ABSTRACT

This systematic molecular study is conducted on fifteen *Cryptocoryne* (Araceae) species that were found in Sarawak including one which was collected from Kalimantan, Indonesia. These species were *C. auriculata* Engler, *C. bullosa* Engler, *C. ferruginea* Engler, *C. fusca* de Wit, *C. keei* Jacobsen, *C. lingua* Engler, *C. pallidinervia* Engler, *C. striolata* Engler, *C. uenoi* Y. Sasaki, *C. zaidiana* Ipor and Tawan, *C. ciliata* (Roxburgh) Schott var. *latifolia* Rataj, *C. cordata* Griffith var. *zonata*, *C. longicauda* Engler, *C. purpurea* Ridley and one unknown species, *C.* sp. This study is to determine genetic relatedness among species in the genus *Cryptocoryne* in Sarawak using random amplified polymorphic DNA (RAPD), and infer phylogenetic relationships from the coding regions of the *rbcL* and *matK* genes of the chloroplast DNA (cpDNA). Of the eighty decamer oligonucleotide primers used for RAPD analysis, only six primers (OPB-1, OPB-20, OPC-6, OPC-15, OPD-5 and OPD11) produced distinct, reproducible and polymorphic amplified products. A total of eighty bands were amplified, with only one found to be monomorphic while 79 bands were polymorphic (98.75%), including four species- specific bands. Low genetic similarities between species were revealed ranging from 5.6% to 57.1%. Dendogram obtained from UPGMA analysis grouped the species into two clusters, with Cluster II further divided into several groups. The clustering pattern was found to be associated with chromosome numbers and slight similarities in leaf morphology. The interspecific relationship in the genus based upon the *rbcL* gene showed that the phylogenetic resolution has been poor as a result of low base substitution rates, whereas the *matK* gene showed a much higher rate. From the total aligned length of 1675 bp for *matK*, 210 variable sites (including 36 parsimony informative sites) were detected. Ten simple insertion / deletions (indels) of several lengths were also detected which could be identified as variations and potentially used for species identification. Between the two

genes, *matK* gave more resolved phylogenetic trees, with strongly supported branches of the Bayesian tree (>0.95 PP). From the phylogenetic tree generated by *matK*, it was observed that the species were separated according to their chromosome number. Two clades were formed in the tree, with *C. ciliata* var. *latifolia* (x = 11) forming the independent lineage of Clade I and the rest forming Clade II. Clade II was further divided into two subclades, with species with the base chromosome x = 17 and 18, and x = 10 and 15 forming respective groups. The x = 17 and 18 has a wider distribution geographically as compared to species with x = 10 and 15, which were confined to only Borneo, Sumatra and Johor, and this was evident in the phylogenetic tree. Both *rbcL* and *matK* genes provided several congruent topologies in the phylogenetic trees, with *C. keei*, *C. striolata* and *C. longicauda*, and *C. ferruginea*, *C. fusca* and *C. uenoi* forming groups. This genus in Sarawak does not have any obvious morphological synapomorphies, having undergone adaptive radiation and island speciation, and therefore cannot provide a conclusive measure of genetic differences in reference to the morphological characteristics. With a majority of the species being endemics, the molecular data obtained in this study would be able to facilitate conservation aspects of the genus.

Keywords: *Cryptocoryne,* genetic relatedness, phylogenetic analysis, RAPD, *rbcL*, *matK*, Sarawak

Saling- Kaitan Genetik dan Analisis Filogenetik Spesies Cryptocoryne Di Sarawak.

ABSTRAK

Kajian molekular sistematik ini dijalankan ke atas 15 spesies Cryptocoryne (Araceae) di Sarawak termasuk satu yang diperoleh dari Kalimantan, Indonesia. Spesies- spesies tersebut adalah C. auriculata Engler, C. bullosa Engler, C. ferruginea Engler, C. fusca de Wit, C. keei Jacobsen, C. lingua Engler, C. pallidinervia Engler, C. striolata Engler, C. uenoi Y. Sasaki, C. zaidiana Ipor and Tawan, C. ciliata (Roxburgh) Schott var. latifolia Rataj, C. cordata Griffith var. zonata, C. longicauda Engler, C. purpurea Ridley dan satu spesies yang tidak diketahui, iaitu C. sp. Tujuan kajian ini adalah untuk menentukan saling- kaitan genetik spesies Cryptocoryne di Sarawak menggunakan "random amplified polymorphic DNA" (RAPD), dan hubungan filogenetik daripada DNA pengekod rbcL dan matK yang terdapat dalam DNA kloroplas (cpDNA). Daripada 80 primer dekamer oligonukleotida yang digunakan untuk analisis RAPD, hanya enam primer (OPB-1, OPB-20, OPC-6, OPC-15, OPD-5 and OPD11) menghasilkan produk amplifikasi yang jelas, boleh ulang semula dan polimorfik. Sejumlah 80 jalur telah diamplifikasi, dengan hanya satu jalur monomorfik sementara 79 jalur adalah polimorfik (98.75%), dan empat jalur spesies-spesifik. Kesamaan genetik yang rendah antara spesies yang dinyatakan adalah dalam julat 5.6% ke 57.1%. Dendogram yang dijana daripada analisis UPGMA mengumpulkan spesies ke dalam dua gugusan, dengan Gugusan II dibahagikan kepada beberapa kumpulan. Corak penggugusan tersebut dikaitkan dengan bilangan kromosom dan sedikit persamaan dalam morfologi daun. Hubungan interspesifik dalam genus ini berdasarkan gen rbcL menunjukkan bahawa resolusi filogenetik adalah rendah disebabkan oleh kadar penukargantian bes yang rendah, sementara gen matK

menunjukkan kadar yang jauh lebih tinggi. Daripada panjang jajaran berjumlah 1675 pasangan bes (bp) bagi matK, 210 tapak dengan kepelbagaian (termasuk 36 tapak bermaklumat parsimoni) telah dikesan. Sepuluh penyelitan / delesi ("indels") ringkas dengan kepanjangan pelbagai turut ditemui yang boleh dikenalpasti sebagai variasi dan berpotensi digunakan untuk pengenalpastian spesies. Antara dua gen ini, matK menghasilkan pokok filogenetik yang lebih terlerai, dengan cabang- cabang yang disokong kuat dalam pokok Bayesian (>0.95 PP). Daripada pokok filogenetik yang dijana oleh matK, diperhatikan bahawa spesies- spesies dipisahkan berdasarkan bilangan kromosom mereka. Dua klad telah dihasilkan dalam pokok filogenetik tersebut, dengan C. ciliata var. latifolia (x = 11) menghasilkan keturunan tidak bersandar membentuk Klad I dan lain- lain spesies membentuk Klad II. Klad II dipisahkan lagi kepada dua subklad, masing- masing dengan spesies yang mempunyai bilangan kromosom asas x = 17 dan 18, dan juga x = 10 dan 15. x = 17 dan 18 mempunyai taburan geografi yang lebih meluas jika dibandingkan dengan spesies yang mempunyai x = 10 dan 15, yang hanya terbatas di Borneo, Sumatera dan Johor, jelas ditunjukkan oleh pokok filogenetik yang dihasilkan. Kedua- dua gen rbcL dan matK menghasilkan beberapa topologi pokok yang kongruen, dengan C. keei, C. striolata dan C. longicauda, serta C. ferruginea, C. fusca dan C. uenoi masing- masing membentuk kumpulan. Genus ini di Sarawak tidak mempunyai morfologi sinapomorfik yang ketara, disebabkan oleh penyebaran menyesuai dan penspesiesan pulau, justeru tidak mampu memberikan perbezaan genetik yang konklusif berdasarkan ciri- ciri morfologi. Dengan sebilangan besar daripada spesiesnya yang endemik, data molekular yang diperolehi daripada kajian ini berupaya membantu aspek- aspek pemuliharaan genus ini.

Kata kunci : Cryptocoryne, saling- kaitan genetik, analisis filogenetik, RAPD, rbcL, matK, Sarawak