086$ ) tanpa percantuman dwi induk yang ketara (signifikan).

Satu strategi telah direka untuk mencari penanda yang berkait dengan trait fenotip yang dikaji. Strateginya adalah kombinasi kacukan "Pseudotest" dan "Analisa Bulk Segregant". Ia bergantung kepada kebolehan sistem penanda AFLP untuk menghasilkan jumlah jalur polimorfik per esei yang agak tinggi. Dengan menyaring populasi pokok ibu, penanda yang berlaku pada kadar yang rendah dalam populasi disifatkan sebagai heterozigos. Penanda ini telah digunakan untuk menyaring secara rawak sebahagian kecil sampel pokok progeneri daripada lot biji benih terpilih. Kemunculan sekali sekala penanda ini menunjukkan kemungkinan induk bapa adalah 'homozygous null' dan dengan itu satu ujian konfigurasi kawanan silang (test cross mating configuration) telah dibuat. Penanda - penanda yang terpilih ini seterusnya digunakan untuk menyaring pokok progeneri dengan trait fenotipik ekstrem dibawah kajian untuk meningkatkan kadar trait homozigos. Dengan strategi ini, penanda putatif bersaiz 75.5 bp telah didapati untuk menyambung kepada Dbh menggunakan primer-pasang E-AAC dan M-CTC dalam progeneri B2. Penanda ini didapati berkait dengan pokok progeneri yang mempunyai Dbh besar. Dengan menggunakan kombinasi primer-pasang, penanda putatif bersaiz 74 bp telah ditemui pada pokok dengan sifat bercabang. Bagaimanapun, apabila jumlah besar sampel progeneri yang lebih besar di analisa, gabungan perkaitan penanda-trait di dapati hilang. Ini mungkin disebabkan oleh keseimbangan (equilibrium) perkaitan seperti rekombinasi telah berlaku diantara loci untuk penanda dan gen yang mengkodkan trait, oleh kerana kedudukan antara mereka yang jauh didalam genom.

Kaedah micropropagasi *in vitro* untuk menghasilkan plantlet *A. excelsa* telah ditentukan. Hujung pucuk yang dikulturkan didalam media MS yang ditambah dengan 1mg/L BAP, menghasilkan jumlah tertinggi pucuk. Pucuk juga berjaya diaruh daripada eksplan daun. Keratan daun di kulturkan atas media MS yang ditambah 2 mg/L BAP, 1.2 mg/L knetin dan 6mg/L adenin sulfat telah menghasilkan purata 5 pucuk primodia bagi setiap keratan. 25% daripada pucuk primodia ini membentuk pucuk dengan daun sebenar apabila di kulturkan di atas medium MS dengan 1mg/L BAP dan 12.5 mg/L magnesium sulfat 100% pucuk ini membentuk akar apabila dipindahkan ke media mengandungi 10 mg/L NAA.