

OSNOVE GENSKEGA KARTIRANJA KMETIJSKIH RASTLINAndreja ČERENAK¹, Branka JAVORNIK²UDK / UDC 631.528.6:631.52 (045)
pregledni znanstveni članek / review article
prispelo / received: 14.10.2008
sprejeto / accepted: 22.12.2008**IZVLEČEK**

Namen sedanjega žlahtniteljskega programa, ki je kombinacija klasičnega in molekularnega pristopa, je razvoj sort hmelja z izboljšano kvaliteto in kvantiteto pridelka. Tehnologija molekularnih markerjev, pri kateri dobimo veliko število polimorfizmov neodvisno od vplivov okolja se zelo uspešno uporablja pri izdelavi genskih kart. V prispevku je predstavljena osnovna teorija in metode sicer zahtevnega genskega kartiranja.

Ključne besede: gensko kartiranje, žlahtnjenje, kmetijske rastline

THE BASIS OF GENETIC MAPPING OF AGRICULTURAL PLANTS**ABSTRACT**

Current hop breeding program, combining classical and molecular approach, is aimed at developing hop cultivars with improved quality and quantity. The molecular marker technology with the ability to generate large number of polymorphisms independent of environmental factors has been proven to be very useful in the construction of genetic maps. In the article the basic theory and methods are discussed in complex approach of genetic mapping.

Keywords: genetic mapping, breeding, agricultural plants

¹ Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Cesta Žalskega tabora 2, SI-3310 Žalec

² Biotehniška Fakulteta, Katedra za genetiko, biotehnologijo in žlahtnjenje rastlin, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana

1 UVOD

Izbiro ustrezne metode žlahtnjenja narekujejo specifične lastnosti hmeljne rastline (trajna, dvodomna rastlinska vrsta, storžke razvijejo le ženske rastline). Zaradi dvodomnosti so hmeljne rastline genetsko zelo heterozigotne, kar se odraža v veliki genski variabilnosti potomcev. Težava pri žlahtnjenju hmelja je njegova dolgotrajnost, saj traja vzgoja sort najmanj 10 let. Splošni interes panoge je čim hitrejši odziv žlahtnjenja na potrebe pridelovalcev in pivovarske industrije. Pri številnih razširjenih kmetijskih rastlinah se je izkazalo, da lahko sodobni molekulske genetski pristopi bistveno prispevajo k učinkovitejši vzgoji izboljšanih novih sort. Pri hmelju je zastavljen program, ki povezuje klasično žlahtnjenje z molekulske genetskimi pristopi, ki lahko s svojimi rezultati skrajšajo vzgojo novih sort in omogočajo ekonomsko bolj opravičeno pridelovanje hmelja. Orodja, kot so razvoj molekulskih markerjev in izdelava genskih kart za identifikacijo markerjev povezanih z npr. vsebnostjo alfa kislin, pridelkom in odpornostjo na *Verticillium*, bi lahko neposredno služila v žlahtnjenju hmelja. Hmeljni genom je v primerjavi z ostalimi kmetijskimi rastlinami še vedno slabo raziskan, kljub intenzivnejšim raziskavam predvsem v deželah pridelovalkah oz. žlahtniteljicah hmelja.

Gensko kartiranje se je pri številnih rastlinskih vrstah izkazalo za zelo učinkovito pri identifikaciji in izolaciji pomembnih genov, ki kontrolirajo tako kvalitativne kot kvantitativne lastnosti. Klasični postopki določanja agronomsko pomembnih lastnosti rastlin temeljijo na različnih morfoloških, fenoloških in agronomskih markerjih, vendar je njihova slabost praviloma delovna, predvsem pa časovna dolgotrajnost. Vključitev genskih kart v klasično žlahtnjenje lahko tako poveča učinkovitost žlahtnjenja in selekcijskih programov.

2 KAJ JE GENSKO KARTIRANJE

Genska karta vrste je abstraktni model linearnega zaporedja skupin genov in markerjev. Pri izdelavi genskih kart ločimo dva pristopa, in sicer **gensko kartiranje**, ki temelji na pojavu vezanosti genov in ugotavljanju pogostnosti rekombinacij, ter **fizično kartiranje**, ki se opira na citogenetske metode (označevanje kromosomskih fragmentov, *in situ* hibridizacija) in tehnologijo rekombinantne DNA. Fizično kartiranje je torej orodje za povezavo med DNA sekvencami in lastnostmi. Gensko kartiranje nam daje bolj ali manj natančno oceno razdalje med geni ali genskimi markerji na istem kromosomu, metode fizičnega kartiranja pa nam pokažejo mesto na kromosomu, kjer se geni ali genski markerji nahajajo. Za fizično kartiranje so potrebni DNA vektorji (kozmid, YAC, BAC), ki se uporabljajo za kloniranje večjih delov DNA. Izdelava citogenetskih kart je enostavnejša za vrste z večjimi kromosomi.

Gensko kartiranje se opira na dejstvo, da se geni, ki so na istem kromosomu, dedujejo vezano. Medsebojna oddaljenost različnih lokusov se ocenjuje na osnovi pogostnosti pojavljanja rekombinacij. Pogostnost rekombinacij vzdolž celotnega genoma ni popolnoma enaka, prav tako pa je razmerje med genetsko razdaljo, merjeno v cM in fizično razdaljo, merjeno z baznimi pari različno pri različnih vrstah, zato enostavno primerjanje med različnimi vrstami organizmov ni možno.

Osnovni cilj kartiranja je tesna povezanost markerja in fenotipske lastnosti ter njuno skupno dedovanje pri kontroliranem križanju. Vezani markerji lahko predstavljajo neprecenljivo vrednost pri žlahtnjenju s pomočjo markerjev (MAS – Marker Assisted Selection). MAS omogoča večjo učinkovitost selekcije zaradi zmanjšanja velikosti rastlinske populacije in

možnosti selekcije na zgodnji razvojni stopnji rastlin. Prisotnost tesne povezave (< 5 cM med genom in markerjem) omogoča uporabnost markerja v selekciji sejančkov. Uporaba MAS ima zlasti veliko uporabno vrednost pri trajnih rastlinskih vrstah [14].

Pri **primerjalnem genskem kartiranju** temeljimo na primerjavi genskih kart med različnimi vrstami. Omogoča nam odkritje sinteničnih skupin, ki so skozi evolucijo ostale ohranjene pri različnih vrstah. Novejša oblika genskih kart so dogovorne (angl. consensus) genske karte, ki združujejo informacije več različnih populacij iste vrste in je zato razpored markerjev robusten. Dogovorne karte so osnova za filogenetske študije in raziskave genov povezanimi z npr. pomembnimi lastnostmi pri rastlinah, živalih ali ljudeh.

Medtem ko so za pšenico, koruzo, ječmen, riž, sončnico, lečo in številne druge agronomsko pomembne rastlinske vrste genske mape že zelo izdelane, pa je pri nekaterih rastlinah ta proces še nekoliko v zaostanku.

3 IZBIRA USTREZNE POPULACIJE ZA GENSKO KARTIRANJE

Za uspeh kartiranja je zelo pomembna izbira genetskega materiala za križanja. Najpogosteje se uporabljajo potomci F_2 generacije, povratnih križanj, dihaploidi ali RILs (Recombinant Inbred Lines). Najbolj informativne so F_2 populacije z uporabo kodominantnih markerjev. Testiranje potomcev F_2 generacije se pogosto uporablja pri genskem kartiranju, ko fenotip ni izražen konsistentno (npr. odpornost na bolezn) ali ko lastnost določajo QTLi (kvantitativni lokusi).

Populacije povratnih križanj so lahko uporabne za kartiranje dominantnih markerjev, če so vsi lokusi rekurentne komponente homozigotni in če imata dajalec in prejemnik nasprotno polimorfne markerje. Pri manjši zasičenosti markerjev (> 15 % rekombinacij) so populacije povratnih križanj bolj informativne v primerjavi z RIL. Povečano število rekombinacij je koristno za tesne povezave, a je lahko neželeno pri izdelavi kart z nizko nasičenostjo markerjev [22].

Pri naravnih populacijah iz etičnih, ekonomskih ali časovnih razlogov ni možno izvesti sistematična kontrolirana križanja (npr. pri človeku, nekaterih živalskih in drevesnih vrstah,...). V teh primerih so faze vezanosti genov običajno neznane. Populacija je genetsko heterogena in velikosti družin so običajno premajhne, da bi lahko izvedli analizo znotraj družine. Pri določenih rastlinskih vrstah je zaradi izrazite inbriding depresije [6], samoinkompatibilnosti ali dvodomnosti vzgoja omenjenih populacij otežkočena ali onemogočena. Nadomestna metoda v teh primerih je tako imenovano dvojno pseudotestno križanje, pri katerem križamo dve zelo heterozigotni akcesiji in naredimo na osnovi segregacijske analize F_1 potomcev neodvisni karti za oba starševska genotipa [8]. Omenjeno križanje se je izkazalo za primerno pri konstruiranju genskih kart različnih trajnih rastlinskih rodov in vrst, kot so jabolana [15], *Prunus* sp. [12], navadna smreka [1], *Eucalyptus* sp. [17], japonska kriptomerija [23], *Pinus* sp. [25], *Populus* sp. [4], zaradi primernosti uporabe pa se uporablja tudi pri hmelju.

Uporabnost karte je odvisna od povezav markerjev z lastnostmi, zato je pomembno, da v analizo vključimo čim večje število morfoloških lastnosti vključenih osebkov. Zelo pomemben je izbor staršev uporabljenih v družini križanja, saj stopnja polimorfizma odločilno vpliva na stopnjo segregacije pri potomcih. Vsekakor so v tem v prednosti

tujeprašnice pred samoprašnicami. Pri križanjih adaptirane in divje dednine prihaja do motenj pri parjenju kromosomov in rekombinacijskih frekvencah. Pri analizi populacije potomcev, nastale s križanjem divjega starša, zasledimo veliko število polimorfizmov v primerjavi s potomci, nastalimi s križanjem v ožjem sorodstvu [22]. Pri odbiri čim manj sorodnih staršev si pomagamo s podatki o morfološki, geografski ali molekularni variabilnosti, slednja se danes pri velikem številu rastlinskih vrst vedno bolj uveljavlja.

4 IZDELAVA GENSKE KARTE

Skupina vezanih markerjev (ang. linkage group) je biološko gledano skupina genov, ki se nahajajo na istem kromosomu, statistično gledano pa je to skupina lokusov, ki se pri določenih statističnih pogojih deduje skupaj. Pogoji za združevanje v skupine morajo biti izbrani tako, da je rezultat čim bolj informativen. Karakteristike dobrega postopka tvorjenja skupin so:

- Število skupin mora sovpadati z biološkimi pričakovanji (npr. s haploidnim številom kromosomov).
- Velikost vezanih skupin markerjev mora biti optimalna. Prevelike skupine nakazujejo napačno vezanost ali premalo stroge kriterije tvorjenja skupin. Premajhne skupine vezanih markerjev pa označujejo slabo kvaliteto podatkov, majhen vzorec ali majhno število markerjev.

V prvem koraku kartiranja tvorimo skupine markerjev na osnovi ocen pogostnosti rekombinacij med posameznimi lokusi. Če izdelujemo karto s skupino markerjev, ki še niso bili kartirani, je zaradi pravilnosti rezultatov potrebno razvrstiti podatke z dovolj veliko *lod* vrednostjo. **Lod vrednost** ($Z(\theta)$) (angl. lod of odds) je statistično merilo za ocenjevanje vezanosti dveh markerjev. Po definiciji je *lod* logaritem pogostnosti rekombinacij, ki jih opazujemo pri določeni frekvenci rekombinacij v primerjavi s hipotezo, da opazovani podatki predstavljajo neodvisno dedovanje ($\theta = 0,5$). Z dovolj visoko postavljeno vrednostjo *lod* onemogočimo povezavo skupin markerjev, ki se nahajajo na različnih kromosomih. V idealnem primeru se število skupin ujema s številom kromosomov v haploidnem stanju.

Funkcije genskega kartiranja opisujejo matematični odnos med pogostnostjo rekombinacij (r) in razdaljo na karti (x). Razdalja na karti med dvema markerjema je odvisna od povprečnega števila rekombinacij med njima. Dejanski odnos pa je odvisen tudi od stopnje interference med rekombinacijami. Interferenca pomeni, da imajo rekombinacijski dogodki v medsebojni bližini vpliv na ostale rekombinacije. Interferenca se spreminja glede na organizem, lokacijo prekrižanja, dejavnike okolja in številne ostale faktorje. Meri se s koeficientom skladnosti, ki izraža razmerje med opazovanim in pričakovanim dvojnimi prekrižanjem kromosomov.

Računalniški programi za ugotavljanje povezav med markerji ocenjujejo razdalje na osnovi ocen pogostnosti rekombinacij (r) in vrednosti *lod* ter z upoštevanjem njunih standardnih napak. Z večanjem števila markerjev se hitro zvišuje tudi možni vrstni red; za n markerjev je možnih $(1/2)n!$ razporeditev. Na voljo je več računalniških programov, ki nam omogočajo analize vezanosti lokusov in se različno uporabljajo glede na uporabljen tip populacije in markerjev.

Žal večina programov ni primerna pri pseudotestnem križanju (običajna populacija pri hmelju), najbolj uporaben v tem primeru je JoinMap program, ki ga podpira statistično manj optimalna metoda najmanjših kvadratov. V tem primeru je razvrščanje markerjev v skupine izvedeno na osnovi testa neodvisnosti (prevedenega v *lod* vrednost) pri različnih pragih signifikantnosti. Kartiranje temelji na dodajanju posameznih lokusov zaporedno, s tem da začnemo pri najbolj informativnem paru lokusov (paru z največjo *lod* vrednostjo). Za vsak dodani lokus program poišče njegovo najboljše mesto na obstoječi karti in ponovno preračuna vse statistične vrednosti ob njegovi namestitvi. Ko se statistična značilnost preveč strmo zmanjšuje je lokus odstranjen. Algoritem se ponavlja dokler niso obravnavani vsi lokusi.

Pokritost genoma z markerji (ang. marker coverage) je definirano kot razmerje med dolžino genske karte in celotno dolžino genoma. Gostota karte (angl. map density) je definirana kot povprečje (ali maksimum) razdalj med sosednjimi markerji. Oba principa sta osnovana na predpostavki, da so markerji naključno razporejeni na karti. Velikost genoma ocenimo s poznavanjem celotnega števila markerjev, velikostjo karte, mejne vrednosti *lod* funkcije, števila markerjev z *lod* vrednostjo enako ali večjo od mejne vrednosti *lod* in haploidnega števila kromosomov.

Pogostnost rekombinacij med dvema lokusoma je odvisna od njune medsebojne oddaljenosti. Pogostnost pojavljanja rekombinacij med različnimi lokusi predstavlja mero njihove medsebojne oddaljenosti. Enoto pogostnosti pojavljanja rekombinacij (ena rekombinacija na 100 mejoz) so v čast T. H. Morganu poimenovali **centimorgan** (cM). V povprečju velja ocena, da pri evkariontih 1 cM pomeni razdaljo med dvema lokusoma, ki je 1×10^6 baznih parov, frekvenca rekombinacij, ki jo v poskusih še zaznamo, pa navadno ni nižja od 0,1 – 0,2 %, kar na kromosomu pomeni nekaj sto tisoč baznih parov.

Razmerje med genetsko razdaljo (cM), določeno z genskim kartiranjem in fizično razdaljo, merjeno z baznimi pari, je pri različnih rastlinskih vrstah različno in zato je težko predvideti, kako velik segment je med genom in markerjema. Pogostnost rekombinacij vzdolž celotnega genoma ni popolnoma enaka, v bližini telomer je večja kot v bližini centromer, poleg tega pa obstajajo v genomu tudi območja s povečano pogostnostjo prekrižanj. Pri sesalcih je ženska genska karta daljša kot moška genska karta, saj se več rekombinacij zgodi med oogenezo kot med spermatogenezo. Tudi pri rastlinah so npr. pri kavčukovcu [13] in vrbi [9] odkrili, da je povprečna rekombinacijska stopnja moških mejoz nižja kot rekombinacijska stopnja ženskih mejoz.

Teoretično bi bilo možno določiti povezavo genov najbolj neposredno z opazovanjem genotipov in njihovih frekvenc na osnovi gamet. Pri večini rastlinskih vrst (izjema so dihaploidi) to ni mogoče, zato uporabljamo posredne načine, med katerimi so najbolj običajna testna in povratna križanja.

Karte lahko primerjamo z **združevanjem kart** oz. analiziranih podatkov iz različnih populacij iste vrste, ki jih kartiramo ali s tvorjenjem povezav med posameznimi segmenti genoma, medtem ko ostale dele genoma analiziramo ločeno. S tem načinom je možno tudi preverjati ali je nek kvantitativni lokus, določen v eni populaciji, prisoten tudi v drugi. S primerjalnim kartiranjem lahko precej zmanjšamo stroške in pospešimo postopek nastajanja karte. Prava integrirana karta je lahko narejena le, če so podatki združeni in analizirani skupaj.

Dogovorne (angl. consensus) karte so bile narejene za številne rastlinske vrste, saj kartiranje z več populacijami zagotavlja številne prednosti v primerjavi s kartiranjem ene same

populacije, dogovorna karta je bolj robustna. To je posebnega pomena pri določitvi mest določenih genov. S tem načinom kartiranja se lahko določijo kromosomske prerazporeditve in genske duplikacije, ki predstavljajo osnovo za komparativne študije med sorodnimi vrstami in podvrstami. Zaradi svoje specifičnosti in kodominantnega značaja so SSR in EST markerji zelo uporabni za integracijo starševskih kart [1]. Primerjalne karte zasičene s številnimi EST markerji postajajo osnovno orodje za primerjavo vezanih skupin in kvantitativnih lokusov, dobljenih iz različnih pedigrejev.

5 QTL KARTIRANJE

QTL kartiranje je kombinacija genskega kartiranja in klasične kvantitativne genetike. QTL (quantitative trait loci) so geni, ki vplivajo na kvantitativne lastnosti oz. lokusi ali specifične regije v genomu, povezane s kvantitativno lastnostjo. Za kvantitativne lastnosti je značilna kontinuirana distribucija podatkov, vrednosti so merljive in na lastnost vpliva veliko število genov in okolje. Kartiranje vključuje določitev QTLov, njihovo lokacijo in oceno parametrov QTLov, npr. velikost učinka posameznega starša.

Na splošno je fenotip kvantitativne lastnosti izražen kot vsota genotipa in okolja ($y_i = \mu + a_i + e_i$; kjer je y_i vrednost kvantitativne lastnosti merjena na osebkcu i , μ je srednja vrednost populacije, a_i je vpliv genotipa in e_i vpliv okolja). Genetska komponenta a_i sestoji iz več genov z malim učinkom. Učinki teh genov so premajhni, da bi jih lahko merili ločeno, merljivi so le njihovi aditivni učinki.

Mešani model dedovanja je danes najpogostejši genetski model [7]. Po tem modelu se genetska komponenta deli na dva dela, in sicer na QTL komponento (g_i), ki vključuje le enega ali nekaj genov z večjim vplivom (angl. major genes) in na poligeno komponento (a_i), sestavljeno iz več genov z manjšim vplivom na lastnost.

Podatki, potrebni za QTL kartiranje so genski markerji urejeni v genski karti in fenotipski podatki, to so meritve kvantitativne lastnosti. Odnos med markerjem (kvalitativna lastnost) in med variabilnostjo kvantitativne lastnosti QTLa se ovrednoti z uporabo statističnih modelov. Večji kot je del genoma, ki je pokrit z markerji, večja je možnost določitve QTLov, vezanih na markerje.

Na moč določitve QTLov vpliva število genov, ki kontrolirajo lastnost in njihovo mesto nahajanja, porazdelitev genetskih učinkov, pojav genskih interakcij, dedovanje lastnosti, število segregirajočih genov v populaciji, tip in velikost populacije, gostota in pokrivnost vezanih skupin ter statistična metodologija, uporabljena pri QTL kartiranju. Najbolj primeren tip populacije za QTL kartiranje so povratna križanja. Pri analiziranju družine pseudotestnega križanja lahko določimo le QTLe, pri katerih je vsaj eden ali pa sta oba starša heterozigotna za alela z močnim alternativnim učinkom in ki nista prikrita z dominanco ali delovanjem okolja [16].

QTL kartiranje je izrednega pomena pri drevesnih in trajnih vrstah, kjer so prisotna dolga generacijska obdobja in daljši juvenilni čas, da rastlina doseže stanje zrelosti [5,20,21,24].

6 KARTIRANJE GENOMA HMELJA

Pri hmelju je bila do sedaj objavljena moška in ženska genska karta hmelja nemških raziskovalcev, izdelana z AFLP markerji pri potomcih F₁ generacije [18,19]. O kartiranju in določitvi QTLov so poročali tudi japonski raziskovalci [10,11], vendar je potrebno za potrditev identificiranih QTLov, povezanih s kemičnimi komponentami grenčičnih smol hmelja, preverjanje na genotipih različnega izvora. Slovenska skupina raziskovalcev je objavila gensko karto hmelja s hkratno določitvijo QTLov povezanih z alfa kislinami [2], z dodanimi fenotipskimi rezultati je bila dosežena ponovljivost določenih QTLov v več letih, določeni pa so bili tudi perspektivni QTLi za pridelek [3]. Navedeni rezultati so prvovrstni v svetovnem merilu in bodo nadgrajeni z novimi rezultati.

7 ZAKLJUČEK

V prispevku je predstavljena teorija in osnovne metode, ki se najpogosteje uporabljajo pri genskem kartiranju markerjev. Žlahtnjenje hmelja je sorazmerno dolgotrajen in zapleten postopek, zato lahko uporaba markerjev, povezanih z agronomsko pomembnimi lastnostmi bistveno prispeva k vzgoji novih sort hmelja. Tehnologija molekularskih markerjev, pri kateri dobimo veliko število polimorfizmov neodvisno od vplivov okolja se uporablja za številne aplikacije v žlahtniteljskih programih različnih kmetijskih rastlin.

8 LITERATURA

1. Achere, V., Faivre-Rampant, P., Jeandroz, S., Besnard, G., Markussen, T., Aragonés, A., Fladung, M., Ritter, E., Favre, J.M., A full saturated linkage map of *Picea abies* including AFLP, SSR, ESTP, 5S rDNA and morphological markers.- *Theoretical and Applied Genetics*, 108(2004), p. 1602-1613.
2. Cerenak, A., Satovic, Z., Javornik, B., Genetic mapping of hop (*Humulus lupulus* L.) applied to the detection of QTLs for alpha-acid content.- *Genome*, 49(2006), p. 485-494.
3. Cerenak, A., Satovic, Z., Jakše, J., Luthar, Z., Carovic-Stanko, K., Javornik, B., New yield QTLs and verification of alpha acid content QTLs in hop- In print
4. Cervera, M.T., Storme, V., Ivens, B., Guemao, J., Liu, B.H., Hostyn, V., Van Slycken, M., Van Montague, M., Boerjan, W., Dense genetic linkage maps of three *Populus* species (*Populus deltoides*, *P. nigra* and *P. trichocarpa*) based on AFLP and microsatellite markers.- *Genetics*, 158(2001), p.787-809.
5. Doligez, A., Bouquet, A., Danglot, Y., Lahogue, F., Riaz, S., Meredith, C.P., Edwards, K.J., This, P., Genetic mapping of grapevine (*Vitis vinifera* L.) applied to the detection of QTLs for seedlessness and berry weight.- *Theoretical and Applied Genetics*, 105(2002), p. 780-795.
6. Fisher, B.M., Salakhutdinov, I., Akkurt, M., Eibach, R., Edwards, K.J., Topfer, R., Zyprian, E.M., Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine.- *Theoretical and Applied Genetics*, 108(2004), p. 501-515.
7. Gai, J.Y., Wang, J.K., Identification and estimation of a QTL model and its effects.- *Theoretical and Applied Genetics*, 97(1998), p. 1162-1168.
8. Grattapaglia, D., Sederoff, R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: Mapping strategy and RAPD Markers.- *Genetics*, 137(1994), p. 1121-1137.

9. Hanley, S., Barker, J.H.A., Van Ooijen, J.W., Aldam, C., Harris, S.L., Ahman, I., Larsson, S., Karp, A., A genetic linkage map of willow (*Salix viminalis*) based on AFLP and microsatellite markers.- *Theoretical and Applied Genetics*, 105(2002), p. 192-204.
10. Koie, K., Inaba, A., Okada, Y., Kaneko, T., Ito, K., Construction of the genetic linkage map and QTL analysis on hop (*Humulus lupulus* L.).- *Proceedings of the 1st International Humulus Symposium*, 1-7 Aug. 2004, Corvallis, Oregon. *Edited by* K. E. Hummer and J.A. Henning. *Acta.Hort.* 668, ISHS 2005, p. 59-67.
11. Koie, K., Okada, Y., Construction of the genetic linkage map and QTL analysis on hop (*Humulus lupulus* L.).- *Proceedings of the 1st ISHS International Symposium*. . 1st ISHS International Symposium, Corvallis, 1-7 aug. 2004. Corvallis, ISHS: p. 7.
12. Lambert, P., Hagen, L.S., Arus, P., Audergon, J.M., Genetic linkage maps of two apricot cultivars (*Prunus armeniaca* L.) compared with the almond Texas x peach Earlygold reference map for *Prunus*.- *Theoretical Applied Genetics*, 108(2004), p. 1120-1130.
13. Lespinasse, D., Rodier-Goud, M., Grivet, L., Leconte, A., Legnate, H., Seguin, M., A saturated genetic linkage map of rubber tree (*Hevea* spp.) based on RFLP, AFLP, microsatellite, and isozyme markers.- *Theoretical and Applied Genetics*, 100(2000), p. 127-138.
14. Ling, S., Constructing genetic maps for outbred experimental crosses.- *Doctoral thesis*. Berkeley, University of California (1999), p. 124.
15. Maliepaard, C., Alston, F.H., Van Arkel, G., Brown, L.M., Chevreau, E., Dunemann, F., Evans, K.M., Gardiner, S., Guilford, P., van Heusden, A.W., Janse, J., Laurens, F., Lynn, J.R., Manganaris, A.G., Den Nijs, A.P.M., Periam, N., Rikkerink, E., Roche, P., Ryder, C., Sansavini, S., Schmidt, H., Tartarini, S., Verhaegh, J.J., Vrieling-Van Ginkel, M., King, G.J., Aligning male and female linkage maps of apple (*Malus pumila* Mill.) using multi-allelic markers.- *Theoretical and Applied Genetics*, 97(1998), p. 60-73.
16. Marques, C.M., Vasquez-Kool, J., Carocha, V.J., Ferreira, J.G., O'Malley, D.M., Liu, B.-H., Sederoff, R., Genetic dissection of vegetative propagation traits in *Eucalyptus tereticornis* and *E. globulus*.- *Theoretical and Applied Genetics*, 99(1999), p. 936-946.
17. Myburg, A.A., Griffin, A.R., Sederoff, R., Whetten, R.W., Comparative genetic linkage maps of *Eucalyptis grandis*, *Eucalyptus globulus* and their F₁ hybrid based on a double pseudo-backcross mapping approach.- *Theoretical and Applied Genetics*, 107(2003), p. 1028-1042.
18. Seefelder, S., Ehrmaier, H., Schweizer, G., Seigner, E., Male and female genetic linkage map of hops, *Humulus lupulus*.- *Plant Breeding* 119(2000), p. 249-255.
19. Seefelder, S., Lutz, A., Seigner, E., Mapping of a powdery mildew resistance gene in hop (*Humulus lupulus* L.).- *Proceedings of the Scientific Commission, I.H.G.C.*, 20-25 Feb. 2005, George, South Africa. *Edited by* E. Seigner. By Bayerische Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau, Hüll, Germany, p. 31-35.
20. Sewell, M.M., Davis, M.F., Tuskan, G.A., Wheeler, N.C., Elam, C.C., Bassoni, D.L., Neale, D.B., Identification of QTLs influencing wood property traits in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) II. Chemical wood properties.- *Theoretical and Applied Genetics*, 104(2002), p. 214-222.
21. Sewell, M.M., Bassoni, D.L., Megraw, R.A., Wheeler, N.C., Neale, D.B., Identification of QTLs influencing wood property traits in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). I. Physical wood properties.- *Theoretical and Applied Genetics*, 101(2000), p. 1273-1281.
22. Staub, J.E., Serquen, F.C., Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding.- *HortScience*, 31, 5(1996), p. 731-741.
23. Tani, N., Takahashi, T., Iwata, H., Mukai, Y., Ihara, T.U., Matsumoto, A., Yoshimura, H., Murai, M., Nagasaka, K., Tsumura, Y., A consensus linkage map for sugi

- (*Cryptomeria japonica*) from two pedigrees, based on microsatellites and expressed sequence tags.- *Genetics*, 165(2003), p. 1551-1568.
24. Wang, D., Karle, R., Iezzoni, A.F., QTL analysis of flower and fruit traits in sour cherry.- *Theoretical and Applied Genetics*, 100(2000), p. 535-544.
 25. Yin, T.-M., Wang, X.-R., Andersson, B., Lercetau-Kohler, E., Nearly complete genetic maps of *Pinus sylvestris* L. (Scots pine) constructed by AFLP marker analysis in a full-sib family.- *Theoretical and Applied Genetics*, 106(2003), p. 1075-1083.