

Pemetaan Marker AFLP untuk Membuat Peta Genetik Bit Gula

Mapping of ALP Marker to Construct a Genetic Map Sugar Beet

Asep Setiawan¹⁾

ABSTRACT

One hundred eighty two AFLP marker using primer combination of EcoRI/MseI and PstI/MseI were used in this study to create a DNA marker genetic map of Sugar beet. In average each primer combination yielded 15.5 polymorphic band. AFLP marker using primer combination of EcoRI/MseI significantly yielded more polymorphic band than PstI/MseI. From this study a high density DNA marker map coverage all nine chromosomes of sugar beet with totally length of 744 cM Haldane was established.

Key words: AFLP, Genetic map, Restriction enzyme, Polymorphic

PENDAHULUAN

Peta genetik terbukti bermanfaat sebagai alat untuk studi genetik. Pembuatan peta genetik pada dasarnya berprinsip pada fenomena keterpautan antara dua gen yang telah lama dikenal oleh Punnett dan Bateson (Suzuki *et al.*, 1986).

Dua gen dikatakan terpaut apabila allel-allel dari kedua gen yang berasal dari tetua yang sama sering atau senantiasa dijumpai pada individu yang sama. Jarak antara dua gen yang terpaut dinyatakan dalam cM. Satu cM didefinisikan sebagai peluang, bahwa 1% rekombinan akan dijumpai dari suatu persilangan. Gen dengan jarak 1 cM akan lebih sulit terpisah dibanding gen dengan jarak 2 cM. Dengan berkembangnya marka molekular, keterpautan genetik kini menjadi semakin penting untuk dikaji dan penggunaannya semakin meluas tidak hanya oleh ahli genetik tapi juga oleh para pemulia dan ahli biologi molekular.

Peta keterpautan berdensitas tinggi untuk beberapa tanaman seperti padi dengan 1300 marker (Kurata *et al.* 1994), tomat dengan 1030 marker (Tanksley, *et al.*, 1992), dan Kedelai dengan 840 marker (Keim *et al.*, 1997). Peta keterpautan dengan densitas tinggi dapat berfungsi untuk berbagai keperluan seperti untuk kromosom walking (Wickman dan Williamson, 1991), marker-based selection untuk mempercepat program pemuliaan (Tanksley *et al.*, 1989; Paterson *et al.*, 1988) dan untuk mendeteksi dan karakterisasi lokus yang mengendalikan sifat kuantitatif atau untuk memfasilitasi diseksi sifat kuantitatif kedalam faktor-faktor genetik yang diskret (Paterson, *et al.*, 1988; Lander dan

Botstein, 1989, Yano *et al.*, 1997, Setiawan *et al.*, 2000).

Peta keterpautan dengan jarak antar marker lebih dari 5 cM dikategorikan sebagai peta yang berdensitas rendah atau moderat (Tanksley, *et al.*, 1992).

DNA marker berbasis PCR Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) yang menjanjikan hasil bebas dari artefak dan dapat diandalkan telah diperkenalkan oleh Vos *et al.* (1995). Keunggulan AFLP selain untuk tanaman telah pula ditunjukkan oleh Majer *et al.* (1996) untuk studi biologi molekular dan keragaman genetik pada cendawan.

Teknik AFLP berbasiskan amplifikasi selektif dari fragmen-fragmen DNA hasil restriksi dari total *genomic DNA* dengan enzim restriksi endonuklease (Vos *et al.*, 1995). Teknik ini melibatkan tiga tahapan utama yaitu: Restriksi DNA dan ligasi adapter-adapter, amplifikasi selektif dari fragment-fragmen restriksi (*restriction fragments*), dan analisis gel dari produk amplifikasi.

Tujuan

Studi ini bertujuan untuk menilai efisiensi AFLP marker dalam menghasilkan marker polimorf, membandingkan dua enzim pemotong jarang yaitu *Eco RI* dan *PstI* dalam menghasilkan marker polimorf dan membuat peta keterpautan marker pada tanaman bit gula yang akan digunakan pada tahap selanjutnya yaitu sebagai basis pemetaan QTL bagi sifat resistensi terhadap penyakit bercak daun *Cercospora*.

¹⁾ Staf Pengajar Jurusan Budidaya Pertanian IPB, Bogor

BAHAN DAN METODE

Ekstraksi DNA

Metode yang digunakan pada prinsipnya seperti yang telah diuraikan oleh Saghai-Marroof et al. (1984). Untuk ekstraksi DNA sebanyak 5 gram daun segar diambil dari setiap tanaman F₂. Daun yang diambil diusahakan yang belum terlalu tua dan tidak kotor. Selanjutnya daun di masukkan dalam kantong plastik dan dikeringkan dengan pengering vakum (vacuum-dryer) selama 3 hari. Daun yang telah kering selanjutnya disimpan pada suhu 20 ° C menunggu saat ekstraksi tiba.

Tempung daun yang ada didalam tabung 50 ml selanjutnya dicampur dengan buffer untuk ekstraksi DNA dan diinkubasi pada suhu 65° C selama 30 – 60 menit. Selanjutnya campuran kloroform-isoamil alkohol (24:1) dengan volume sebanding dengan buffer untuk ekstraksi DNA ditambahkan dalam setiap tabung. Pemisahan DNA dengan komponen sel lain dilakukan dengan sentrifugasi (20 °C 7500 RPM, 20 menit, sentrifugal tipe J2-HC Beckmann). Larutan jernih yang mengandung DNA selanjutnya dipindahkan ke tabung 50 ml lain yang baru. Isopropanol ditambahkan lalu tabung ditaruh dalam es selama 30 menit. Setelah DNA terpresipitasi, selanjutnya DNA dipindahkan kedalam tabung reaksi 2ml. Pelarutan DNA selanjutnya dilakukan dengan menggunakan 1 – 2 ml 0.1 x TE. Konsentrasi DNA selanjutnya diturunkan hingga 10 – 12 ng/µL.

Untuk menguji mutu DNA dilakukan uji restriksi. Secara acak 20 sample DNA diambil untuk direstriksi dengan *EcoRI*. 100 ng DNA di cerna (digesting) dengan menggunakan 5 unit ensim *EcoRI*. Hasil analisa dengan elektroforesis menunjukkan seluruh sample DNA tidak mengalami *partial digestion*.

Analisis AFLP

AFLP dilaksanakan sesuai uraian Vos et al. (1995). Preamplifikasi dilakukan dengan dua primer oligonukleotid *EcoRI*-A (primer yang homolog dengan adapter *EcoRI* dan *MseI*-C (primer yang homolog dengan adapter *MseI*), setiap primer memiliki satu nukleotida selektif. Preamplifikasi dan amplifikasi dilakukan dengan menggunakan Perkin Elmer 9600. Pelabelan primer dilakukan dengan cara melabel primer *EcoRI* +3 dengan radioaktif gamma P33-ATP. Produk amplifikasi dipisahkan pada polyacrylamide gel 6%, 60 watt selama lebih kurang 100 menit. Setelah gel dikeringkan deteksi sinyal dilakukan dengan menggunakan film sinar X (Kodak Biomax MR-I, Eastman Kodak) selama 2 – 3 hari dalam kaset film sinar X.

Skoring data dilakukan secara manual dengan cara memberi skor A/C atau B/D untuk satu AFLP marker. A = tidak ada pita, C = ada pita yang diperoleh dari tetua 1. B = tidak ada pita, D = ada pita yang diperoleh dari tetua 2.

Penyusunan peta genetik

Untuk menyusun peta genetik dari populasi F₂ hasil silangan dua tetua yaitu no 93164P dan no. 95098P digunakan program Mapmaker/EXP 3.0 (Lander et al., 1987; Lincoln et al., 1993). Marker-marker dalam kromosom dikatakan terpaut apabila mereka tidak bersegregasi secara bebas. Perintah group dengan LOD skore = 4 dan jarak 25 cM Haldane ditetapkan sebagai kriteria untuk menetapkan keterpautan antar marker. Prosedur detail penggunaan Mapmaker dapat dilihat pada manual Mapmaker/exp 3.0.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dalam penelitian ini 189 DNA total dari tanaman F₂ dan tetuanya dianalisa menggunakan teknik AFLP. Delapan primer kombinasi *EcoRI*/*MseI* (E/M) dan enam primer kombinasi *PstI*/*MseI* (P/M) digunakan dalam penelitian ini. Ke 15 primer kombinasi ini diperoleh dari hasil screening primer yang dilakukan terhadap 7 tanaman F₂. Ke 8 E/M primer kombinasi menghasilkan 151 pita polimorf atau rata-rata 18.8 pita polimorf per primer kombinasi. Kombinasi P/M primer menghasilkan 66 pita polimorf dengan rata-rata 11 pita polimorf per primer kombinasi. Secara-rata-rata jumlah pita polimorf yang dihasilkan oleh kombinasi primer E/M nyata lebih tinggi dari pada yang dihasilkan oleh P/M. (Tabel 1.).

Pada studi ini 217 lokus AFLP marker telah dianalisa. Contoh pola pita AFLP dapat dilihat pada gambar 1. Secara keseluruhan 14 primer kombinasi yang digunakan menghasilkan secara rata-rata 15.5 pita polimorf.

Keunggulan AFLP telah dilaporkan oleh banyak penulis setelah teknologi AFLP diintroduksi oleh Vos et al. (1995). Banyak peta marker telah disusun dengan menggunakan AFLP marker. Pada bit gula misalnya oleh Schondelmaier et al. (1996) dan Barnes et al. (1996). Penyusunan peta marker berdensitas tinggi pada kentang juga telah dilakukan oleh Qi dan Lindhout (1997) serta van Eck et al. (1995). Keunggulan AFLP salah satunya adalah karena marker ini efisien dalam menghasilkan polimorfisme dibanding marker lainnya (Schondelmaier, et al., 1996). Studi ini juga menunjukkan hal serupa, AFLP dinilai efisien menghasilkan pita polimorf.

Table 1. Pita polimorf AFLP pada 189 tanaman F2. Menggunakan kombinasi primer E/M = *EcoRI/MseI* dan P/M = *PstI/MseI*.

Primer kombinasi E/M	Jumlah pita polimorf	Primer kombinasi P/M	Jumlah pita polimorf
E35/M62	12	P34/M50	9
E35/M51	14	P31/M50	10
E35/M47	17	P32/M47	10
E35/M50	19	P33/M59	10
E34/M59	21	P31/M59	11
E38/M47	18	P33/M47	16
E33/M59	22	-	-
E31/M62	28	-	-
Total	151	Total	66
Mean ± std ⁾	18.9 ± 5.0	Mean ± std	11.0 ± 2.53

⁾ Std = standar deviasi; Berdasar t-student test ($\alpha = 0.01$), jumlah rata-rata pita polimorfik yang dihasilkan oleh kombinasi primer E/M nyata lebih tinggi dari pada P/M ($t_{hitung} = 3.864 > t_{tabel} = 2.90$).

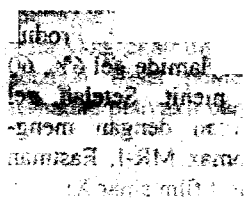
Dalam percobaan dengan tanaman sugar bit, dari 5 gram daun segar rata-rata dapat diperoleh sebanyak 200 ug DNA. Digunakannya 5 gram daun mengingat selain AFLP analisa RFLP juga akan dilakukan pada populasi ini. Sebelum PCR, jumlah dan kualitas dari DNA hendaknya diperiksa. Hanya diperlukan nanogram DNA untuk pelaksanaan AFLP. Akan tetapi DNA hendaknya diupayakan memiliki kualitas yang memadai untuk menghindari adanya artefak. Kontaminasi dengan DNA asing harus dihindari selama penanganan DNA, kontaminasi DNA sedikit saja dapat berakibat timbulnya artefak karena sistem marker ini berbasis PCR. Satu fragmen DNA asing saja berpotensi untuk diamplifikasi.

Fase kritis dalam AFLP adalah saat pemotongan dengan enzim restriksi. Digesti parsial harus dihindari sebab hal ini dapat berakibat timbulnya artefak (Vos *et al.*, 1995). Untuk menghindari hal ini maka uji restriksi perlu dilakukan sebelum tahapan pemotongan ganda dengan menggunakan dua jenis enzim dilakukan. DNA yang terpotong sempurna akan terlihat sebagai smear pada elektroforesis. Apabila ada indikasi DNA tidak terpotong dengan sempurna maka pemurnian DNA

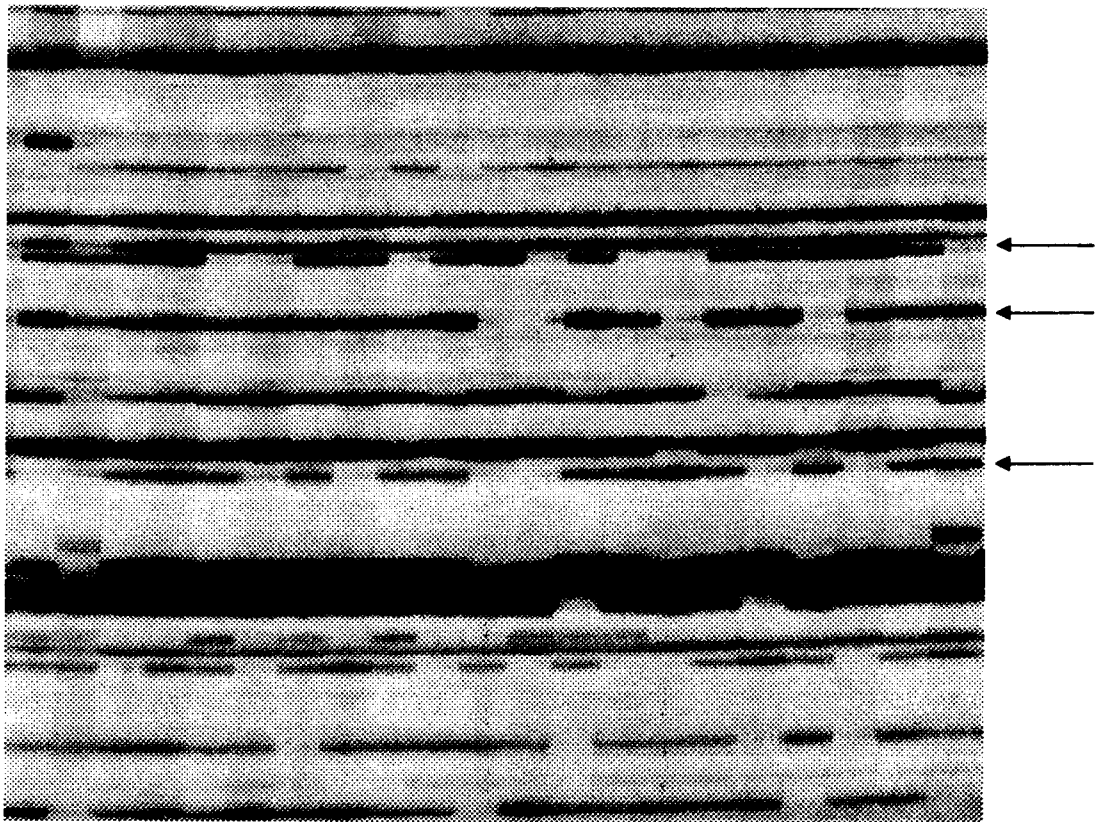
harus dilakukan. DNA yang tidak murni, biasanya akibat adanya kontaminasi fenol atau bahan penyusun sel lain. Hal ini seringkali menjadi penyebab terjadinya partial digestion.

Langkah pertama dalam AFLP adalah restriksi ganda dari DNA menggunakan dua enzim berbeda yaitu enzim pemotong jarang dan pemotong sering yang diikuti dengan pemasangan adapter yang akan mengapit fragmen DNA. Enzim pemotong jarang yang digunakan adalah enzim yang mengenal 6 basa pada situs pemotongan dalam hal ini *Eco RI* dan enzim pemotong sering yang di pakai adalah *MseI* yang mengenal 4 sekuen basa pada situs pemotongan.

Pemotong sering *Mse I* menghasilkan fragmen DNA berukuran kecil dalam jumlah banyak. Kombinasi enzim pemotong jarang dan pemotong sering diharapkan dapat menghasilkan jumlah optimum fragmen DNA yang dihasilkan sehingga pola pita AFLP nantinya dapat diskor dengan baik. *Eco RI* banyak digunakan sebab enzim ini dinilai relatif murah dan masalah restriksi partial relatif sedikit (Vos *et al.*, 1995). Penggunaan *PstI* yang juga *hexameric* dimaksudkan untuk mendapatkan penyebaran.

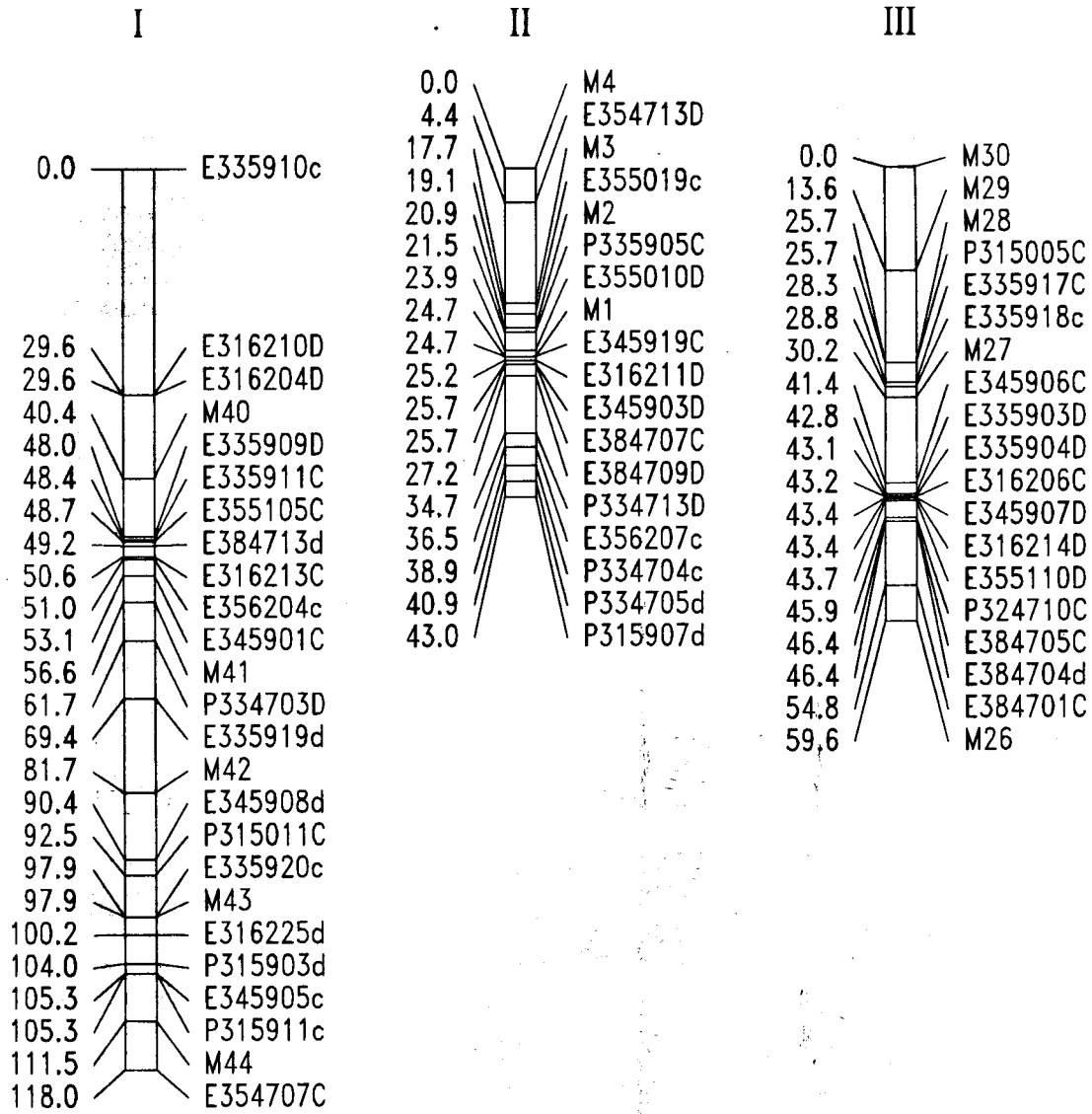


1 2 3.....19 20 21

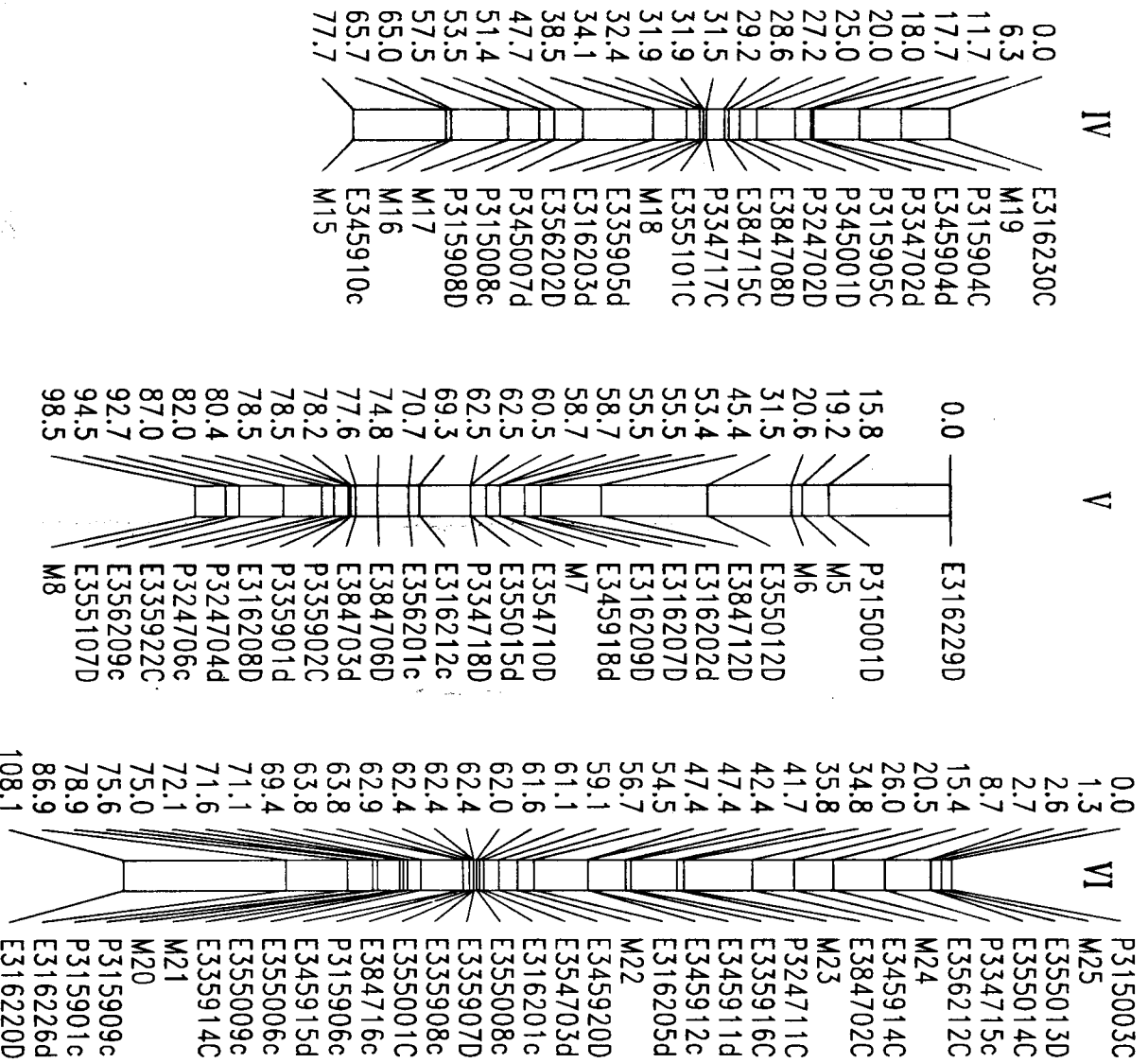


Gambar 1. Sebagian dari autoradiogram AFLPs dengan menggunakan primer kombinasi *EcoRI-ACA/MseI-CCA*. Panah menunjukkan marker yang polimorfik diantara tanaman F₂. Jalur 1 adalah pola pita tetua resisten terhadap *cercospora*. Jalur ke 21 adalah pola pita dari tetua peka. Jalur 2 – 20 adalah pola pita dari tanaman F₂. Waktu eksposisi adalah tiga hari.

Abstrak penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pola pita tetua resisten terhadap *cercospora* pada tanaman F₂ yang dihasilkan dari persilangan antara tetua resisten dan tetua peka. Waktu eksposisi adalah tiga hari.

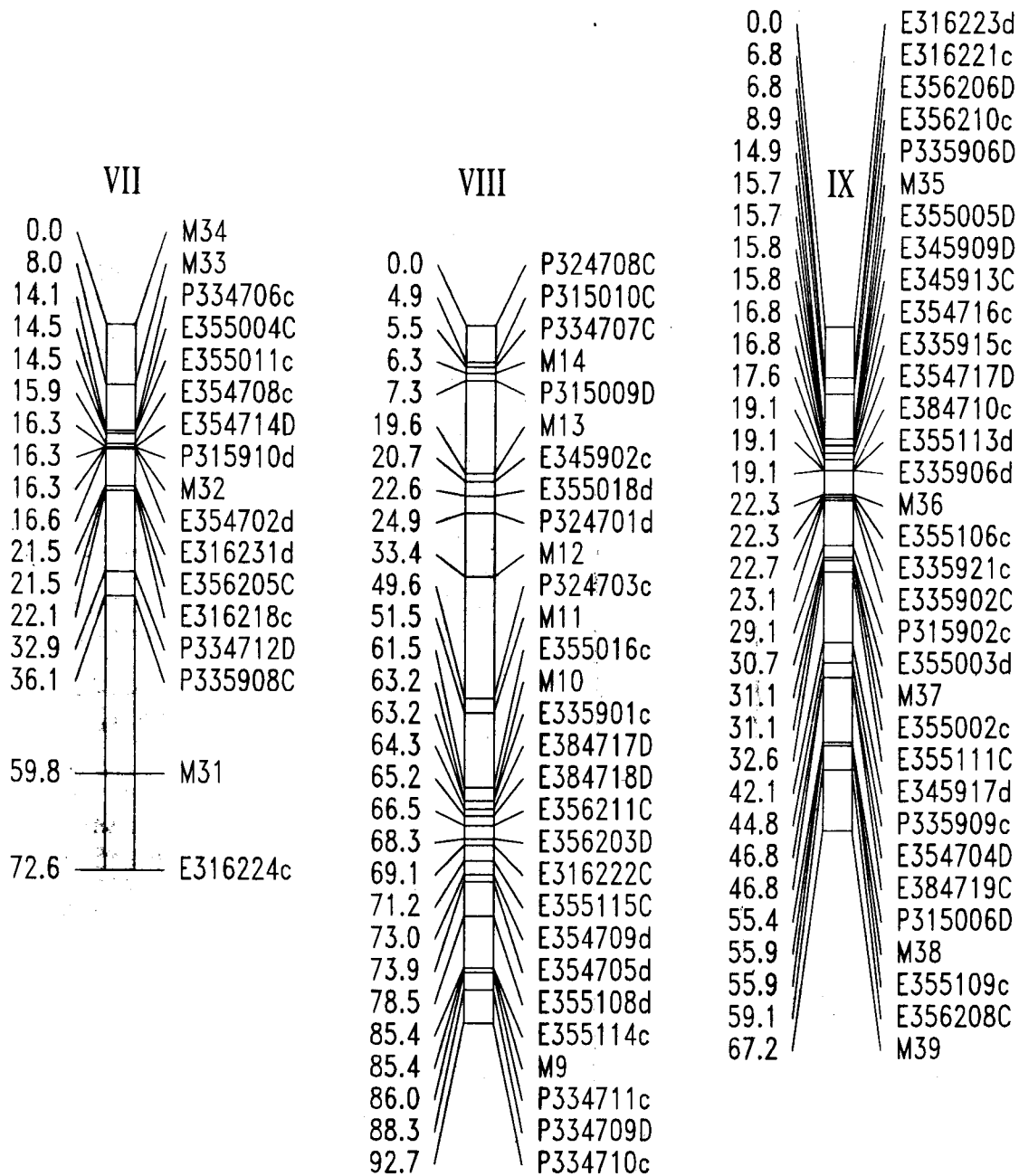


Gambar 2. Peta keterpautan genetik dari populasi F₂ population yang terdiri atas 226 lokus tersebar pada 9 linkage groups. Kode lokus marker terletak disebelah kanan dan jarak antar marker dalam cM Haldane terletak disebelah kiri. M are RFLP marker, E or P are AFLP marker dengan primer kombinasi *EcoRI/MseI* or *PstI/MseI*. Penomoran kromosom mengikuti Schondelmaier dan Jung (1977)



Gambar 2. Lanjutan

400
 1000
 1500
 2000
 2500
 3000
 3500
 4000
 4500
 5000
 5500
 6000
 6500
 7000
 7500
 8000
 8500
 9000
 9500
 10000
 10500
 11000
 11500
 12000
 12500
 13000
 13500
 14000
 14500
 15000
 15500
 16000
 16500
 17000
 17500
 18000
 18500
 19000
 19500
 20000
 20500
 21000
 21500
 22000
 22500
 23000
 23500
 24000
 24500
 25000
 25500
 26000
 26500
 27000
 27500
 28000
 28500
 29000
 29500
 30000
 30500
 31000
 31500
 32000
 32500
 33000
 33500
 34000
 34500
 35000
 35500
 36000
 36500
 37000
 37500
 38000
 38500
 39000
 39500
 40000
 40500
 41000
 41500
 42000
 42500
 43000
 43500
 44000
 44500
 45000
 45500
 46000
 46500
 47000
 47500
 48000
 48500
 49000
 49500
 50000
 50500
 51000
 51500
 52000
 52500
 53000
 53500
 54000
 54500
 55000
 55500
 56000
 56500
 57000
 57500
 58000
 58500
 59000
 59500
 60000
 60500
 61000
 61500
 62000
 62500
 63000
 63500
 64000
 64500
 65000
 65500
 66000
 66500
 67000
 67500
 68000
 68500
 69000
 69500
 70000
 70500
 71000
 71500
 72000
 72500
 73000
 73500
 74000
 74500
 75000
 75500
 76000
 76500
 77000
 77500
 78000
 78500
 79000
 79500
 80000
 80500
 81000
 81500
 82000
 82500
 83000
 83500
 84000
 84500
 85000
 85500
 86000
 86500
 87000
 87500
 88000
 88500
 89000
 89500
 90000
 90500
 91000
 91500
 92000
 92500
 93000
 93500
 94000
 94500
 95000
 95500
 96000
 96500
 97000
 97500
 98000
 98500
 99000
 99500
 100000



Gambar 2. Lanjutan

Klustering marker secara umum terjadi pada bagian tengah peta. Kromosom VII, VIII dan IX cenderung memiliki klustering mengarah kepinggir. Klustering pada bagian tengah kromosom memang diharapkan pada kromosom yang bersifat metasentrik, dimana sentromernya berada di tengah kromosom. Sangat beralasan bahwa didaerah marker yang lebih

baik. Menurut Barnes *et. al.* (1996) AFLP menggunakan *EcoRI* menghasilkan marker yang relatif kurang menyebar dibanding AFLP menggunakan *PstI*. Enzim *PstI* yang dikenal sebagai sensitive metilasi (methylation sensitive enzyme) diketahui menghasilkan fragmen lebih sedikit dibanding ensim non sensitif metilasi *EcoRI*. Jung (1992) melaporkan bahwa

genome bit gula sangat kaya dengan sekuen berulang dan metilasi paling banyak terjadi pada daerah ini. Kidwell (1998) dalam studi diversitas melaporkan bahwa kombinasi *Pst* I/*Mse*I menghasilkan tingkat diversitas yang lebih rendah dibanding menggunakan kombinasi *Eco*RI/*Mse*I. Tingkat diversitas rendah ini kemungkinan berkaitan dengan lebih sedikitnya polimorf yang dihasilkan oleh AFLP berbasis *Pst*I dibanding AFLP berbasis *Eco*RI.

Kesalahan dalam scoring data merupakan hal yang kritis dalam studi yang melibatkan banyak individu dan marker. Untuk mengurangi kesalahan maka penelitian harus dipersiapkan dengan perencanaan yang baik. Kemungkinan tertukarnya contoh DNA individu tanaman dan kontaminasi DNA harus dicegah. Kesalahan dalam skoring masih dapat dikoreksi akan tetapi kesalahan akibat tertukarnya DNA contoh tidak lagi mungkin diperbaiki. Karena ini robotisasi menjadi trend dalam teknologi marker yang bekerja dengan populasi dalam jumlah besar.

AFLP termasuk kodominan marker (Vos, *et al.*, 1995) akan tetapi dalam studi ini 80 % AFLP marker diskor sebagai dominan marker. Hal ini dilakukan karena seringkali ada keraguan dalam menetapkan intensitas sinyal suatu lokus marker sebagai heterosigot atau homosigot. Dengan diskor sebagai dominan marker maka lokus heterosigot tidak dapat dibedakan dengan lokus homosigot dominan. McKill *et al.* (1996) juga melakukan skor dominan terhadap AFLP marker pada tanaman padi akibat sulitnya menskor data AFLP sebagai marker kodominan, demikian juga Kiem *et al.*, (1997) yang bekerja dengan kedelai. Kesalahan skoring juga mempengaruhi presisi peta genetik (Sael dan Nilsson, 1996) oleh karena itu apabila ada keraguan maka lebih baik menskor AFLP sebagai dominan marker dari pada sebagai kodominan marker.

DNA dari populasi F₂ hasil silangan 93164P dan 95098P digunakan menyusun peta genetik. Walaupun peta genetic bit gula telah banyak dibuat (Barzen, *et al.*, 1992; Hallden *et al.*, 1996; Barnes *et al.*, 1996; Pillen *et al.*, 1993; Schondelmaier *et al.*, 1996; Schumacher *et*

al., 1997) peta keterpautan berdasarkan populasi aktual yang ada setiap waktu harus dibuat lagi karena populasi aktual tersebut mungkin mengekspresikan suatu sifat tertentu yang diinginkan. Dalam studi ini sifat ketahanan terhadap *Cercospora* menjadi target. Jadi penyusunan peta marker ini sebenarnya merupakan bagian awal dari usaha pemetaan sifat kuantitatif untuk ketahanan terhadap penyakit bercak daun (*Cercospora beticola* Sacc.) pada bit gula.

Dari studi ini berhasil dibuat peta sepanjang 744 cM Haldane yang meliputi seluruh seluruh kromosom haploid bit gula yang berjumlah sembilan kromosom ($n = 9$). Peta molekuler bit gula lain yang telah ada saat ini antara lain memiliki panjang 1057 cM Haldane (Pillen *et al.*, 1993), 688 Haldane cM (Schumacher, 1997) dan 557 cM Haldane (Schondelmaier *et al.*, 1996). Hal ini mengindikasikan bahwa panjang peta dari studi ini secara umum sebanding dengan peta yang telah ada. Tidak ada informasi berapa panjang sebenarnya peta sugar beet dapat dianggap lengkap. Oleh karena itu adalah lebih baik berfikir konservatif. Bila asumsi 1057 cM adalah peta lengkap maka studi ini telah berhasil mengcover 70% genom bit gula.

Dari 261 polimorfik marker yang digunakan dalam studi ini, sebanyak 226 marker berhasil dikelompokkan kedalam sembilan kelompok (Gambar 2). Pada Gambar 2 selain 182 AFLP marker terdapat juga 44 RFLP marker. Dalam tulisan ini marker RFLP tidak dibahas lebih lanjut, hal ini semata-mata dilakukan agar tulisan dapat terfokus hanya pada AFLP marker. Seperti terlihat pada Tabel 4. Terdapat dua kromosom yang memiliki panjang lebih dari 100 cM, dan satu kromosom dengan panjang kurang dari 50 cM. Kromosom I adalah yang terpanjang (118.2 cM dan Kromosom II adalah yang terpendek yaitu 43.2 cM (Tabel 2). Meskipun dalam peta marker seperti tersaji pada gambar 2 terdapat tiga jarak antar marker yang lebih dari 20 cM, jarak rata-rata antara marker pada peta tersebut yang adalah 3.1 cM. Dengan demikian peta ini dapat dikategorikan dalam peta dengan densitas tinggi.

Table 2: Penyebaran marker dan panjang peta genetik

Chromosome	RFLP ⁴⁾	AFLP <i>Pst</i> I/ <i>Mse</i> I ¹⁾	AFLP <i>Eco</i> RI/ <i>Mse</i> I ²⁾	Total	cM ³⁾
I	5	4	16	25	118.2
II	4	5	9	18	43.2
III	5	2	12	19	59.7
IV	5	9	9	23	81.4
V	4	6	17	27	98.6
VI	6	6	23	35	107.9
VII	4	4	9	17	74.6
VIII	6	9	14	29	92.9
IX	5	4	24	33	67.5
Total	44	49	133	226	744

¹⁾ AFLP markers menggunakan *Pst*I and *Mse*I.

²⁾ AFLP markers using *Eco*RI and *Mse*I.

³⁾ cM adalah menggunakan fungsi Haldane (Haldane 1919); Penomoran kromosom mengikuti sistem penomoran yang digunakan oleh Schondelmaier and Jung (1997)

⁴⁾ RFLP marker tidak dibahas dalam tulisan ini sebagai upaya memfokuskan pembahasan pada AFLP marker sekitar sentromer memiliki frekuensi rekombinasi yang rendah. Bosemark dan Bormotov (1971) melaporkan bahwa kromosom bit gula adalah bersifat metasentri atau sub metasentrik, ini berarti terjadinya klustering yang condong mengarah kepinggir pada kromosom VII, VIII dan IX bukanlah disebabkan oleh posisi sentromer.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Prof. C. Jung dan Dr. Koch dari Dept. of crop Sci. and Plant Breeding, Kiel University Germany atas segala bimbingan dan bantuannya selama penelitian ini berlangsung.
2. Ms. M. Bruisch atas bantuan teknisnya
3. DAAD yang telah membiayai penulis selama penelitian ini berlangsung.

DAFTAR PUSTAKA

- Barnes S., Massaro, G., Lefebvre, M., Kuiper, M., Verstege, E. 1996. A Combined RFLP and AFLP genetic map for sugar beet. Proceedings of the 59th IIRB Congress.
- Barret, B.A., Kidwell, K.K., Fox, P.N. 1998. Comparison of AFLP and Pedigree-Based Genetic Diversity Assessment Methods Using Wheat Cultivars from the Pacific Northwest. *Crop Sci.* 38:1271-1278.
- Barzen, E., Mechelke, W., Ritter, E., Kappert, E.S. 1995. An extended map of the sugar beet genome containing RFLP and RAPD loci. *Theor. Appl. Genet.* 90:189-193.
- Bosemark, N.O., Bormotov, V.E. 1971. Chromosome morphology in a homozygous line of sugar beet. *Hereditas* 69:205-212.
- Haldane JBS. 1919. The combination of linkage value and the calculation of distance between the loci of linked factors. *J. Genet.* 8:299-309.
- Halldén, C., Hjerdin, A., Rading, I. M., Säll, T., Fridlundh, B., Johannisdottir, G., Tuveesson, S., Akesson, C., Nilsson, N-O. 1996. A high density RFLP linkage map of sugar beet. *Genome* 39:634-645.
- Keim, P., Schupp, J.M., Travis, S.E., Clayton, K., Zhu, T., Shi, L., Ferreira, A., Webb, D.M. 1997. A High-Density Soybean Genetic Map Based on AFLP Markers. *Crop Sci.* 37: 537-543.
- Kurata, N., Nagamura, Y., Yamamoto, K., Harushima, Y., Sue, N., Wu, J., Antonio, B.A., Shomura, A., Shimizu, T., Lin, S.Y., Inoe, T., Fukuda, A., Shimano, T., Kubiki, Y., Toyama, T., Miyamoto, Y., Kirihara, T., Hayasaka, K., Miyao, A., Monna, L., Zhong, H.S., Tamura, Y., Wang, ZX., Momma, T., Umehara, Y., Yano, M., Sasaki, T., Minobe, Y. 1994. A 300-kilobase-interval genetic map of rice including 883 expressed sequences. *Nature Genet.* 8:365-372.

- Lander, E.S., Green, P., Abrahamson, J., Barlow, A., Daly, M.J., Lincoln S.E. Newburg, L. 1987. Mapmaker: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174-181.
- Lincoln, S.E., Daly, M.J., Lander, E.S. 1993. Constructing genetic linkage maps with MAPMAKER/EXP version 3.0: A tutorial and reference manual.
- Majer, D., Mithen, R., Lewis, B.G., Vos, P., Oliver, R. P. 1996. The use of AFLP finger printing for the detection of genetic variation in fungi. *Mycol. Res.* 100 (9): 1107-1111.
- Mckill, D.J., Zhang, Z., Redona, E.D., Colowit, P.M. 1996. Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. *Genome* 39:969-977.
- Paterson, A. H., Lander, E. S., Hewitt, J.D., Peterson, S., Lincoln, S. E., Tanksley, S. D. 1988. Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature* 335:721-726
- Pillen, K., Steinrücken, G., Herrmann, R.G., Jung, C. 1993. An extended linkage map of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) including nine putative lethal genes and their restorer gene X. *Plant Breeding* 111: 265-272.
- Qi, X., Lindhout, P. 1997. Development of AFLP markers in barley. *Mol Gen Genet* 254: 330-336.
- Säll, T., Nilsson, N-O. 1994. The robustness of recombination frequency estimates in intercrosses with dominant markers. *Genetics* (137):589-596
- Schodelmaier, J., Steinrücken, G. and Jung, C. 1996. Integration of AFLP markers into a linkage map of sugar beet (*Beta vulgaris* L). *Plant Breeding* 115: 231-237.
- Schondelmaier, J., Jung, C. 1997. Chromosomal assignment of the nine groups of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) using primary trisomics. *Theor. Appl. Genet.* 95:590-596.
- Schumacher, K., Schondelmaier, J., Barzen, E., Steinrücken, G., Borchardt, D., Weber, W.E., Jung, C., Salamini, F. 1997. Combining different linkage maps in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) to make one map. *Plant Breeding* 116: 23-38.
- Setiawan, A., G. Koch, S.A. Barnes, C. Jung. 2000. Mapping Quantitative trait loci (QTLs) for resistance to cercospora leaf spot disease (*Cercospora beticola* Sacc.) in Sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Theor. Appl. Genet.* 100 (8): 1176-1182
- Shagai-Marroof, M.A., Soliman, K.M., Jorgensen, R.A., Allard, R.W. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 8014-8018.
- Tanksley, S.D., Young, N. D., Paterson, A. H., Bonierbale. 1989. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. *Bio Technology* 7: 257- 264.
- Van Eck H.J., van der Voort, J. R., Draaistra, J., van Zandvoort, P., van Encvort, E., Segers, B., Peleman, J., Jacobsen, E., Helder, J., Bakker, J. 1995. The inheritance and chromosomal localization of AFLP markers in a non-inbred potato offspring. *Molecular Breeding* 1: 397-410. 1995.
- Wicking, C., Williamson B. 1991. From linked marker to gene. *Trends Genet.* 7: 288-293.
- Zuzuki D.T., Griffiths, A. J. F., Lewontin, R.C. 1981. *An Introduction to Genetic Analysis*. 2nd ed. W.H. Freeman and Co. San Francisco. 911p.