

PEMETAAN AWAL PAUTAN MARKA RAPD PADA POHON ELIT KELAPA SAWIT TENERA

Indra E. Setiyo, Sudarsono¹, dan Dwi Asmono

ABSTRAK

Penelitian dilakukan dengan tujuan untuk membangun peta pautan antar marka RAPD pada individu elit kelapa sawit tenera dengan strategi pseudo-testcross. Bahan tanaman yang digunakan adalah 70 progeni kelapa sawit hasil persilangan BO 2499 D x BO 903 T dan kedua tetuanya. Sejumlah 169 primer (oligonukleotida 10 basa) ditapis di kedua tetua, 19 primer di antaranya digunakan untuk genotyping pada populasi pemetaan. Hasil menunjukkan bahwa 19 primer acak mampu menghasilkan 24 lokus marka RAPD yang digunakan untuk menentukan genotipe pada populasi pemetaan. Di antara 24 lokus ditemukan 8 lokus yang tidak mengikuti nisbah segregasi mendelian 1:1. Dua lokus terdistorsi yang diamplifikasi dari dua primer sangat mungkin diekspresikan dari lokus homosigus pada individu tetua. Penggunaan marka-marka yang demikian bisa menimbulkan pautan genetik semu. Analisis pautan dengan skor logaritma odds (LOD) minimum 3,0 dan laju rekombinasi (θ) maksimum 0,25 menghasilkan tiga kelompok pautan genetik yang terdiri atas 9 marka dan mencakup jarak peta 113,8 cM. Pada percobaan ini, 13 lokus belum dapat dipautkan ke dalam kelompok pautan yang ada. Studi lebih lanjut guna mengenali lebih banyak marka diperlukan untuk menghasilkan kelompok pautan yang sama dengan jumlah haploid kromosom kelapa sawit. Kelompok pautan ini nantinya digunakan untuk menentukan marka-marka yang terpaut erat dengan sifat-sifat komersial seperti ketebalan cangkang buah kelapa sawit.

Kata kunci: *Elaeis guineensis*, marka RAPD, peta pautan genetik, pseudo-testcross

PENDAHULUAN

Program pemuliaan kelapa sawit menggunakan metode seleksi berulang timbal balik (RRS) telah terbukti berhasil melalui perolehan kemajuan genetik per siklus sebesar 12-15% (15). Pada kondisi ini, efisiensi program seleksi per unit waktu tergolong rendah karena untuk menyelesaikan satu siklus tanaman paling tidak diperlukan waktu pengamatan 7-10 tahun. Perbaikan sifat tanaman yang lebih bertumpu pada penampilan fenotipik atau uji keturunan sehingga memerlukan pendataan pedigree yang teliti pada ratusan hektar lahan menimbulkan biaya yang tinggi. Selain itu, program pemuliaan juga menghadapi beberapa kendala klasik seperti

langkanya informasi genetik pada populasi dasar dan sifat biologis tanaman yang kompleks dan menyerbuk bebas (*outbred*).

Penggabungan teknologi marka molekuler ke dalam seleksi, atau disebut seleksi berbantuan marka (MAS), diketahui memiliki keunggulan komparatif untuk memperpendek siklus seleksi pada tanaman (1, 7). Salah satu prasyarat untuk menerapkan MAS adalah ketersediaan peta pautan genetik dan peta lokus-lokus sifat kuantitatif (QTL) yang akan diperbaiki (9).

Pada mulanya pemetaan genom pada tanaman menyerbuk bebas seperti kelapa sawit sulit dilakukan karena faktor keseimbangan genetik yang maksimum pada populasi tersebut. Namun demikian Grattapaglia dan Sederoff (2) menunjukkan bahwa

pemetaan genetik berbasis individu (bukan populasi) tanaman melalui strategi *pseudo-testcross* dua arah dapat membuka peluang bagi pemetaan genom tanaman menyerbuk bebas. Menurut Ribaut dan Hoisington (17) kontribusi marka molekuler DNA untuk perbaikan sifat poligenik dalam usaha pemuliaan tampak cerah di masa depan.

Teknologi marka molekuler yang dikenal sangat efisien untuk pemetaan genetik adalah teknologi yang berbasis pada reaksi polimerisasi berantai (PCR). Teknologi berbasis PCR yang pertama kali dikembangkan dan banyak digunakan untuk studi genetika tanaman adalah teknik *random amplified polymorphic DNA* (RAPD) (22). Teknik ini memiliki keunggulan atas teknik yang berbasis hibridisasi DNA (RFLP) dalam hal kecepatan dan kesederhanaan prosedurnya. Teknik RAPD tidak memerlukan informasi sekuens dari pustaka pelacak spesifik terlebih dahulu maupun pendeteksian radioisotop. Marka RAPD biasanya berperilaku sebagai marka genetik dominan.

Penelitian ini bertujuan membentuk peta pautan genetik pada pohon elit kelapa sawit tipe tenera menggunakan teknik RAPD dengan cara mempelajari pola pewarisan dan segregasi lokus individu marka DNA, mendeteksi pautan antar lokus dengan menduga frekuensi rekombinasi dan jarak genetik antara lokus, merakit lokus ke dalam kelompok pautan dan memperkirakan urutan linier lokus di dalam kelompok pautan.

BAHAN DAN METODE

Populasi pemetaan

Bahan tanaman yang digunakan untuk penelitian adalah satu individu tetua ibu dari *E. guineensis* tipe dura, BO 2499 D,

turunan PA 131 D, satu tetua bapak dari tenera, BO 903 T, yang berasal dari pohon elit SP 540 T dan 70 individu keturunan hasil persilangan kedua tetua tersebut (BO 2499 D x BO 903 T). Ke-70 progeni merupakan salah satu dari 25 persilangan pada percobaan RRS II (BJ 28 S) yang ditanam pada 1992 di Kebun Bah Jambi, Sumatera Utara.

Isolasi DNA dan analisis RAPD

Analisis RAPD dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler Pusat Penelitian Kelapa Sawit (PPKS) Medan dan Unit Penelitian Bioteknologi Perkebunan (UPBP) Bogor. Contoh daun untuk isolasi DNA genom diambil dari pohon pengujian di kebun Bah Jambi, PT. Perkebunan Nusantara IV, Pematang Siantar.

DNA genomik total diisolasi dari contoh jaringan pelepah daun tombak atau daun pertama. Pada lokasi pengambilan yang jauh, contoh dikemas di dalam botol plastik yang berisi larutan bufer ekstraksi (20). Prosedur isolasi DNA genomik diadopsi dari metode CTAB oleh Orozco-Castillo *et al.* (14) dengan beberapa modifikasi (13,19). Kualitas dan kuantitas DNA genom ditetapkan dengan dua cara yaitu, (i) analisis uv-spektrofotometer dan (ii) elektroforesis gel agarose (18).

Protokol reaksi amplifikasi diadaptasi dari karya William *et al.* (22) dengan volume akhir reaksi 25 µl. Reaksi amplifikasi dimulai dengan kondisi pra-PCR selama 1 menit hingga 94°C, dilanjutkan dengan 45 siklus termal yang masing-masing terdiri atas tiga tahap, yaitu (i) denaturasi 94°C selama 1 menit, (ii) penempelan primer 36°C selama 1 menit dan (iii) pemanjangan primer 72°C selama 2 menit. Reaksi diakhiri dengan kondisi pasca-PCR selama 4 menit pada 72°C. Konsistensi profil pita

DNA dinilai berdasarkan hasil pita DNA antara tahap skrining primer dan penggenotipannya pada populasi pemetaan. Pada kondisi khusus, beberapa primer yang menunjukkan intensitas lokus yang rendah dilakukan pengulangan reaksi lebih intensif.

DNA genom hasil amplifikasi dipisahkan di dalam tangki elektroforesis gel agarose model horisontal dengan larutan penyangga TAE 1x. Pada pengujian DNA digunakan gel agar 0,8 % sedang pada DNA hasil amplifikasi (RAPD) gel agar 1,4 %. Elektroforesis dijalankan pada 50 V selama 85 menit atau 3 V/cm. Pewarnaan gel dikerjakan dengan larutan etidium bromida 5 µg/l selama 30 menit. Pencucian gel dengan aquades dilakukan selama 10 menit. Pita DNA divisualisasikan di atas uv-transiluminator (312 nm) dan didokumentasi dengan kamera yang menggunakan film T667. Penskoran pita DNA hasil amplifikasi dilakukan dari hasil fotografi.

Penskoran dan analisis segregasi

Sembilan belas primer (oligonukleotida 10-basa) telah diuji, 96 di antaranya menunjukkan polimorfisme pada tetua. Sembilan belas primer di antara primer yang informatif tersebut digunakan untuk menggenotip populasi pemetaan. Menurut konfigurasi pseudo-testcross, marka-marka yang tidak muncul pada tetua dura dan muncul pada tetua tenera diharapkan bersegregasi dengan nisbah 1 (muncul) : 1 (tidak muncul) pada progeni F₁-nya. Ukuran fragmen diduga dengan 1 kb DNA ladder. Hipotesis segregasi 1:1 dari seluruh marka RAPD diuji menggunakan metode uji chi-kuadrat (χ^2). Dalam populasi pemetaan juga diamati segregasi lokus sifat ketebalan cangkang buah.

Konstruksi Peta Pautan

Marka-marka yang bersegregasi (menurut uji χ^2) pada populasi pemetaan digunakan dalam analisis pautan genetik. Analisis dikerjakan dengan bantuan program komputer MAPMAKER/EXP3.0 dari model silang balik (8). Dalam program tersebut dimungkinkan untuk menghitung frekuensi rekombinasi (θ) dan mengubahnya menjadi jarak peta dalam centimorgan berdasarkan fungsi pemetaan Haldane (3). Keterpautan dua lokus diputuskan pada nilai LOD lebih tinggi dari 3,0 dengan θ maksimum 0,25. Urutan lokus terbaik dari masing-masing kelompok ditentukan berdasarkan *log-likelihood* yang maksimum dari beberapa urutan yang mungkin.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi DNA dan Analisis RAPD

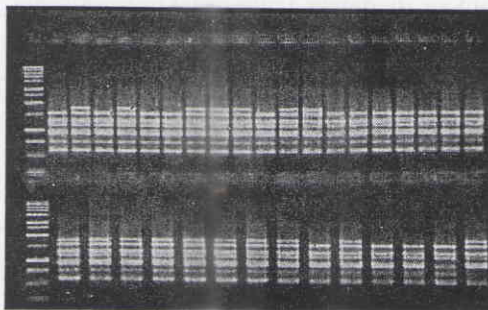
Untuk reaksi amplifikasi DNA pada teknik RAPD mutlak diperlukan stok DNA yang berkualitas tinggi dalam kuantitas yang tertentu. Hal ini diperoleh melalui pengerjaan prosedur isolasi DNA yang optimal dan diikuti oleh prosedur pengujian baku. Hasil pengujian spektrofotometer terhadap DNA hasil isolasi menunjukkan tingkat kemurnian DNA yang tinggi dengan rata-rata $1,928 \pm 0,032$ pada selang antara 1,64 dan 2,38. Pada kondisi ini diperoleh konsentrasi DNA rata-rata $216,2 \pm 17,9$ µg/ml dengan selang 111 hingga 468 µg/ml.

Sementara itu, pengujian elektroforesis gel agarose terhadap contoh stok DNA menampilkan pita-pita DNA yang cukup solid dan tebal. Artinya DNA yang diperoleh dalam keadaan utuh tidak terpotong dan dalam kuantitas yang cukup tinggi. Pengujian dengan penambahan

EcoRI mampu menghasilkan pola DNA yang *smear*. Kondisi yang demikian menunjukkan DNA yang mudah terpotong. Dari rangkaian pengujian baku ini dapat dinyatakan bahwa hasil isolasi DNA bisa menjamin terjadinya reaksi PCR yang baik.

Secara umum analisis RAPD menunjukkan pola pita fragmen DNA yang baik berdasarkan tingginya konsistensi profil pita DNA antara tahap skrining primer dan penggenotipan populasi pemetaan (Gambar 1). Banyak faktor yang mempengaruhi keberhasilan dan *reproducibility* profil RAPD, antara lain kondisi dan konsentrasi DNA, ko-ekstraksi pengkontaminasi DNA dan interferensi amplifikasi (21). Tahap skrining primer memungkinkan untuk memilih secara cepat primer-primernya yang menghasilkan marka polimorfik (nisbah multipleks) yang lebih tinggi. Dari 19 primer pilihan yang digunakan dalam penelitian

ini dihasilkan 112 pita tampak (Tabel 1) atau rata-rata $5,9 \pm 1,0$ pita per primer. Banyaknya pita DNA yang dihasilkan oleh setiap primer bergantung pada sebaran situs yang homolog dengan sekuens primer pada genom. Pada tanaman kelapa ditunjukkan angka rata-rata delapan pita tampak per primer (4).



Gambar 1. Profil pita RAPD menggunakan primer OPM-04 pada populasi pemetaan

Tabel 1. Ekspresi fragmen RAPD pada tiap-tiap jenis primer acak

No	Jenis primer	Susunan oligonukleotida 5' → 3'	Jumlah lokus tampak	Jumlah lokus polimorfik	Fragmen muncul pada tetua (D-T)
1	OPB-07	GGTGACGCAG	10	2	1-1
2	OPC-02	GTGAGGCGTC	6	2	1-1
3	OPC-07	GTCCCGACGA	9	2	1-1
4	OPD-03	GTCGCCGTCA	10	4	2-2
5	OPD-05	TGAGCGGACA	5	2	0-2
6	OPD-16	AGGGCGTAAG	7	5	3-2
7	OPM-04	GGCGGTTGTC	7	1	0-1
8	OPM-20	AGGTCTTGGG	6	3	1-2
9	OPN-03	GGTACTCCCC	4	2	1-1
10	OPN-09	TGCCGGCTTG	4	2	0-2
11	OPN-10	ACAAGTGGGG	5	2	1-1
12	OPN-12	CACAGACACC	4	2	1-1
13	OPN-20	GGTGCTCCGT	8	1	0-1
14	OPO-06	CCACGGGAAG	4	1	0-1
15	OPO-11	GACAGGAGGT	6	1	0-1
16	OPO-13	GTCAGAGTCC	5	1	0-1
17	OPO-16	TCGGCGGTTC	4	2	1-1
18	OPO-19	GGTGACGTT	4	2	1-1
19	OPO-20	ACACACGCTG	4	2	1-1
Total			112	39	15-24

Penskoringan dan analisis segregasi lokus

Dari keseluruhan pita tampak hasil amplifikasi 19 primer pilihan ditemukan 39 lokus DNA (35 %) yang polimorfik, sedang sisanya (65%) termasuk dalam kategori lokus monomorfik. Lokus DNA polimorfik terbagi ke dalam dua kelompok marka: (i) yang muncul pada tetua dura dan tidak muncul pada tetua tenera (15 lokus) dan (ii) yang tidak muncul pada tetua dura tetapi muncul pada tenera (24 marka) (Tabel 1). Beberapa penelitian menunjukkan polimorfisme pita per primer 56-69 % (4, 16). Perbedaan ini dimungkinkan karena jumlah dan jenis primer serta populasi yang digunakan.

Banyaknya marka informatif per primer pilihan menjadi ukuran efisiensi pemetaan dari strategi *pseudo-testcross*. Dalam penelitian ini, yang disusun dari persilangan intraspesifik antara individu yang sangat heterosigot dan secara genetik berbeda origin, diperoleh efisiensi pemetaan yang cukup tinggi (rata-rata 2,05 marka/primer). Grattapaglia dan Sederoff (2) yang menggunakan persilangan interspesifik mendapatkan efisiensi 3,69 marka/primer pilihan. Mereka memperkirakan bahwa efisiensi pemetaan dengan persilangan intraspesifik akan mencapai antara 60 dan 70% dari angka tersebut.

Lokus yang polimorfik pada tetua tenera selanjutnya digunakan untuk menggenotipe populasi pemetaan. Lokus tersebut berukuran antara 315 dan 2000 bp dengan rata-rata 988 ± 182 bp. Intensitas pita RAPD bervariasi dari rendah (OPO-16) hingga tinggi (OPO-20). Banyaknya situs penempelan primer terutama jika terletak pada sekuens DNA berulang di dalam genom bisa menjadi salah satu penyebab semakin banyak fragmen yang diamplifikasi dalam genom, yang kemu-

dian terlihat berupa semakin tajamnya intensitas pita yang dihasilkan.

Hasil analisis segregasi dan pengujian khi-kuadrat terhadap 25 lokus pada populasi progeni menunjukkan bahwa 17 dari 25 lokus polimorfik bersegregasi pada nisbah 1:1 pada taraf uji $\alpha=0,05$ dan 16 lokus diantaranya nyata pada taraf uji $\alpha=0,01$. Terdapat 8 lokus (32 %) yang nyata menyimpang dari kaidah mendelian 1:1 (Tabel 2). Penyimpangan (distorsi) ini dapat mempunyai basis biologis (misalnya letal) atau hanya akibat dari kecilnya ukuran contoh individu yang digenotipe. Angka distorsi yang diperoleh dalam penelitian ini relatif lebih tinggi dari yang dilaporkan sebelumnya yaitu sebesar 14,8% dari 121 marka polimorfisme (12). Di antara lokus yang menyimpang ditemukan paling tidak dua lokus, yang dihasilkan oleh dua primer, menunjukkan kemunculan penuh pada progeni yang diuji. Pola kemunculan seperti ini dimungkinkan karena lokus pada tetua tenera bergenotipe homosigot dominan. Persilangan tetua homosigot dominan dengan tetua homosigot resesif (dura) akan menghasilkan progeni yang homogen dengan genotipe heterosigot.

Konstruksi Peta Pautan Genetik

Berdasarkan jumlah kemungkinan pasangan lokus antar marka yang dianalisis, ditemukan 30 pasang lokus yang dapat diperkirakan jarak genetiknya (Lampiran 1). Diketahui terdapat lokus yang sama sekali belum bisa diduga jarak antar lokus yaitu B07_1116, C02_500 dan N12_1300. Jarak genetik antar lokus rata-rata $52,8 \pm 8,3$ cM. Jarak genetik terpendek ditemukan antara lokus M20_1450 dan O19_315 dengan LOD 14,57. Sementara itu jarak terpanjang dijumpai antara lokus O16_2000 dan D16_749 pada LOD 0,57.

Tabel 2. Analisis segregasi 24 lokus RAPD dan satu lokus sifat ketebalan cangkang buah

No	Lokus	Harapan Muncul	Harapan Absen	Muncul	Absen	χ^2
1	B07_1116	35	35	30	40	1,43 **
2	C02_500	33	33	33	33	0,00 **
3	C07_561	35	35	59	11	32,91
4	D03_405	35	35	31	39	0,91 **
5	D03_617	35	35	31	39	0,91 **
6	D05_1000	33	33	29	37	0,97 **
7	D05_1500	33	33	36	30	0,55 **
8	D16_530	35	35	47	23	8,23
9	D16_749	35	35	43	27	3,66 **
10	M04_1750	33	33	35	31	0,24**
11	M20_1000	33	33	65	1	62,06
12	M20_1450	33	33	65	1	62,06
13	N03_750	33	33	66	0	66,00
14	N09_735	33	33	55	11	29,33
15	N09_857	33	33	28	38	1,52 **
16	N10_1369	33	33	43	23	6,06 *
17	N12_1300	32	32	33	31	0,06 **
18	N20_1000	33	33	40	26	2,97 **
19	O06_812	33	33	66	0	66,00
20	O11_800	33	33	37	29	0,97 **
21	O13_1100	33	33	31	35	0,24 **
22	O16_2000	33	32	28	37	1,54 **
23	O19_315	33	33	64	2	58,24
24	O20_1500	33	33	38	28	1,52**
25	Sh	35	35	35	35	0,00**

*, ** berturut-turut nyata pada taraf 0,05 dan 0,01

Dari analisis jarak peta tersebut ditunjukkan bahwa antara lokus sifat ketebalan cangkang buah (*Sh*) dan lokus D03_617 berjarak 67,9 cM (atau $\theta=0,37$) pada LOD 1,02. Menurut kriteria pemetaan yang umum ($\text{LOD} > 3,0$ dan $\theta < 0,25$) kedua lokus tersebut tidak terpetakan pada satu kromosom. Sementara itu, berdasarkan analisis asosiasi ditunjukkan bahwa antara fenotipe lokus D03_617 dan penampilan alel ketebalan cangkang diperoleh tingkat kesesuaian sebesar 63 %. Artinya, dari 70 individu progeni yang disekor, marka D03_617 mampu menentukan dengan benar tipe pohon dura sebanyak 24 individu dan tipe tenera sebanyak 20 individu. Tabel 3 menyajikan keseluruhan hasil uji kesesuaian antara marka RAPD dan lokus sifat ketebalan cangkang.

Analisis asosiasi dua fenotipe seperti ini pada kelapa sawit telah dilaporkan se-

belumnya (18). Strategi ini terbukti efektif bagi penentuan genotipe individu (*finger-printing*) tanaman, khususnya yang berkonstitusi genetik sangat seragam. Pada populasi tanaman yang berkonstitusi genetik sangat beragam, yaitu pada kelapa sawit yang menyerbuk bebas, peristiwa ko-insidensi antara eksistensi fragmen DNA dengan ekspresi sifat lain yang tidak dikehendaki dapat terjadi setiap saat.

Pemetaan genetik pada populasi yang beragam dikembangkan berdasarkan analisis pola pewarisan dengan memperhatikan banyaknya rekombinan dan bukan rekombinan dari haplotipe lokus. Semakin sedikit ditemukan tipe rekombinan dalam progeni menunjukkan semakin dekat jarak genetik antar lokus. Penemuan lokus RAPD yang terpaut erat dengan lokus sifat seperti ketebalan cangkang buah (alel *Sh*) perlu metode verifikasi lebih lanjut.

Tabel 3. Proporsi marka RAPD yang bersesuaian dengan penampilan sifat ketebalan cangkang buah (lokus *Sh*) kelapa sawit

No.	Lokus	Susunan oligonukleotida 5' → 3'	Jumlah lokus yang sesuai		Jumlah progeni	Proporsi kesesuaian (%)
			Dura	Tenera		
1	B07_1116	GGTGACGCAG	20	15	70	50,0
2	C02_500	GTGAGGCGTC	19	18	66	56,1
3	C07_561	GTCCCGACGA	3	27	70	42,9
4	D03_405	GTCGCCGTCA	13	9	70	31,4
5	D03_617	GTCGCCGTCA	24	20	70	62,9
6	D05_1000	TGAGCGGACA	21	16	66	56,1
7	D05_1500	TGAGCGGACA	16	19	66	53,0
8	D16_530	AGGGCGTAAG	13	25	70	54,3
9	D16_749	AGGGCGTAAG	16	24	70	57,1
10	M04_1750	GGCGGTTGTC	14	15	66	43,9
11	M20_1000	AGGTCTTGGG	1	32	66	50,0
12	M20_1450	AGGTCTTGGG	1	32	66	50,0
13	N03_750	GGTACTCCCC	0	32	66	48,5
14	N09_735	TGCCGGCTTG	6	27	66	50,0
15	N09_857	TGCCGGCTTG	14	8	66	33,3
16	N10_1369	ACAAGTGGGG	11	20	66	47,0
17	N12_1300	CACAGACACC	16	15	64	48,4
18	N20_1000	GGTGCTCCGT	12	18	66	45,5
19	O06_812	CCACGGGAAG	0	32	66	48,5
20	O11_800	GACAGGAGGT	14	17	66	47,0
21	O13_1100	GTCAGAGTCC	18	15	66	50,0
22	O16_2000	TCGGCGGTTC	14	9	65	35,4
23	O19_315	GGTGACGTT	2	32	66	51,5
24	O20_1500	ACACACGCTG	14	18	66	48,5

Pemetaan marka molekuler yang berpaut dengan sifat ketebalan cangkang buah kelapa sawit telah banyak dilakukan. Moritzsohn *et al.* (11) memetakan marka RAPD pada pohon tenera dan menemukan dua lokus pengapit alel *Sh*⁺ pada jarak genetik yang terdekat 17,5 cM dan 23,9 cM. Sementara itu, Mayes *et al.* (11) dan Jack *et al.* (5) menunjukkan dua marka RFLP yang mengapit lokus ketebalan cangkang pada jarak peta 11 cM dan 14 cM. Keseluruhan hasil penelitian tersebut bermanfaat sebagai alat deteksi dini bagi tiga tipe tanaman kelapa sawit. Kemampuan yang demikian memiliki dampak ekonomi yang tinggi. Pengelompokan pohon menurut tipe tanaman pada suatu areal jelas dapat meningkatkan efisiensi pengelolaan tanaman. Fokus pada pemetaan lokus poligenik (QTL) yang mengendalikan komponen produksi minyak sawit sangat relevan bagi penelitian masa depan.

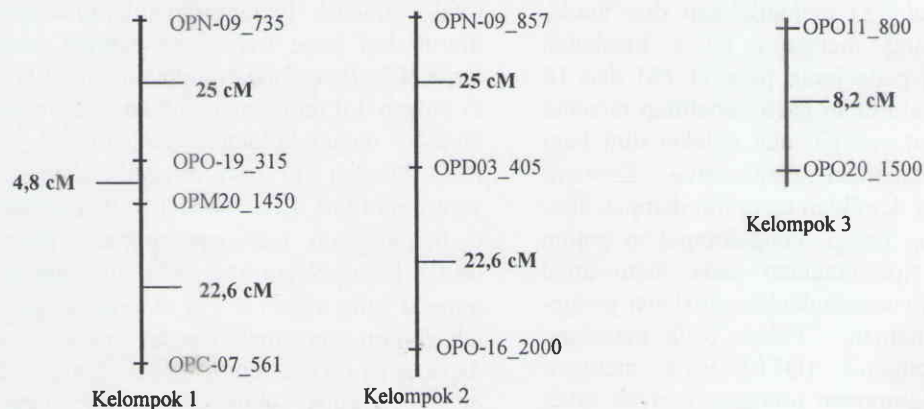
Banyaknya kelompok pautan dan jumlah marka yang tergabung pada kelompok pautan ditentukan oleh besarnya penetapan ambang nilai LOD dan/atau maksimum fraksi rekombinasi. Berdasarkan kriteria yang lazim dipakai yaitu LOD > 3,0 dihasilkan tiga kelompok pautan yang mencakup 9 marka dan jarak peta total 113,8 cM. Penomoran kelompok peta diurut dari yang terpanjang sampai yang terpendek. Penggunaan nilai ambang LOD di bawah 3,0 dapat memautkan dua marka baru ke dalam kelompok satu (Tabel 4). Pada kondisi ini bisa dihasilkan pautan yang semu (10, 12). Penetapan maksimum θ berpengaruh terhadap optimasi pengurutan lokus. Selain itu, pada batas maksimum θ yang makin tinggi diperlukan jumlah contoh yang makin besar untuk mendapatkan LOD tertentu. Pada Gambar 2 disajikan urutan lokus yang paling mungkin pada setiap kelompok pautan.

Dari analisis pautan ditemukan 13 lokus bebas (59,1%) yang masih belum dapat dikelompokkan. Di sisi lain, studi Moretzsohn *et al.* (12) pada kelapa sawit mendapatkan 24,2% lokus bebas, bahkan pada tanaman kehutanan Grattapaglia dan Sederoff (2) menemukan proporsi sangat

kecil (4,5%). Oleh karena itu, penambahan lokus-lokus DNA hasil dari penggenotipan baru masih sangat efektif untuk dilakukan guna meningkatkan kelompok pautan dan kerapatan markanya sehingga dicapai kesetaraan pautan dengan jumlah haploid kromosom ($n=x=16$).

Tabel 4. Pemetaan marka RAPD pada pohon elit kelapa sawit tenera

No	Kriteria pautan		Grup 1		Grup 2		Grup 3	
	LOD	θ	marka	cM	Marka	cM	marka	cM
1	5,0	0,25	N09_735 O19_315 M20_1450 C07_561	25,0 4,8 22,6	D03_405 N09_857	25,0	O11_800 O20_1500	8,2
2	3,0 – 4,0	0,25	N09_735 O19_315 M20_1450 C07_561	25,0 4,8 22,6	N09_857 D03_405 O16_2000	25,0 28,2	O11_800 O20_1500	8,2
3	1,0 – 2,0	0,25	N09_735 O19_315 M20_1450 C07_561	25,0 4,8 22,6	N09_857 D03_405 O16_2000	25,0 28,2	O11_800 O20_1500	8,2
4	5,0	0,32	N09_735 O19_315 M20_1450 C07_561	25,0 4,8 22,6	D03_405 N09_857	25,0	O11_800 O20_1500	8,2
5	3,0 - 4,0	0,32	N09_735 O19_315 M20_1450 C07_561	25,0 4,8 22,6	N09_857 D03_405 O16_2000	25,0 28,2	O11_800 O20_1500	8,2
6	1,0 – 2,0	0,32	D16_749 D16_530 N09_735 O19_315 M20_1450 C07_561	49,5 58,4 24,8 4,7 22,4	N09_857 D03_405 O16_2000	25,0 28,2	O11_800 O20_1500	8,2



Gambar 2. Peta pautan awal pada pohon tenera

Penggunaan konfigurasi *pseudotestcross* dengan marka RAPD merupakan strategi umum untuk konstruksi peta pautan genetik pada tanaman kehutanan dan organisme hidup yang sangat heterosigot. Pemakaian nama *pseudo-testcross* untuk strategi ini karena konfigurasi perkawinan uji-silang (*testcross*) marka tidak diketahui *a priori* seperti pada uji silang konvensional dengan penguji (*tester*) adalah homosigot resesif pada lokus yang dikehendaki. Konfigurasi diketahui *a posteriori* sesudah menganalisis origin tetua dan segregasi genetik marka pada progeni persilangan antara tetua sangat heterosigot. Bila inferensi dilakukan untuk kedua tetua yang terlibat dalam persilangan, maka istilah *pseudo-testcross* dua arah akan lebih tepat digunakan.

KESIMPULAN

Amplifikasi DNA genom menggunakan 19 primer oligonukleotida 10 basa menghasilkan 24 lokus RAPD yang polimorfik pada tetua tenera. Analisis segregasi lokus menghasilkan delapan lokus yang nyata menyimpang dari kaidah nisbah mendelian 1 : 1. Di antara lokus yang menyimpang paling tidak ditemukan dua lokus, N03_750 dan O06_812, yang menunjukkan ekspresi heterosigot homogen pada populasi progeni. Lokus sifat ketebalan cangkang sangat nyata bersegregasi pada nisbah 1 : 1 untuk tipe dura dan tenera. Lokus sifat ini berjarak 67,9 cM dari lokus D03_617, dan tidak dapat dipautkan dalam satu kromosom. Tingkat determinasi D03_617 terhadap kedua tipe kelapa sawit sebesar 63 %. Dari analisis pautan genetik dihasilkan tiga kelompok pautan yang mencakup 9 marka dengan jarak peta total 113,8 cM. Pembentukan peta pautan genetik dengan kerapatan ting-

gi perlu dilanjutkan untuk membangun asosiasi marka DNA dengan lokus sifat kuantitatif tertentu.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian sebagian didanai oleh Proyek Riset Unggulan Terpadu VII, Tahun Anggaran 1999 – 2001, Dewan Riset Nasional.

DAFTAR PUSTAKA

1. EDWARDS, M.D. and N.J. PAGE. 1994. Evaluation of marker-assisted selection through computer simulation. *Theor. Appl. Genet.* 88: 376-382.
2. GRATTAPAGLIA, D. and R. SEDEROFF. 1994. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. *Genetics* 137: 1121-1137.
3. HALDANE, J.B.S. 1919. The combination of linkage values and the calculation of distances between the loci of linked factors. *J. Genet.* 8 : 299-309.
4. HAYATI, P.K.D., A. HARTANA, SUHARSONO dan H. ASWIDINNOOR. 2000. Keanekaragaman genetika kelapa 'Genjah Jombang' berdasarkan random amplified polymorphic DNA. *Hayati* 7 : 35-40.
5. JACK, P.L., C. JAMES, Z. PRICE, K. RANCE, L. GROVES, R.H.V. CORLEY, S. NELSON, and V. RAO. 1998. Application of DNA markers in oil palm breeding. *Proc. 1998 Int. Oil Palm Conf.* pp 315-324.
6. JALANI, B.S. 1998. Oil palm research and development in Malaysia: progress and trends. *The Planter* 74: 73-92.
7. JOHNSON, G.R. and R.H. MUMM. 1996. Marker assisted maize breeding. *Proc. Of the 51 Ann. Corn and Sorghum Res. Conf., ASTA* pp75-84.
8. LANDER, E.S., P. GREEN, J. ABRAHAMSON, A. BARLOW, M.J. DALY, S.E. LINCOLN, and L. NEWBURN. 1987. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing

- primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174-181.
9. LEE, M. 1995. DNA markers and plant breeding programs. *Adv. Agron.* 55: 265-344.
 10. MARTINEZ, O. 1996. Spurious linkage between markers in QTL mapping. *Molec. Breed.* 2: 351-358.
 11. MAYES, S., P.L. JACK, D.F. MARSHALL and R.H.V. CORLEY. 1997. Construction of a RFLP genetic linkage map for oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Genome* 40: 116-122.
 12. MORETZSOHN, M.C., C.D.M. NUNES, M.E. FERREIRA and D. GRATTAPAGLIA. 2000. RAPD linkage mapping of the shell thickness locus in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Theor. Appl. Genet.* 100: 63-70.
 13. NURHAIMI-HARIS dan A. DARUSSAMIN. 1995. Ekstraksi DNA dari klon tanaman kelapa sawit normal dan abnormal hasil kultur jaringan. *Puslit Bioteknologi Perkebunan Bogor*. 14 p (Publikasi intern).
 14. OROZCO-CASTILLO, K.J. CHALMERS, R. WAUGH and W. POWELL. 1994. Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 87: 934-940.
 15. PURBA, A.R., AKIYAT, E. SYAMSUDDIN dan R.A. LUBIS. 1994. Keragaan dan kemajuan seleksi siklus kedua pemuliaan kelapa sawit di Marihat. Hasil dan komponen hasil periode 4-6 tahun. *Bul PPKS* 2: 193-204.
 16. RAJANAIDU, N., I. MAIZURA and S.C. CHEAH. 2000. Screening of oil palm natural populations using RAPD and RFLP molecular markers. p: AA1-AA28. In N. Rajanaidu and D. Ariffin (eds.). *Proc. Int. Symposium on Oil Palm Genetic Resources and Utilization*. MPOB, Malaysia.
 17. RIBAUT, J-M. and D. HOISINGTON. 1998. Technical focus: Marker-assisted selection: new tools and strategies. *Trends. Plant Sci.* 3: 236-239.
 18. SAMBROOK, J., E.F. FRITZ, and T. MANIATIS. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory. CSH. New York.
 19. TORUAN-MATHIUS, N., T. HUTABARAT, U. DJULAICHA, A.R. PURBA and T. HUTOMO. 1997. Identification of oil palm (*Elaeis guineensis*) dura, pisifera dan tenera by RAPD markers. p: 237-248. In Safuddin Noer et al. (eds). *Proc. The Indonesian Biotech. Conf. Vol. II.A. The Indonesian Biotech. Consortium, Jakarta*. 17-19 June 1997.
 20. TORUAN-MATHIUS, N., T. HUTABARAT dan T. SUNDARI. 1996. Pengaruh pengemasan dan penyimpanan terhadap DNA daun tanaman perkebunan untuk analisis RAPD. *Men. Perkeb.* 64: 3-12.
 21. WAUGH, R. 1997. RAPD analysis: use for genome characterization, tagging traits and mapping. p: 305-333. In M.S. Clark (ed.). *Plant Molecular Biology - A Laboratory Manual*. Chapter 6. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
 22. WILLIAMS, J.G.K., A.R. KUBELIK, K.J. LIVAK, J.A. RAFALSKI and S.V. TINGEY. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.

Lampiran 1. Pendugaan Jarak antar lokus dalam cM (angka atas) dan skor LOD (angka bawah)

No	Lokus	BM_11K	CM_30	CM_31	BM_67	BM_68	BM_1300	BM_70	DM_530	M04_1750	M20_1450	N09_735	N09_857	N10_1369	N12_1300	N20_1000	O11_800	O13_1100	O16_2000	O19_315	O20_1500
1	C02_900	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	C07_561	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	D01_617	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	D01_405	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	D03_1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	D05_1500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	D16_749	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	D16_530	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	M04_1750	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	M20_1450	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	N09_735	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	N09_857	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	N10_1369	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	N12_1300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	N20_1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	O11_800	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	O13_1100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	O16_2000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	O19_315	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	O20_1500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	Sh	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Pre-assessment of RAPD-based linkage mapping on an elite tenera oil palm

Indra E. Setiyo, Sudarsono¹, and Dwi Asmono

Abstract

Research was conducted to construct a genetic linkage map of an individual elite tenera oil palm using RAPD marker and pseudo-testcross strategy. The mapping population chosen in this study was 70 progeny of BO 2499 D x BO 903 T cross and their parents. Of 169 arbitrary primers (10 bp oligonucleotide primers) screened in both parents, 19 primers were selected to genotype the mapping population. Results indicated that 19 arbitrary random primers generated 24 RAPD loci that were informative for genotyping of mapping population. Of 24 loci, 8 loci violated 1:1 Mendelian segregation ratio. Two distorted loci amplified using 2 primers most probably were expressed by homozygous loci in the parents. These markers were not used for linkage analysis. Linkage between two loci was declared if the LOD threshold 3.0, with maximum recombination fraction (θ) of 0.25, was achieved. Preliminary mapping indicated that 3 linkage groups were detected with 9 loci covering genetic distances of 113.8 cM. The other 13 loci were unable to be placed on those linkage groups. Further study involving more markers is still being done to get saturated mapping of oil palm genome. In the future, the saturated map is expected to be a good reference map for identifying quantitative trait loci associated with commercial characters, such as shell thickness.

Key words: *Elaeis guineensis*, RAPD marker, genetic linkage map, pseudo-testcross

Introduction

Oil palm improvement using recurrent reciprocal selection (RRS) has given significant impact in term of selection progress that reaches 12 – 15 % per cycle (15). Considering one cycle of selection needs 7-10 years, such a selection progress is fairly low. On the other hand, genetic improvements using phenotypic selection as well as progeny testing *per se* need enormous efforts, in term of data management and experimental area. Current breeding approach in oil palm is also facing many significant constraints, including the lack of genetic information on most based populations and the biological complexity of the population.

Integration of molecular marker technology for assisting selection, known as marker-assisted selection (MAS), is expected to give significant impact to the selection (1, 7). Prior to MAS application, accurate genetic linkage map and quantitative trait loci (QTL) maps that become target of improvement should be available (9).

Genetic mapping of outbred populations was difficult due to the maximum genetic equilibrium within the population. However, Grattapaglia and Sederoff (2) showed that genetic mapping in such populations could be done on individual plant, instead of population, using pseudo-testcross strategy. According to Ribaut and Hoisington (17), DNA marker technology

¹Department of Agronomy, Bogor Agricultural University

may contribute to the improvement of polygenic traits in the future.

Polymerase chain reaction (PCR)-based markers are proved to be efficient technology for genetic mapping. Of the PCR-based markers, *random amplified polymorphic DNA* (RAPD) is the first generation and widely used for plant genetic studies (22). The technique has superiority over DNA hybridize-based technology, such as *restriction fragment length polymorphism* (RFLP), particularly in rapidity and simplicity of the procedure. RAPD technique does not require any information of specific probe library and radioisotope detection. RAPD usually behaves as a dominant genetic marker. Yet, the dominance does not refer to the classical term of intra-locus inter-allele interaction.

The objective of the experiment was to construct genetic linkage map on an elite tenera oil palm using RAPD marker.

Materials and Methods

Mapping population

Planting materials were dura mother palm (BO 2499 D) derived from PA 131 D, tenera palm (BO 903 T) derived from the elite SP 540 T palm, and 70 progeny of BO 2499 D x BO 903 T crosses. All the 70 progeny were part of progeny trials of RRS II breeding experiment (BJ 28 S) planted on 1992 in Bah Jambi Estate, North Sumatra.

DNA isolation and RAPD analysis

RAPD analysis was done in Molecular Biology Laboratory, Indonesian Oil Palm Research Institute (IOPRI) Medan, and Biotechnology Research Institute for Estate Crops, Bogor. Leaf samples for

DNA isolation were collected from the mapping population planted in Bah Jambi Estate, PT Perkebunan Nusantara IV, Pe-matang Siantar. Total genomic DNA was isolated from tissue samples of the spear leaves and/or the first frond. The leaf tissues were kept well in plastic bottles containing extraction buffer (20). Genomic DNA was isolated using CTAB method adapted from Orozco-Castillo *et al.* (14) with some modifications (13, 19). Quality and quantity of genomic DNA were determined in two ways: (i) by UV-spectrophotometer analysis and (ii) by agarose gel electrophoresis (18).

DNA amplification referred to Williams *et al.* (22) with reaction final volume of 25 μ l. The amplification reaction was started in pre-PCR condition for 1 minute up to 94 °C, and was continued to 45 thermal cycles in which each cycle comprised three steps: (i) denaturation in 94 °C for 1 minute, (ii) primer annealing in 36 °C for 1 minute, and (iii) primer extension in 72 °C for 2 minutes. The reaction was completed by post-PCR condition for 4 minutes in 72 °C. The consistency of RAPD profiles was assessed by comparing the appearance of DNA fragments resulted by primer screening of some individual palms and genotyping of mapping population. In certain case, reaction was repeated when the DNA fragments showed low intensity.

The amplified genomic DNA was separated in horizontal agarose gel electrophoresis chamber using TAE buffer 1 x. The concentration of agarose gel was 0.8 % and 1.4 % for DNA test and the amplification, respectively. The electrophoresis was run in 50 V for 85 minutes or 3 V/cm. The gel was stained by ethidium bromide solution of 5 μ g/l for 30 minutes and then washed using distilled water for 10 min-

utes. RAPD bands were visualized on UV-transiluminator (312 nm) and were documented using the T667 Polaroid camera. DNA fragments were scored from the photograph.

Scoring and segregation test

A total of 169 primers (ten-base oligonucleotide) were screened, of which 96 primers generated at least one polymorphic band in the parents. Among these informative primers, 19 primers were selected to genotype the mapping population. Following pseudo-testcross configuration, the markers that did not appear in dura parent but appeared in tenera parent were expected to segregate in 1:1 ratio on their F_1 progeny. The fragment size was estimated by marker of 1 kb DNA ladder. Hypothesis of 1:1 segregation of DNA alleles was tested using chi-square (χ^2) test. Segregation of shell-thickness alleles (*Sh*) in the mapping population was also observed.

Linkage map construction

The segregating DNA alleles in the mapping population that were not significant by χ^2 test were then used to analyze genetic linkage. The data were analyzed by MAPMAKER/EXP 3.0 using backcross model (8). The program calculated recombination frequency and its conversion to map distance in centimorgan following Haldane mapping function (3). Linkage between two loci was decided if a minimum LOD score 3.0 at maximum θ 0.25 was met. The best locus order of each group was determined by maximum log-likelihood of all possible locus orders.

Results and Discussion

DNA isolation and RAPD analysis

RAPD analysis requires a very high quality of template DNA stock in certain quantity. This could be met by conducting the best possible of DNA isolation procedures and standardizing DNA tests. Spectrophotometer test of DNA isolated in IOPRI laboratory demonstrated a high level DNA purity. The level was in the range of 1.64 to 2.38. The DNA concentration was 216.2 ± 17.9 $\mu\text{g/ml}$, or within a range of 111 to 468 $\mu\text{g/ml}$.

DNA test using gel electrophoresis revealed solid and thick DNA bands. It means that the DNA were in intact and uncut condition, as well as in high quantity. When *EcoRI* enzyme was included in the test, a smear DNA pattern was observed. This indicates that the DNA may easily be cut. Overall, the isolated DNA could assure a good PCR reaction.

The RAPD analysis demonstrated a good pattern of DNA fragment as indicated by a very high consistency of DNA band profiles produced in primer screening and genotyping of the mapping population. Many factors affected reliability and reproducibility of RAPD profiles, among others are condition and concentration of DNA, co-extraction of contaminating DNA, and amplification interference (21). The primer-screening step allows to select rapidly some primers that may generate a higher polymorphic markers (or higher multiplex ratio). In this study, 19 selected primers generated 112 visible bands (Table 1) or 5.9 ± 1.0 bands per primer. Total DNA bands generated by the primers depend on the distribution of homologous sites of primer sequence to the genome.

An average of eight visible bands per primer was detected in coconut (4).

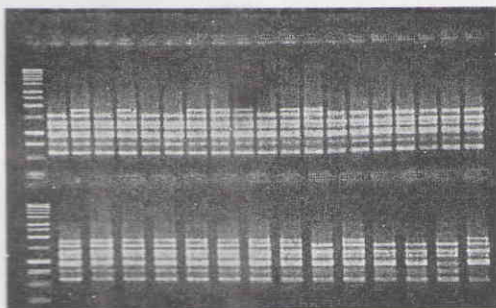


Figure 1. Profile of RAPD bands generated by primer OPM-04 on mapping population

Scoring and segregation analysis

Using 19 selected primers, 39 polymorphic DNA loci (35 %) were observed, while the remaining loci (65 %) were monomorphic. Polymorphic DNA loci may be classified into two marker groups: (i) a group consisting of 15 loci that were present in the dura parent but absent in the tenera parent and (ii) another group consisting of 24 loci that were absent in the dura parent but present in the tenera (Table 1). Other studies reported that the polymorphic band per primer was about 56 – 69 % (4, 16). The differences were possibly caused by the different in number and type of primer as well as type of population.

The number of informative marker per primer becomes a measure of the mapping efficiency using pseudo-testcross strategy. In this experiment, in which mapping population was the progeny of intra-specific cross between two highly heterozygote palms, a high mapping efficiency of 2.05 markers per primer was obtained. Grattapaglia and Sederoff (2) using

inter-specific cross found a mapping efficiency of 3.69 markers per selected primer. They estimated that the efficiency for intra-specific cross would be 60 – 70 % of the number.

Polymorphic marker loci in tenera parent were then used to genotype the mapping population. The DNA locus size was between 315 – 2000 bp with an average of 988 ± 182 bp. RAPD band varies from low (such as OPO-16) to high (OPO-20) intensity. The number of primer annealing sites especially that located on repeat sequences in genome may be a cause of increasing the number of amplified fragments so that the band appeared in a very high intensity.

The segregation analysis and chi-square test on 25 loci in mapping population showed that 17 of 25 polymorph loci segregated in 1: 1 ratio at $\alpha = 0.05$ level. Even 16 loci were significant at $\alpha = 0.01$ level. Thus, there were eight loci that distorted significantly from 1 : 1 Mendelian rule (Table 2). The distortion may have a biological explanation (such as lethal) or as a consequence of small sample size of the mapping population. In this experiment the distorted numbers were relatively higher than previous report, which was 14.8 % of 121 polymorphic markers (12).

Among the distorted loci, at least two loci generated by two primers showing a full appearance in the overall tested progenies. Such appearance pattern may be caused by homozygous genotype of the parents. Of course, crosses between dominance and recessive homozygous parents will produce heterozygous progeny.

Table 1. Expression of RAPD fragments on each arbitrary primer

No	Primer	Oligonucleotide order 5' → 3'	Number of detected loci	Number of polymorphic loci	Number of fragments detected in each parent (D-T)
1	OPB-07	GGTGACGCAG	10	2	1-1
2	OPC-02	GTGAGGCGTC	6	2	1-1
3	OPC-07	GTCCCGACGA	9	2	1-1
4	OPD-03	GTCGCCGTCA	10	4	2-2
5	OPD-05	TGAGCGGACA	5	2	0-2
6	OPD-16	AGGGCGTAAG	7	5	3-2
7	OPM-04	GGCGGTTGTC	7	1	0-1
8	OPM-20	AGGTCTTGGG	6	3	1-2
9	OPN-03	GGTACTCCCC	4	2	1-1
10	OPN-09	TGCCGGCTTG	4	2	0-2
11	OPN-10	ACAAGTGGGG	5	2	1-1
12	OPN-12	CACAGACACC	4	2	1-1
13	OPN-20	GGTGCTCCGT	8	1	0-1
14	OPO-06	CCACGGGAAG	4	1	0-1
15	OPO-11	GACAGGAGGT	6	1	0-1
16	OPO-13	GTCAGAGTCC	5	1	0-1
17	OPO-16	TCGGCGGTTC	4	2	1-1
18	OPO-19	GGTGACGTT	4	2	1-1
19	OPO-20	ACACACGCTG	4	2	1-1
Total			112	39	15-24

Table 2. Segregation analysis of 24 RAPD loci and locus controlling shell thickness trait

No	Locus	Expected pres- ence	Expected absence	Presence	Absence	χ^2
1	B07_1116	35	35	30	40	1.43 **
2	C02_500	33	33	33	33	0.00 **
3	C07_561	35	35	59	11	32.91
4	D03_405	35	35	31	39	0.91 **
5	D03_617	35	35	31	39	0.91 **
6	D05_1000	33	33	29	37	0.97 **
7	D05_1500	33	33	36	30	0.55 **
8	D16_530	35	35	47	23	8.23
9	D16_749	35	35	43	27	3.66 **
10	M04_1750	33	33	35	31	0.24**
11	M20_1000	33	33	65	1	62.06
12	M20_1450	33	33	65	1	62.06
13	N03_750	33	33	66	0	66.00
14	N09_735	33	33	55	11	29.33
15	N09_857	33	33	28	38	1.52 **
16	N10_1369	33	33	43	23	6.06 *
17	N12_1300	32	32	33	31	0.06 **
18	N20_1000	33	33	40	26	2.97 **
19	O06_812	33	33	66	0	66.00
20	O11_800	33	33	37	29	0.97 **
21	O13_1100	33	33	31	35	0.24 **
22	O16_2000	33	32	28	37	1.54 **
23	O19_315	33	33	64	2	58.24
24	O20_1500	33	33	38	28	1.52**
25	Sh	35	35	35	35	0.00**

*, ** significantly different at $\alpha = 0.05$ and 0.01 , respectively

Construction of genetic linkage map

Following the analysis of the number of possible inter-marker loci pairs, 30 loci pairs that their genetic distances could be estimated were found (Appendix 1). The table shows that there were three loci, B07_1116, C02_500 and N12_1300, in which the genetic distances was unable to be estimated. The average distance was 52.8 ± 8.3 cM. The shortest distance was between M20_1450 and O19_315 loci at LOD 14.57. Meanwhile, the longest distance was between O16_2000 and D16_749 loci at LOD 0.57.

Result also indicated that the gene controlling fruit shell-thickness (*Sh* locus) was 67.9 cM from the D03_617 loci at LOD 1.02. Based on criteria of $\text{LOD} > 3.0$ and $\theta < 0.25$ both loci should not be mapped in the same chromosome. The conformity analysis between phenotype of

D03_617 to the appearance of shell-thickness was about 63 %. It means that of 70 scored progeny, D03_617 marker was able to determine properly the type of dura and tenera as many as 24 and 20 palms, respectively. Table 3 presents the overall results of the conformity test between RAPD markers and locus controlling shell-thickness trait.

Such conformity analysis has been reported previously in oil palm (18). This strategy is effective for fingerprinting individual genotype, especially that constitutes a highly homogenous. Within a heterogeneous population, such as outbreed oil palm population, coincidence event between the existing DNA fragment and the expression of trait unrelated to the fragment may be occurred any time.

Table 3. Conformity of RAPD markers related to the loci controlling fruit shell-thickness (*Sh* locus) of oil palm

No	Locus	Oligonucleotide sequence 5' → 3'	Number of loci that conform with progeny		Number of progeny tested	Conformity proportion (%)
			Dura	Tenera		
1	B07_1116	GGTGACGCAG	20	15	70	50.0
2	C02_500	GTGAGGCGTC	19	18	66	56.1
3	C07_561	GTCCCGACGA	3	27	70	42.9
4	D03_405	GTCGCCGTCA	13	9	70	31.4
5	D03_617	GTCGCCGTCA	24	20	70	62.9
6	D05_1000	TGAGCGGACA	21	16	66	56.1
7	D05_1500	TGAGCGGACA	16	19	66	53.0
8	D16_530	AGGGCGTAAG	13	25	70	54.3
9	D16_749	AGGGCGTAAG	16	24	70	57.1
10	M04_1750	GGCGGTTGTC	14	15	66	43.9
11	M20_1000	AGGTCTTGGG	1	32	66	50.0
12	M20_1450	AGGTCTTGGG	1	32	66	50.0
13	N03_750	GGTACTCCCC	0	32	66	48.5
14	N09_735	TGCCGGCTTG	6	27	66	50.0
15	N09_857	TGCCGGCTTG	14	8	66	33.3
16	N10_1369	ACAACTGGGG	11	20	66	47.0
17	N12_1300	CACAGACACC	16	15	64	48.4
18	N20_1000	GGTGCTCCGT	12	18	66	45.5
19	O06_812	CCACGGGAAG	0	32	66	48.5
20	O11_800	GACAGGAGGT	14	17	66	47.0
21	O13_1100	GTCAGAGTCC	18	15	66	50.0
22	O16_2000	TCGGCGGTTC	14	9	65	35.4
23	O19_315	GGTGACGTT	2	32	66	51.5
24	O20_1500	ACACACGCTG	14	18	66	48.5

Genetic mapping was developed based on the analysis of inheritance pattern by paying attention to the number of recombinant and non-recombinant of haplotypes. Decreasing of recombinant type in the progeny indicates closer inter-loci distances. Finding the RAPD loci that link tightly to the interested loci such as *Sh* locus should be verified with other method.

Detection of molecular markers that linked to the fruit shell-thickness trait of oil palm has been conducted. Moretzsohn *et al.* (12) mapped RAPD markers in tenera palm and found two loci flanking *Sh*⁺ allele at 17.5 and 23.9 cM. Mayes *et al.* (11) and Jack *et al.* (5) obtained two RFLP markers that flanked the shell-thickness loci in 11 cM and 14 cM. Those results may be useful for developing an early detection test of oil palm types, and may have a high economic value in the future. Grouping of oil palm with specific type in a certain area may increase the efficiency of oil palm

management. Moreover, the research that focuses on mapping of polygenic loci (QTL) controlling the palm oil yield component, for example, should be relevant in the future.

The numbers of linkage groups and loci integrated to the linkage group were determined by taking threshold of minimum LOD and/or maximum θ . Three linkage groups covering a total of 9 markers with the total distance of 113.8 cM were constructed using common criteria, LOD > 3.0. Use of LOD threshold less than 3.0 may link more markers in the group (Table 4). In this condition, the spurious linkage may be detected (10, 12). Optimization of the loci order was determined by maximum θ . In addition, in a higher maximum θ limit, a larger sample was required to obtain a certain LOD. Figure 2 show the most probably loci order for the linkage groups.

Table 4. Mapping of RAPD markers on an elite tenera palm

No.	Linkage criteria		Group 1		Group 2		Group 3	
	LOD	θ	locus	cM	locus	cM	locus	cM
1	5,0	0,25	N09_735 O19_315 M20_1450 C07_561	25,0 4,8 22,6	D03_405 N09_857	25,0	O11_800 O20_1500	8,2
2	3,0 - 4,0	0,25	N09_735 O19_315 M20_1450 C07_561	25,0 4,8 22,6	N09_857 D03_405 O16_2000	25,0 28,2	O11_800 O20_1500	8,2
3	1,0 - 2,0	0,25	N09_735 O19_315 M20_1450 C07_561	25,0 4,8 22,6	N09_857 D03_405 O16_2000	25,0 28,2	O11_800 O20_1500	8,2
4	5,0	0,32	N09_735 O19_315 M20_1450 C07_561	25,0 4,8 22,6	D03_405 N09_857	25,0	O11_800 O20_1500	8,2
5	3,0 - 4,0	0,32	N09_735 O19_315 M20_1450 C07_561	25,0 4,8 22,6	N09_857 D03_405 O16_2000	25,0 28,2	O11_800 O20_1500	8,2
6	1,0 - 2,0	0,32	D16_749 D16_530 N09_735 O19_315 M20_1450 C07_561	49,5 58,4 24,8 4,7 22,4	N09_857 D03_405 O16_2000	25,0 28,2	O11_800 O20_1500	8,2

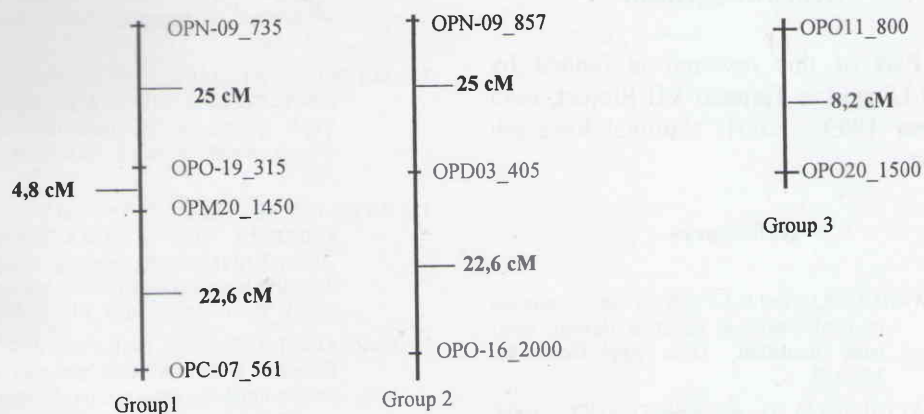


Figure 2. Linkage groups on tenera oil palm

The linkage analyses showed that 13 loci (59.1 %) were unable to be grouped in the three linkage groups. Moretzsohn *et al.* (12) reported that the free loci were about 24.2 % in oil palm, even in the forest tree Grattapaglia and Sederoff (2) found out a smaller proportion (4.5 %) of such loci. Genotyping should be continued so that the number of linkage group corresponding to the chromosome haploid number ($n=x=16$) could be constructed.

Application of pseudo-testcross configuration and RAPD markers has been a common strategy for constructing genetic linkage maps in forest trees and highly heterozygous organisms. Use of pseudotest-cross terminology was a consequence of the mating configuration that was unknown prior to the crosses. The configuration was known *a posteriori* after analyzing the parental alleles and segregation of alleles in progenies that derived from a cross between the highly heterozygote parents. When both parents involved in the crossing were *inferred*, the term of two-ways pseudo ~~testcross~~ was more properly used.

Conclusions

Nineteen 10-base oligonucleotide primers used in DNA amplification were able to generate 24 loci that were polymorphic in the tenera parent. Segregation analyses of the loci provided eight loci that distorted significantly from the rule of 1 : 1 Mendelian ratio. Among the distorted loci, there were at least two loci, N03_750 and O06_812 that indicated homogenous-heterozygote expression in the progeny. Locus controlling shell-thickness trait segregated significantly in 1 : 1 ratio for dura and tenera types. The locus was 67.9 cM from D03_617 locus and theoretically unlinked in the same chromosome. The conformity level of D03_617 to both oil palm types was about 63 %. The genetic linkage analysis resulted three linkage groups consisting of 19 markers and covering of 113.8 cM in map distance. Construction of a high-density linkage map should be continued before developing an association between DNA markers and certain interested quantitative traits loci.

Acknowledgement

Part of this research is funded by Riset Unggulan Terpadu VII Project, term of year 1999 – 2001, National Research Board.

References

1. EDWARDS, M.D. and N.J. PAGE. 1994. Evaluation of marker-assisted selection through computer simulation. *Theor. Appl. Genet.* 88: 376-382.
2. GRATTAPAGLIA, D. and R. SEDEROFF. 1994. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. *Genetics* 137: 1121-1137.
3. HALDANE, J.B.S. 1919. The combination of linkage values and the calculation of distances between the loci of linked factors. *J. Genet.* 8: 299-309.
4. HAYATI, P.K.D., A. HARTANA, SUHARSONO dan H. ASWIDINNOOR. 2000. Keane-karagaman genetika kelapa 'Genjah Jombang' berdasarkan random amplified polymorphic DNA. *Hayati* 7: 35-40.
5. JACK, P.L., C. JAMES, Z. PRICE, K. RANCE, L. GROVES, R.H.V. CORLEY, S. NELSON, and V. RAO. 1998. Application of DNA markers in oil palm breeding. *Proc. 1998 Int. Oil Palm Conf.* pp. 315-324.
6. JALANI, B.S. 1998. Oil palm research and development in Malaysia: progress and trends. *The Planter* 74: 73-92.
7. JOHNSON, G.R. and R.H. MUMM. 1996. Marker assisted maize breeding. *Proc. Of the 51 Ann. Corn and Sorghum Res. Conf., ASTA.* P: 75-84.
8. LANDER, E.S., P. GREEN, J. ABRAHAMSON, A. BARLOW, M.J. DALY, S.E. LINCOLN, and L. NEWBURN. 1987. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174-181.
9. LEE, M. 1995. DNA markers and plant breeding programs. *Adv. Agron.* 55: 265-344.
10. MARTINEZ, O. 1996. Spurious linkage between markers in QTL mapping. *Molec. Breed.* 2: 351-358.
11. MAYES, S., P.L. JACK, D.F. MARSHALL and R.H.V. CORLEY. 1997. Construction of a RFLP genetic linkage map for oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Genome* 40: 116-122.
12. MORETZSOHN, M.C., C.D.M. NUNES, M.E. FERREIRA and D. GRATTAPAGLIA. 2000. RAPD linkage mapping of the shell thickness locus in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Theor. Appl. Genet.* 100: 63-70.
13. NURHAIMI-HARIS dan A. DARUSSAMIN. 1995. Ekstraksi DNA dari klon tanaman kelapa sawit normal dan abnormal hasil kultur jaringan. *Puslit Bioteknologi Perkebunan Bogor.* 14 p (Publikasi intern).
14. OROZCO-CASTILLO, K.J. CHALMERS, R. WAUGH and W. POWELL. 1994. Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 87: 934-940.
15. PURBA, A.R., AKIYAT, E. SYAMSUDDIN dan R.A. LUBIS. 1994. Keragaan dan kemajuan seleksi siklus kedua pemuliaan kelapa sawit di Marihat. Hasil dan komponen hasil periode 4-6 tahun. *Bul PPKS* 2: 193-204.
16. RAJANAIDU, N., I. MAIZURA and S.C. CHEAH. 2000. Screening of oil palm natural populations using RAPD and RFLP molecular markers. p. AA1-AA28. In N. Rajanaidu and D. Ariffin (eds.). *Proc. Intl. Symposium on Oil Palm Genetic Resources and Utilization.* MPOB, Malaysia.
17. RIBAUT, J.M. and D. HOISINGTON. 1998. Technical focus: Marker-assisted selection: new tools and strategies. *Trends. Plant Sci.* 3: 236-239.
18. SAMBROOK, J., E.F. FRITZ, and T. MANIATIS. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory. CSH. New York.
19. TORUAN-MATHIUS, N., T. HUTABARAT, U. DJULAICHA, A.R. PURBA and T. HUTOMO. 1997. Identification of oil palm (*Elaeis guineensis*) dura, pisifera and tenera by RAPD markers. p: 237-248. In Safuddin Noer et al. (eds.). *Proc. The Indonesian Biotech. Conf. Vol. II.A. The Indonesian Biotech. Consortium, Jakarta.* 17-19 June 1997.

20. TORUAN-MATHIUS, N., T. HUTABARAT dan T. SUNDARI. 1996. Pengaruh pengemasan dan penyimpanan terhadap DNA daun tanaman perkebunan untuk analisis RAPD. *Men. Perkeb.* 64: 3-12.
21. WAUGH, R. 1997. RAPD analysis: use for genome characterization, tagging traits and mapping. p: 305-333. In M.S. Clark (ed.). *Plant Molecular Biology - A Laboratory Manual*. Chapter 6. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
22. WILLIAMS, J.G.K., A.R. KUBELIK, K.J. LIVAK, J.A. RAFALSKI and S.V. TINGEY. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.

ooOoo

No.	Marker loci
1	C02_500
2	C07_561
3	D03_617
4	D03_405
5	D05_1000
6	D05_1500
7	D16_749
8	D16_530
9	M04_1750
10	M20_1450
11	N09_735
12	N09_857
13	N10_1369
14	N12_1300
15	N20_1000
16	O11_800
17	O13_1100
18	O16_2000
19	O19_315
20	O20_1500
21	4S