

PEMANFAATAN MARKA MOLEKULER UNTUK MENDUKUNG PEMULIAAN KELAPA SAWIT

Dwi Asmono

ABSTRAK

Serupa dengan pemuliaan tanaman tahunan lainnya, pemuliaan kelapa sawit terkendala oleh problem-problem alamiah seperti lamanya siklus pemuliaan dan minimnya informasi genetik. Integrasi teknologi marka molekuler ke dalam program pemuliaan kelapa sawit dapat digunakan untuk memecahkan problem-problem alamiah tersebut. Secara garis besar, marka molekuler dapat memberikan kontribusi dalam identifikasi plasma nutfah kelapa sawit, pemilihan tetua untuk program seleksi, pemetaan pautan genetik, serta seleksi sifat-sifat penting kelapa sawit, baik sifat-sifat yang dikendalikan oleh sedikit gen (monogenik dan oligogenik) maupun banyak gen (poligenik). Perkembangan teknologi marka berbasis PCR maupun cabang ilmu biometrika yang berkaitan dengan pemetaan genom akan mengukuhkan kontribusi marka molekuler untuk penciptaan kultivar-kultivar unggul kelapa sawit di masa yang akan datang.

Kata kunci: kelapa sawit, marka molekuler, *Elaeis guineensis*

PENDAHULUAN

Pemuliaan tanaman kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) umumnya terkendala oleh problem-problem alamiah seperti lamanya siklus pemuliaan dan minimnya informasi genetik. Tidak seperti tanaman setahun yang bersiklus pendek, satu siklus perbaikan sifat pada kelapa sawit umumnya memerlukan 7-10 tahun. Sebagai konsekuensinya, walaupun pendekatan pemuliaan 'konvensional' umumnya telah terbukti memberikan banyak kontribusi terhadap kemajuan genetik per siklus pemuliaan, tetapi per satuan unit waktu kemajuan genetik tersebut relatif kecil.

Serupa dengan tanaman tahunan pada umumnya, seleksi pada kelapa sawit saat ini bertumpu pada seleksi penampilan fenotipik dan uji keturunan. Kedua model seleksi tersebut selain menyita tempat dan

waktu juga memerlukan pendataan *pedigree* yang teliti. Akibatnya, setiap proporsi ragam genetik yang dapat direngkuh untuk setiap siklus memerlukan korbanan biaya yang tinggi.

Pengembangan marka molekuler berpeluang untuk meningkatkan efektifitas program pemuliaan kelapa sawit. Secara garis besar Walton dan Helentjaris (29) memaparkan bahwa marka molekuler mempunyai dua potensi utama untuk pengembangan program pemuliaan. Pertama, program yang hanya bertumpu pada ketersediaan pustaka (*library*) marka tanpa mempertimbangkan keterpautan antar marka. Dalam hal ini marka molekuler dapat berperan untuk meningkatkan efektifitas pengorganisasian plasma nutfah, pengujian kemurnian varietas atau klon, analisis tingkat homosigositas dan heterosigositas populasi, dan pemulihan genotype

tetua donor pada program silang balik (*backcrossing*). Kedua, program yang bertumpu pada ketersediaan peta pautan genetik antar marka. Dalam hal ini marka molekuler berguna untuk pemetaan pautan genetik, pemetaan gen-gen yang mengendalikan sifat kualitatif dan kuantitatif, serta pendukung seleksi (*marker assisted selection*). Tulisan ini mengulas kendala dan potensi penggunaan marka molekuler untuk pengembangan pemuliaan kelapa sawit.

PEMILIHAN MARKA

Walaupun penggunaan marka molekuler untuk pemuliaan baru bergema pada pertengahan 1980-an, teori yang melandasi penerapan marka untuk pemuliaan sifat-sifat kualitatif dan kuantitatif tanaman sesungguhnya telah diungkapkan sejak tahun 1920-an. Penelitian yang menyangkut penggunaan marka untuk pemuliaan tanaman diperkenalkan oleh Sax (20). Sejak saat itu, penelitian genetika yang berbasis pada penggunaan marka mulai berkembang, walaupun tidak menunjukkan peran yang berarti bagi perbaikan sifat tanaman. Beberapa faktor yang membatasi penggunaan marka morfologi untuk pemuliaan tanaman antara lain karena marka-marka morfologi umumnya bersifat resesif dan terkadang lethal. Penemuan marka biokimia berupa isozim mampu mengubah peran marka untuk program pemuliaan (26). Teknologi ini selain sederhana juga dapat diterapkan secara luas. Hingga tahun 1983, lebih dari 30 tanaman telah diidentifikasi dengan menggunakan isozim sebagai

marka (27). Sayangnya, walaupun pada beberapa tanaman isozim mampu menunjukkan polimorfisme hingga 40 losai, pada sebagian besar tanaman jumlah polimorfisme hanya kurang dari 20 losai (24).

1. Restriction fragment length polymorphism

Restriction fragment length polymorphism atau lazim disingkat RFLP pada dasarnya adalah penggalan-penggalan DNA yang terjadi apabila DNA suatu organisme diberi perlakuan dengan sekelompok enzim yang dikenal dengan endonuklease restriksi. Enzim-enzim tersebut mampu mengenali dan memotong situs-situs spesifik di untai DNA. Dua individu tanaman yang berbeda dapat memiliki dua ukuran penggalan DNA yang berbeda sebagai akibat dari perubahan pasangan basa di DNA, delesi internal, atau insersi (29). Penggalan-penggalan DNA tersebut dapat dilacak melalui pelabelan radioaktif atau non radioaktif dengan menggunakan metode yang dikenal dengan *Southern blotting*. Teknologi RFLP ini bermanfaat untuk pemuliaan karena dari berbagai penelitian diketahui bahwa pewarisan pola RFLP mengikuti aturan Mendel. Beberapa keunggulan RFLP, jika dibandingkan dengan isozim dan marka morfologi, antara lain: (a) dengan RFLP relatif banyak alel yang dapat dideteksi pada material genetik, (b) marka RFLP bersifat kodominan, (c) ekspresi marka tidak dipengaruhi oleh lingkungan, dan (d) genotype tanaman dapat dideteksi dengan RFLP pada stadia awal.

Selain faktor positif dari RFLP, teknologi tersebut mengandung beberapa kelemahan, antara lain untuk analisis RFLP diperlukan DNA yang relatif banyak. Selain itu, beberapa aktifitas seperti *Southern blotting*, DNA hibridisasi, dan pelabelan radioaktif juga menyita waktu. Pada awalnya RFLP juga bergantung pada penggunaan bahan radio aktif untuk penanda (*probes*), walaupun penggunaan bahan radio aktif tersebut dapat disubstitusi dengan penanda non-radioaktif (12).

2. Marka berbasis PCR

Beberapa kelemahan RFLP dapat ditutupi oleh beberapa teknologi marka yang berbasis pada penggunaan *polymerase chain reaction* (PCR). Pada prinsipnya, teknologi ini memanfaatkan proses amplifikasi suatu DNA sekuens dengan menggunakan bantuan deretan nukleotida, dikenal dengan *oligonucleotide primer*, yang mampu berhibridisasi dengan DNA sekuens tersebut (17, 30). Automatisasi proses amplifikasi mampu menggandakan sepotong DNA sampai mendekati jumlah yang tak terhingga. Selain cepat dan sensitif, amplifikasi DNA secara otomatis ini tidak bergantung pada bahan radioaktif. Teknologi marka berbasis PCR pertama yang dikembangkan adalah RAPD (*Random amplification of polymorphic DNA*). Teknologi ini menggunakan primer oligonukleotida acak (*random primer*) yang menghasilkan penanda bersifat dominan.

Sekuens Berulang Sederhana (*Simple Sequence Repeat-SSR*), yang juga dikenal dengan *microsatellite*, merupakan salah satu teknologi marka berlandaskan PCR yang saat ini banyak diuji coba di tanaman.

Selain menggunakan prinsip-prinsip otomatisasi PCR, SSR juga menghasilkan marka yang bersifat kodominan. Marka SSR potensial untuk diujicoba di kelapa sawit karena menurut penelitian Condit and Hubbell (5) tanaman tahunan tropika umumnya mempunyai satelit (GT)_n dan (AG)_n hingga 10⁴ sampai 10⁵ kopi per set genom, yang potensial untuk marka. Perbandingan beberapa marka genetik dapat disimak pada Tabel 1.

KENDALA PENERAPAN MARKA MOLEKULER

Konsep dasar pengembangan kultivar tanaman, termasuk kelapa sawit, pada dasarnya dapat dipilah menjadi beberapa bagian: pemilihan tetua, pembentukan populasi dasar, seleksi pada sifat-sifat harapan, pengujian, dan penyiapan benih pemulia (*breeder seed*). Pada tanaman setahun, keterlibatan marka molekuler di dalam tahapan-tahapan program pemuliaan sifat-sifat kuantitatif dan kualitatif tersebut telah banyak diulas (14, 18, 25). Pada tanaman tahunan, penggunaan marka molekuler berbasis DNA untuk perbaikan bahan tanaman relatif belum banyak dilaporkan.

Latar belakang genetik kelapa sawit, yang umumnya *outbred*, pada mulanya merupakan salah satu kendala dalam penerapan marka molekuler untuk alat bantu pemuliaan. Saat ini, konsep teoritis penggunaan marka molekuler pada tanaman umumnya didasarkan pada hasil riset pada tanaman-tanaman setahun yang pada umumnya mempunyai latar belakang genetik berbeda dengan tanaman tahunan (1, 14, 18). Laju pengkajian marka molekuler

Tabel 1. Perbandingan beberapa marka genetik

	Isozim	RFLP	RAPD	SSR
Prinsip dasar	Pewarnaan terhadap isoenzim tertentu	Restriksi endonuklease Southern blotting Hibridisasi DNA	Amplifikasi DNA dengan <i>primer</i> teracak	PCR terhadap sekuens berulang sederhana
Tingkat <i>Polymorphisme</i>	Sangat rendah	Menengah	Menengah	Tinggi
Dominansi marka	kodominan	kodominan	dominant	kodominan
Kebutuhan DNA	Tidak perlu	2-10 mikrogram	10-25 ng	50-100 ng
Informasi <i>primer</i> ?	Tidak perlu	Tidak perlu	Tidak perlu	Perlu
Radioaktif	Tidak	Ya/tidak	Tidak	Tidak
Automatisasi	Tidak	Tidak	Ya	Ya
Biaya pengembangan	Rendah	Menengah	Rendah	Menengah/Tinggi
Biaya awal	Rendah	Menengah	Rendah	Tinggi

Sumber :Rafalski dan Tingey (19), dengan beberapa penambahan dan modifikasi

pada tanaman setahun ini juga ditunjang ketersediaan perangkat lunak yang didesain sesuai dengan kondisi tanaman setahun, seperti MAPMAKER/QTL (13). Tauer *et al.* (28) memperkirakan bahwa penerapan marka molekuler untuk program seleksi tanaman tahunan akan menghadapi beberapa kendala seperti (a) langkanya ketersediaan peta genetik dan peta sifat-sifat yang dikendalikan oleh losai kuantitatif (*quantitative trait loci-QTL*) pada setiap populasi, (b) sifat alami tanaman tahunan yang umumnya menyerbuk bebas, dan (c) sifat-sifat penting umumnya dikendalikan oleh banyak gen. Strauss *et al.* (23) mengingatkan bahwa studi genetika berbasis marka molekuler yang banyak diterapkan pada tanaman setahun mungkin sulit diterapkan pada tanaman tahunan karena kendala biologis seperti minimnya informasi tentang latar belakang genetik tanaman, interaksi genotype x lingkungan, serta kebutuhan sejumlah uji keturunan.

Ketersediaan peta genetik yang akurat umumnya dapat dipenuhi oleh tanaman-tanaman setahun karena pembagian tingkat generasi tanaman setahun--seperti F_1 , F_2 , silang balik (*backcross-BC*), atau galur rekombinan (*recombinant in-breds-RI*), dapat ditentukan dengan tepat. Pada tanaman tahunan, pengertian-pengertian generasi seperti F_1 , F_2 dan BC tidak persis sama dengan tanaman setahun. Generasi F_1 pada kelapa sawit, misalnya, adalah hasil persilangan antara pohon-pohon dari dua kelompok heterotik (*heterotic group*) yang berbeda, dura dan pisifera. Kecuali lokus ketebalan cangkang (Sh) yang menjadi pembeda antar kelompok kelapa sawit, individu-individu di dalam kelompok heterotik tersebut secara genotipik mempunyai konstitusi gen yang berbeda. Dengan demikian generasi F_1 pada tanaman kelapa sawit sesungguhnya lebih mendekati pada generasi F_2 pada tanaman setahun. Hal-hal seperti tersebut

menyebabkan teori pemetaan genetik pada spesies menyerbuk bebas (*outbreeding*) hingga awal 1990-an belum banyak berkembang. Meskipun demikian, beberapa kelompok peneliti telah mencoba mengembangkan model-model statistika untuk pemetaan genetik pada spesies-spesies yang menyerbuk bebas (8, 22). Dalam waktu dekat, problem yang berkaitan dengan perbaikan presisi peta genetik pada tanaman menyerbuk bebas, seperti kelapa sawit, akan dapat dipecahkan.

Salah satu kendala potensial dari penerapan marka molekuler untuk pemuliaan kelapa sawit adalah kendala biaya. Kekhawatiran terhadap kendala biaya ini terungkap dari hasil survey terhadap para pemulia tanaman yang dilakukan oleh Lee (14). Walaupun demikian, berkembangnya teknologi marka berlandaskan PCR memungkinkan kendala biaya dan waktu dapat ditekan seminimum mungkin. Bahkan, pada tanaman tahunan seperti kelapa sawit lonjakan biaya yang dibutuhkan untuk pengembangan suatu varietas dapat direduksi oleh berkurangnya waktu yang diperlukan untuk satu siklus pemuliaan. Lee (14) menunjukkan optimisme bahwa seleksi berbantuan marka justru akan memberikan keuntungan lebih bagi tanaman-tanaman tahunan yang bersiklus panjang, yang secara natural sulit untuk memanfaatkan teori-teori seleksi yang diterapkan pada tanaman setahun.

PENGUNAAN MARKA MOLEKULER UNTUK KELAPA SAWIT

1. Identifikasi plasma nutfah

Ketersediaan plasma nutfah, disertai dengan informasi genetik yang benar,

merupakan salah satu hal yang krusial di dalam pemuliaan kelapa sawit. Informasi yang salah terhadap materi genetik yang digabungkan ke dalam program pemuliaan akan memberikan pengaruh negatif terhadap kemajuan genetik. Secara teoritis, manajemen plasma nutfah kelapa sawit relatif lebih sulit karena pengelolaan plasma nutfah yang umumnya berbasis koleksi *ex-situ* memerlukan ruang yang luas serta sistem pendataan yang teliti dan berkelanjutan. Dengan penambahan informasi dari marka molekuler, tumpang tindih *pool gen* dapat dihindarkan sehingga efisiensi pengelolaan plasma nutfah dapat ditingkatkan. Pencirian plasma nutfah kelapa sawit dengan menggunakan marka DNA mulai dilakukan di beberapa unit penelitian kelapa sawit (10, 21).

2. Pemilihan tetua

Pemilihan tetua sangat bergantung pada tiga hal: (a) tujuan pemuliaan, (b) pola pewarisan sifat dari tanaman yang akan diperbaiki, dan (c) ketersediaan plasma nutfah (6). Pemilihan tetua pada kelapa sawit umumnya mengikuti dua pendekatan: (a) berdasarkan seleksi penampilan fenotipik tanaman, dan (b) berdasarkan uji keturunan. Pendekatan pertama digunakan oleh Pusat Penelitian Kelapa Sawit antara lain untuk menyeleksi Pisifera unggul melalui program *Family and Individual Palm Selection*. Pendekatan kedua digunakan oleh para pemulia kelapa sawit dengan menggunakan metode *Reciprocal Recurrent Selection*. Pendekatan tanpa uji keturunan tidak menguntungkan jika alel yang tak dikehendaki ternyata tidak mampu dideteksi secara fenotipik, padahal setiap waktu dapat tereks-presi (11). Penggunaan marka molekuler

dapat mengatasi kelemahan tersebut, khususnya jika sifat yang dikehendaki dikendalikan oleh gen-gen sederhana (monogenik atau oligogenik). Apabila pemilihan tetua dilakukan dengan menggunakan uji keturunan, integrasi marka molekuler ke dalam kriteria seleksi akan meningkatkan nilai pemuliaan atau *breeding value* (3).

3. Pemetaan genetik

Keberhasilan beberapa kelompok peneliti melacak keragaman pada populasi kelapa sawit dan karet dengan menggunakan marka DNA atau *heterologous probes* yang bersifat kodominan (4, 10) membuka peluang untuk memetakan losai kualitatif dan kuantitatif kelapa sawit di masa mendatang. Penelitian Grattapaglia dan Sederoff (7) menggunakan metode *pseudo-testcross* untuk memetakan tanaman hutan *Eucalyptus* merupakan langkah maju untuk pemetaan gen tanaman tahunan. Demikian pula, kendala presisi pemetaan pada tanaman menyerbuk bebas (8), serta kendala ketersediaan perangkat lunak yang mampu menganalisis pautan antar marka pada kelompok tanaman ini kemungkinan akan segera dapat dipecahkan.

4. Evaluasi dan seleksi sifat kuantitatif

Kunci dari keterlibatan marka untuk program seleksi sifat-sifat kuantitatif pada kelapa sawit adalah ketersediaan peta genetik yang akurat. Adanya kontradiksi pandangan terhadap peluang marka untuk alat bantu seleksi terhadap sifat-sifat kuantitatif telah dikemukakan oleh banyak peneliti (23, 25). Menurut Lee (14) efisiensi seleksi berbantuan marka akan ditentukan oleh (a) besarnya heritabilitas

suatu karakter, (b) kedekatan antara marka dengan QTL yang menjadi sasaran seleksi, (c) kemungkinan erosi rekombinasi antara asosiasi marka-QTL, dan (d) ukuran contoh yang digunakan untuk pemetaan dan seleksi QTL. Peluang yang lebih realitis adalah menggabungkan marka ke dalam kriteria seleksi sifat-sifat yang dikendalikan oleh gen tunggal atau beberapa gen (*oligogenic*). Beberapa strategi dan pertimbangan teoritis tentang aplikasi marka untuk kriteria seleksi terhadap sifat-sifat yang dikendalikan oligogenik telah dikupas secara mendetail oleh Melchinger (16). Salah satu potensi marka molekuler adalah untuk mengintrogresikan segmen kromosom tertentu yang diketahui membawa gen penentu sifat yang diharapkan (9, 25). Berbagai simulasi menunjukkan bahwa seleksi dan silang balik berbantuan marka (MAS-BC) menunjukkan efektivitas yang tinggi. Young dan Tanksley (31) menduga bahwa dua generasi MAS-BC akan mampu mengintrogresikan potongan kecil kromosom sama dengan 100 kali generasi silang balik konvensional. Beckman dan Soller (2) menyatakan bahwa MAS potensial untuk mengurangi siklus silang balik suatu karakter sebanyak tiga kali. Integrasi marka molekuler ke dalam program seleksi membawa dua implikasi penting bagi pemuliaan kelapa sawit. Pertama, pengurangan jumlah siklus seleksi sejalan dengan peningkatan efektivitas seleksi. Kedua, pengurangan waktu yang diperlukan untuk uji progeni di dalam satu siklus seleksi karena siklus seleksi berikutnya dapat dilakukan tanpa harus menunggu tanaman mencapai puncak usia menghasilkan. Pada kelapa sawit, secara normal satu siklus seleksi memerlukan 7-10 tahun (15). Jika marka mampu mendeteksi keunggulan

suatu karakter sejak dini, maka siklus seleksi berikutnya dapat dimulai pada saat tanaman mulai menghasilkan yaitu umur 2-3 tahun.

KESIMPULAN

Marka molekuler berpeluang untuk meningkatkan efektifitas dan efisiensi program pemuliaan kelapa sawit. Dalam waktu dekat, kontribusi marka molekuler akan cukup terasa di dalam melengkapi informasi plasma nutfah dan mendukung pemilihan pohon tetua. Keberhasilan memecahkan masalah yang terkait dengan sifat tanaman tahunan, yang umumnya menyerbuk bebas, akan menentukan keberhasilan teknologi ini untuk memetakan losai kualitatif dan kuantitatif pada kelapa sawit, dan lebih jauh menentukan kontribusi teknologi ini untuk alat bantu penciptaan kultivar-kultivar unggul kelapa sawit.

DAFTAR PUSTAKA

1. ASMONO, D. 1998. Genetic Studies of Quantitative Trait Loci in the Early Generation of a Maize Population. Ph.D. Dissertation. Iowa State University. Ames, IA. USA.
2. BECKMANN, J.S. and M. SOLLER. 1986. Restriction fragment length polymorphism and genetic improvement of agricultural species. *Euphytica* 35:111-124.
3. BERNARDO, R. 1994. Prediction of maize single-cross performance using RFLPs and information from related hybrids. *Crop Sci.* 34:20-25
4. BESSE, P., P. LEBRUN, M. SEGUIN, and C. LANAUD. 1993. DNA fingerprints in *Hevea brasiliensis* (rubber tree) using human minisatellite probes. *Heredity* 70(30):237-244.
5. CONDIT, R. and S.P. HUBBELL. 1991. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genome. *Genome* 34:66-71.
6. FEHR, W.R. 1987. Principles of Cultivar Development. vol 1. Theory and technique. Macmillan Publ. Co. NY. 536p.
7. GRATTAPAGLIA, D. and R. SEDEROFF. 1994. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. *Genetics* 137:1121-1137.
8. HALEY, C.S., S.A. KNOT, and J-M. ELSEIN. 1994. Mapping quantitative trait loci crosses between outbred lines using least squares. *Genetics* 136:1195-1207.
9. HOSPITAL, F., C. CHEVALET, and P. MULSANT. 1992. Using markers in gene introgression breeding program. *Genetics* 132:1100-1210.
10. JACK, P.I., T.A.F. DIMITRIJEVIC, and S. MAYES. 1995. Assessment of nuclear, mitochondria and chloroplast RFLP marker in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Theor. Appl. Gen.* 90 (5):643-649.
11. KNAPP, S.J. 1994. Mapping quantitative trait loci. pp. 58-96. In. Phillips, R.L. and I.K. Vasil (eds.). DNA-Based Marker in Plants. Kluwer Acad., The Netherlands.
12. KOCHERT, G. 1994. RFLP technology. p. 8-38. In. R.L. Phillips and I.K. Vasil. DNA-Based Marker in Plants. Kluwer Acad. Publ., The Netherlands.
13. LANDER, E.S., P. GEEN, J. ABRAHAMSON, A. BARLOW, M.J. DALY, S.E. LINCOLN, and L. NEWBURG. 1987. MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1:174-181.
14. LEE, M. 1995. DNA markers and plant breeding programs. *Adv. Agron.* 55:265-344.
15. LUBIS, A. 1992. Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) di Indonesia. Puslitbun Marihat-Bandar kuala, Indonesia. 435p.
16. MELCHINGER, A.E. 1990. Use of RFLP markers in breeding for oligogenic disease resistance. *Plant Breeding* 104:1-19.
17. MULLIS, K.B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Amer.* pp. 56-65.
18. PATERSON, A.H., S.D. TANKSLEY, and M.E. SORRELS. 1991. DNA markers in plant improvement. *Adv. Agron.* 46:39-90.
19. RAFALSKI, J.A. and S.V. TINGEY. 1993. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *TIG* 9:275-279.
20. SAX, K. 1923. The association of size differences with seed coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. *Genetics* 8:552-560.

21. SHAH, F.H., O. RASHID, A.J. SIMONS, and A. DUNSDON. 1994. The utility of RAPD markers for determination of genetic variation in oil palm (*Elaeis guineensis*). *Theor. Appl. Genet.* 89(6):713-718.
22. SOLLER, M. and J.S. BECKMANN. 1990. Marker-based mapping of quantitative trait loci using replicated progenies. *Theor. Appl. Genet.* 80:205-208.
23. STRAUSS, S.H., R. LANDE, and G. NAMKOONG. 1992. Limitation of molecular marker-aided selection in forest tree breeding. *Can. J. For. Res.* 22:1050-1061.
24. STUBER, C.W., and M.M. GOODMAN. 1983. Allozyme genotypes for popular and historically important inbred lines of corn. USDA-ARS. Southern Ser. No. 16.
25. STUBER, C.W. 1994. Breeding multigenic traits. pp. 97-115. In: Phillips, R.L. and I.K. Vasil. *DNA Based Markers in Plant*. Kluwer Acad. Publ., The Netherlands.
26. TANKSLEY, S.D. 1983. Molecular markers in plant breeding. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1:3-8.
27. TANKSLEY, S.D. and T. J. ORTON. 1983. *Isozymes in Plant Genetics and Breeding*. Elsevier, New York. USA.
28. TAUER, C.G., S.W. HALLGREN, and B. MARTIN. 1992. Using marker-aided selection to improve tree growth response to abiotic stress. *Can. J. For. Res.* 22:1018-1030.
29. WALTON, M. and T. HELENTJARIS. 1987. Application of restriction fragment length polymorphism (RFLP) technology to maize breeding. *Proc. forty-second Ann. Corn and Sorghum Industry Res. Conf., ASTA*: 48-75.
30. WHITE, T.J., N. ARNHEIM, and H.A. ERLICH. 1989. The polymerase chain reaction. *TIG* 5 (6):185-188.
31. YOUNG, N.D. and S.D. TANKSLEY. 1989. RFLP analysis of the size of chromosomal segments retained around *Tm-3* locus of tomato during backcross breeding. *Theor. Appl. Genet.* 77:353-359.