



PROSIDING
SEMINAR
PERHIMPUNAN MUDA PETROKIMIA INDONESIA
PERIODE



"Pemanfaatan Plasma Nutfah Lokal untuk Perakitan Jenis Unggul
dalam Menghadapi Perubahan Iklim dan Mencapai Ketahanan Pangan"

Dalam Rangka:

DIES NATALIS KE 57 FAKULTAS PERTANIAN UNIVERSITAS ANDALAS

Mohammad Syarif

Padang, 9 Desember 2014

David Fitzer



Supported by :



ISBN 9786021800607

**PROSIDING SEMINAR NASIONAL
PERIPI REGIONAL SUMATERA**

PEMANFAATAN PLASMA NUTFAH LOKAL UNTUK
PERAKITAN JENIS UNGGUL DALAM MENGHADAPI
PERUBAHAN IKLIM DAN MENCAPAI KETAHANAN PANGAN

Tim Penyunting:

Etti Swasti

Muhammad Syukur

Sutoyo

Hamda Fauza

Desain Sampul : Hamda Fauza dan Guntur Gumilang

Tata Letak Isi:

P K. Dewi Hayati

Nurwanita Ekasari Putri

Yusniwati

Dini Hervani

Lily Syukriani

Buku ini diterbitkan sebagai prosiding Seminar Nasional PERIPI
Regional Sumatera yang diselenggarakan pada tanggal 9-10 Desember
2011.

Perpustakaan Nasional Katalog Dalam Terbitan (KDT)

PEMANFAATAN PLASMA NUTFAH LOKAL UNTUK PERAKITAN JENIS
UNGGUL DALAM MENGHADAPI PERUBAHAN IKLIM DAN MENCAPAI
KETAHANAN PANGAN

Andalas University Press, 2012

447 hlm, ukuran A4

ISBN : 978-602-18690-9-9

N.L.P., P.J. Sanjoto, Edison, F. Nasution, S. Hadiati, dan Sudjijo).....	172
Sex Determination of Salacca (<i>Salacca edulis</i> L.) By Random Amplified Polymorphic DNA Molecular Markers (Ediwirman, Jamsari, Irfan Suliansyah, Gustian).....	181
Induksi Mutasi Duku Tanpa Biji Melalui Iradiasi Sinar Gamma Pada Entris: Pengaruh Iradiasi Sinar Gamma Terhadap Pertumbuhan Benih Duku (<i>Lansium Domesticum</i> Corr.) Hasil Sambungan (Indriyani, N.L.P., Karsinah, Sukartini, dan I. Sutarto).....	188
Inisiasi Kalus Embriogenik dari Eksplan Ovari dan Endosperm Durian (Rahayu Triatnuningih, dan Yosi Zendra Joni).....	194
Pengaruh Beberapa Konsentrasi dengan Lama Perendaman Ethyl Methane Sulphonate (Ems) terhadap Pertumbuhan Kalus Tanaman Kentang (<i>Solanum tuberosum</i> L.) (Warnita, Irawati Chaniago, dan Maini Rama Fitri).....	200
Inisiasi Somaklonal Tomat Secara In Vitro dalam Upaya Meningkatkan Keragaman Genetik (Dini Herwani, Aprizal Zainal dan Erliana Br. Sitepu).....	208
Pengaruh Zat Pengatur Tumbuh Auksin dan Cytokinin terhadap Induksi Kallus Cabai Kopai (<i>Capsicum annuum</i> L.), sebagai Bahan Transformasi Genetik (Renfiyeni, Yusniwati, J. Trisno dan Jamsari).....	215
Mekanisme Ketahanan Struktural Cabai terhadap Begomovirus Penyebab Penyakit Daun Keriting Kuning (<i>Pepper Yellow Leaf Curl Virus</i>) (Rokhana Faizah, Sriani Sujiprihati, Sri Hendrastuti Hidayat, M. Syukur).....	223
Tingkat Virulensi Begomovirus dan Ketahanan Kultivar Cabai (<i>Capsicum annuum</i>) terhadap Penyakit Virus Daun Kuning Keriting (<i>Pepper yellow leaf curl virus</i>) (Jumsu Trisno).....	231
Pengujian Ketahanan Cabai terhadap Begomovirus Penyebab Penyakit Daun Keriting Kuning (Dwi Wahyuni Ganefianti, Sriani Sujiprihati, Sri Hendrastuti Hidayat dan Muhammad Syukur).....	239
Pendugaan Parameter Genetik Ketahanan terhadap Penyakit Antraknosa pada beberapa Genotipe Cabai (<i>Capsicum annuum</i> L.) (Nurwanita Ekasari Putri, Sriani Sujiprihati, M. Syukur, Widodo).....	248
Menuju Kloning Berbasis Peta <i>Rpi-cap1</i> Sebagai Sarana Perakitan Kentang Tahan Hawar Daun Melalui Cisgenik (Hernawan Rahmadi).....	
Penelitian dan Pengembangan Varietas Cabai Tahan Penyakit Kuning Keriting di Jawa Barat (Nurwanita Ekasari, Renfiyeni, Yusniwati, J. Trisno dan Jamsari).....	

SEX DETERMINATION OF SALACCA (*Salacca edulis* L.) BASED PCR-RAPD

Ediwirman¹⁾, Jamsari²⁾, I. Suliansyah²⁾, Gustian²⁾

Graduated Doctoral Student, Andalas University, Padang, Indonesia
Plant Breeding Departement, Andalas University, Padang, Indonesia

Abstract

Salacca (*Salacca edulis* L.) is a high economic plant as the original tropics. Sex type sallaca including dioceus, monoceous and hermaphrodites. Successing farmer in the cultivation is determined by the ratio of males and females. The ratio of male and female plants in the field is 1:10. Sex determination of based morphological characteristics are less effective and difficult in the young plants (seedlings). Using of RAPD technique (Random Amplified Polymorfism DNA) is a technique based markers. DNA's of those populations were extracted by CTAB method. Out of the 300 tested primers, two primers, namely OPL-13 and UBC-78, produced 469 bp and 562 bp fragment, respectively and were importantly recognized to distinguish between male and female, acordingly.

Key word : Sex determination, dioecec, RAPD molecular marker.

PENDAHULUAN

Keberhasilan dalam budidaya tanaman salak sangat ditentukan oleh rasio antara salak jantan dan betina, terutama salak yang berumah dua. Kendala yang dihadapi di lapangan untuk tanaman salak berumah dua (dioseus) adalah sulitnya untuk menentukan secara dini kelamin yang berasal dari perbanyakan secara generatif. Identifikasi secara morfologi pada stadia benih tidak memberikan informasi yang akurat. Hadi, Purwanto, dan Prajitno (2002) menjelaskan bahwa, penggunaan karakteristik kromosom dapat digunakan untuk membedakan jenis kelamin salak, akan tetapi metode tersebut sangat tergantung pada fase pertumbuhan tanaman, dan tidak aplikatif. Penentuan kelamin salak biasanya membutuhkan waktu lebih dari 5 tahun. Hal ini tentunya sangat merugikan dalam pembudiyaaan tanaman salak, terutama salak yang berumah dua seperti salak pondoh.

Penentuan gen-gen penentu kelamin pada salak dilakukan menggunakan teknologi berbasis PCR (*Polimerase Chain Reaction*). Gen-gen pengendali kelamin selain dapat dijadikan sebagai sistem diagnosis yang lebih sensitif dan akurat. Terutama dalam pendeteksian kehadiran gen-gen penentu kelamin dalam secara dini. Hal ini merupakan suatu pengembangan sistem deteksi dini yang dapat dilaksanakan, dan sudah banyak dilakukan kajian-kajian yang berbasis PCR.

Salah satu bagian penting dari sistem pendeteksian secara dini pada kelamin adalah adanya primer spesifik sebagai *starting point* dalam meng-amplifikasi fragmen-fragmen target yang berasal dari materi genetik secara akurat. Primer adalah rantai polinukleotida pendek dengan DNA baru yang bisa ditambahkan pada DNA polimerase, yang dikembangkan dari

fragmen spesifik seperti dalam pengendalian kelamin. Penggunaan analisis *fingerprinting* berbasis RAPD mampu menghasilkan fragment yang lebih akurat. Fragmen yang dihasilkan disekuensing untuk mengetahui urutan sekuens basa nitrogen.

Pada dekade terakhir ini mempunyai banyak peluang suatu peningkatan jumlah peneliti yang secara langsung terlibat pada identifikasi dan karakterisasi penanda molekuler dan gen pada tanaman dioseus (Kafkas, *et al.*, 2001). Teknik RAPD sebagai pengidentifikasi yang sederhana pada tanaman dioseus pada studi pilogentik (Xu, Wang, dan Cui, 2004), dan klasifikasi tanaman pada tingkat genus dan spesies (Wong *et al.*, 2004; Bouza, Caujape-Castells, Gonzalez-Perez, Sosa, 2006).

Sistem diagnosis yang akan dikembangkan dalam penelitian ini diharapkan memiliki karakteristik yang dapat memberikan akurasi yang tinggi (> 95%), waktu yang singkat, praktis, dengan input biaya yang lebih rendah. Untuk mendapatkan sistem pendeteksian tersebut, akan dikembangkan sistem yang mengadopsi keunggulan teknik amplifikasi DNA secara *in vitro* dengan menggunakan *Polimerase Chain Reaction* (PCR) Sistem penanda yang menjadi target adalah *Random Amplified Polimorfism DNA* (RAPD). Teknologi ini mampu mengidentifikasi alel-alel spesifik yang dimiliki oleh suatu organisme dengan sangat sensitif dan akurat. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan primer yang spesifik terkait pengendali kelamin pada tanaman salak.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Fakultas Universitas Andalas. Bahan tanaman yang digunakan berasal dari kebun milik petani di Sicincin Kecamatan Sebelas Enam Lingkung Kabupaten Padang Pariaman dan Kecamatan Tarusan Kabupaten Pesisir Selatan dengan jenis salak salak pondoh. Untuk analisis DNA digunakan daun muda, masing-masing sebanyak 5 sampel untuk tanaman jantan dan betina.

Isolasi dan Ekstraksi DNA

DNA genom diisolasi dari daun salak jantan dan betina. Isolasi DNA dilakukan di laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Universitas Andalas Padang. Isolasi DNA menggunakan modifikasi metode Doyle and Doyle (1987). Sebanyak 100 – 150 mg daun digerus menggunakan nitrogen cair, dan dimasukkan ke dalam eppendorf (1,5 ml) yang ditambahkan dengan buffer CTAB (terdiri dari 1 M Tris HCl pH 8.5; 5 M NaCl, 0.5 M EDTA; 10% CTAB; b-mercaptoethanol), kemudian. Ekstraksi dilakukan dengan vortex, dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 64°C. Kedalam larutan ekstrak ditambahkan 750 µl Chloroform, Phenol dan Isoamilalkohol (25:24:1) dan dibolak-balik selama 10 menit, selanjutnya disentrifusi pada kecepatan 14.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh dipindahkan ke eppendorf baru dan ditambahkan dengan 500 µl larutan Chloroform, Isoamil alkohol (24:1) dan disentrifusi dengan kecepatan 14000 rpm. Supernatan dipindahkan lagi ke eppendorf, dan ditambahkan dengan etanol dingin 96% sebanyak 500 µl dan dibuang dan ditambah dengan etanol 70%, selanjutnya supernatan dikeringangikan. Pelet (DNA) yang diperoleh dilarutkan dalam 1 x TE sebanyak 100 µl, dan disimpan pada suhu 15°C selanjutnya siap untuk digunakan.

Setelah DNA hasil isolasi dimurnikan, kemudian dihitung konsentrasinya menggunakan gel elektroforesis. Untuk menentukan kuantitasnya menggunakan λ DNA. Selanjutnya DNA disiapkan untuk dipergunakan sebagai cetakan (template) dalam reaksi Polimerase Chain Reaction.

Amplifikasi RAPD

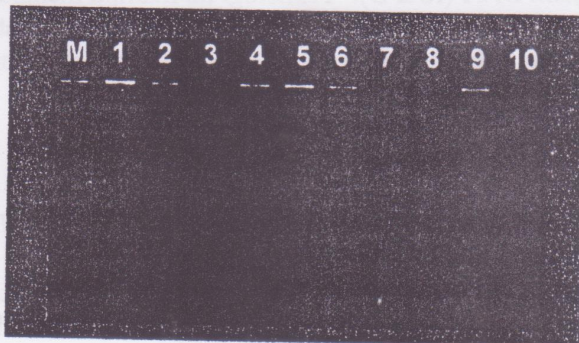
Amplifikasi DNA dilakukan dalam alat thermocycler berturut-turut : Inisiasi 94°C selama 1 menit, denaturasi 95°C selama 30 detik, annealing 37°C selama 30 detik, 72°C selama 1,5

menit, dilakukan sebanyak 45 siklus diteruskan 72°C selama 8 menit. Hasil amplifikasi dipindah-kan ke gel agarose 1.5% yang mengandung 0,5 mg/ml ethidium bromida. 4,5 µl (1 kb ladder) digunakan sebagai standar pengukuran DNA marker. DNA gel didokumentasikan menggunakan kamera pada UV transiluminator. Jumlah primer yang digunakan sebanyak 100 primer 10 mer (Operon Technology Inc. Alameda) dievaluasi secara awal menggunakan tiga jenis. Masing-masing bulk DNA sampel terdiri dari 5 jantan dan 5 betina. Masing-masing DNA dibulk berdasarkan keseimbangan konsentrasi nukleotida (1 g/1 µ) per genotip.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi DNA salak

Hasil isolasi DNA menggunakan prosedur ekstraksi DNA yang menggunakan bufer pengestrak CTAB menghasilkan kualitas DNA yang cukup baik. Hal ini dapat dilihat dari produk pita yang dihasilkan berkisar antara 50 sampai 150 ng/µL.



Gambar 1. Hasil proses isolasi DNA dengan menggunakan bufer CTAB pada tanaman Salak (M) λ DNA, 1-5 sampel tanaman betina dan 6 – 10 sampel tanaman jantan

Analisis molekuler merupakan analisis yang dilakukan pada tingkat gen maupun ekspresinya yang bertujuan untuk mengkonfirmasi keberadaan gen melalui metode molekuler seperti PCR (Arheim dan Erlich 1992). Penggunaan RAPD selalu memperlihatkan keragaman lebih tinggi daripada alozim dan RFLP, sehingga sangat mendukung upaya analisis keragaman genetik terutama jika latar belakang genomnya belum diketahui. Teknik PCR memiliki kelebihan diantaranya sangat praktis, akan tetapi dapat terjadi positif semu jika reaksi yang dipergunakan mengandung kontaminan. Analisis PCR perlu menggunakan beberapa kontrol untuk menghindari terjadinya positif maupun negatif semu.

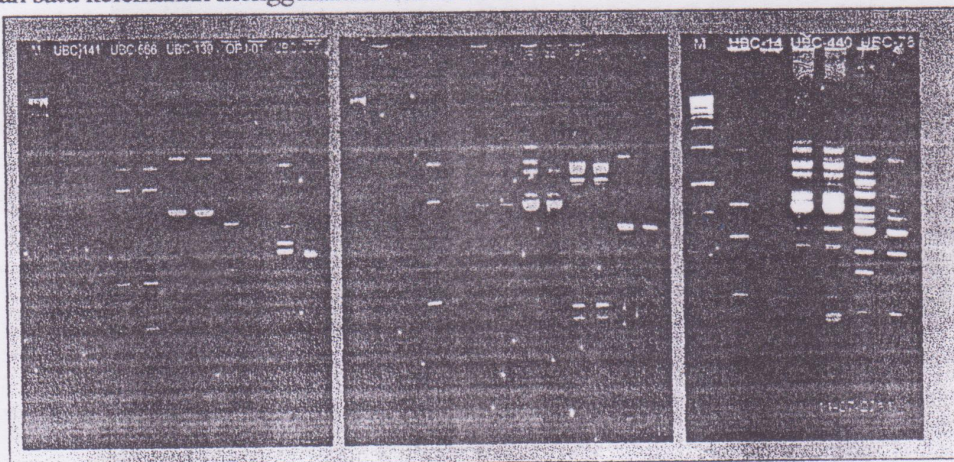
Screening Primer dan screening individu salak

Penentuan kelamin jantan dan betina pada banyak tanaman tidak dapat dijelaskan dari aspek morfologi saja. Penentuan penanda terkait region pengendali kelamin pada analisis RAPD tergantung dari sekuens primer yang digunakan. Untuk lebih jelaskan pita yang dihasilkan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Screening primer menggunakan Bulk Segregation Analysis (BSA) sebanyak 30 primer dari 300 primer yang digunakan untuk menentukan pola pita spesifik terkait gen pengendali kelamin

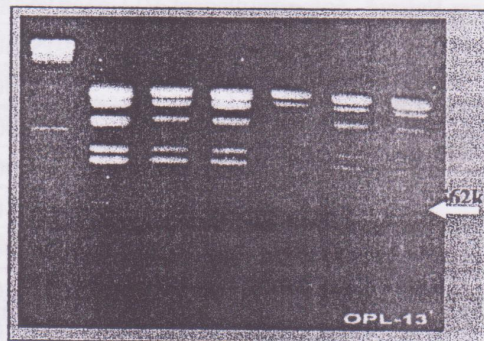
No.	Primers	Screening Primer			Screening Individu		Rata-rata
		♀	♂	Mono	♀	♂	
1	OPA-01	14	14	0	-	-	14,00
2	OPA-05	19	19	0	-	-	19,00
3	OPA-07	7	7	0	-	-	7,00
4	OPA-08	14	14	0	-	-	14,00
5	OPA-10	17	17	0	-	-	17,00
6	OPA-11	20	23	3	0	3	21,50
7	OPA-11	17	19	2	1	1	18,00
8	OPA-13	17	18	1	0	1	17,50
9	OPA-19	14	15	1	-	1	14,50
10	OPA-19	18	18	2	1	1	18,00
11	OPA-20	18	18	0	-	-	18,00
12	OPAC-12	17	17	0	-	-	17,00
13	OPAE-08	16	16	0	-	-	16,00
14	OPAF-14	14	14	0	-	-	14,00
15	OPAL-12	14	14	0	-	-	14,00
16	OPAV-16	18	16	2	2	1	17,00
17	OPB-01	18	18	0	-	-	18,00
18	OPB-01	14	14	0	-	-	14,00
19	OPB-06	18	19	1	-	1	18,50
20	OPB-11	3	3	3	3	3	3,00

Penggunaan sebanyak 300 primer RAPD menghasilkan beberapa primer yang menjadi penentu terkait kelamin jantan dan betina pada tanaman salak, sebanyak 15 primer 4,5 % mampu menghasilkan pola pita polimorfisme dengan pita spesifik terkait pengendali kelamin. Jumlah pita yang dihasilkan berkisar antara 3,5 hingga 21 pita. Meskipun menggunakan banyak primer, penggunaan Bulk Segregation Analysis (BSA) meskipun mampu menghasilkan pola pita spesifik, namun keterkaitan dengan pengendali kelamin juga lemah. Hal itu merupakan salah satu kelemahan menggunakan teknik RAPD.



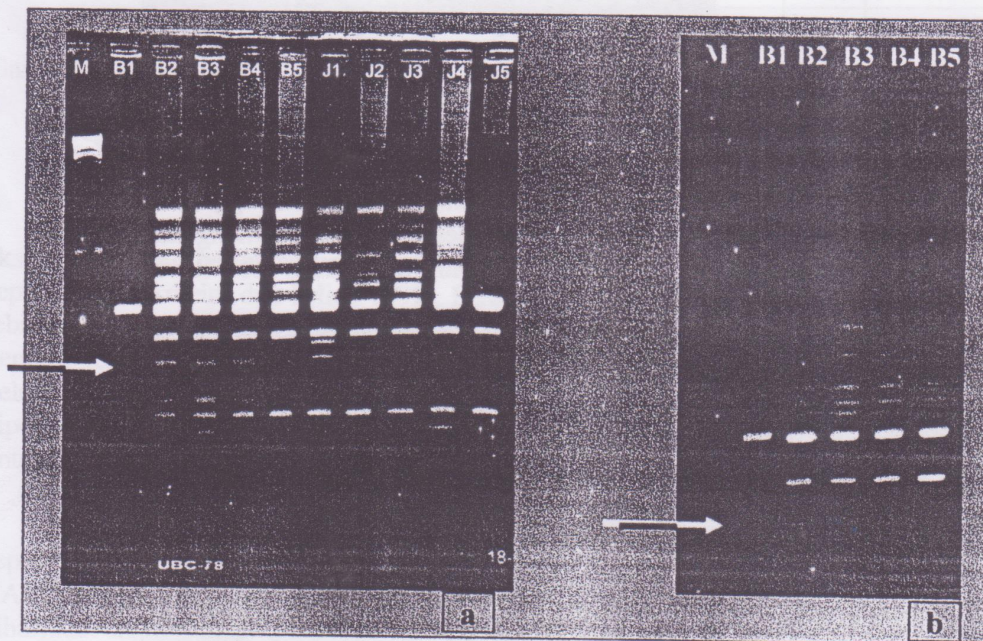
Gambar 2. Screening primer RAPD menggunakan DNA Bulk, dengan konsentrasi primer 20pmol

Diantara 6 primer terkait pengendali kelamin jantan, hanya satu primer yang memiliki tingkat akurasi yang tinggi, yaitu primer OPL-13. Pita yang dihasilkan berukuran 562 bp. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Pola pita terkait pengendali kelamin jantan pada tanaman salak dengan ukuran 562 bp (tanda panah) dengan menggunakan primer OPL-13 (20 μ mol) pada agarose 1,5% pada 100 volt selama 2 jam.

Sedangkan pola pita yang terkait pengendali kelamin betina juga ada 9 primer. Diantara 9 primer tersebut setelah dilakukan uji individunya, hanya 1 primer yang konsisten dengan tingkat akurasi yang baik. Primer UBC-78 mampu menghasilkan pola pita spesifik terkait kelamin betina. Pita yang dihasilkan berukuran 469 bp. Pita yang dihasilkan hampir sama dengan pita yang lainnya, sehingga pada running elektroforesis yang dilakukan selama 2 jam, belum mampu memisahkan pita yang dihasilkan, sehingga perlu penambahan waktu. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Pola pita terkait pengendali kelamin betina pada tanaman salak dengan menggunakan prime UBC-78 (GAGCACTAGC) yang berukuran 469 bp (lihat tanda panah) dengan waktu runing elektroforesis 100 volt selama 2 jam (a), dengan waktu runing 100 volt selama 3 jam (b).

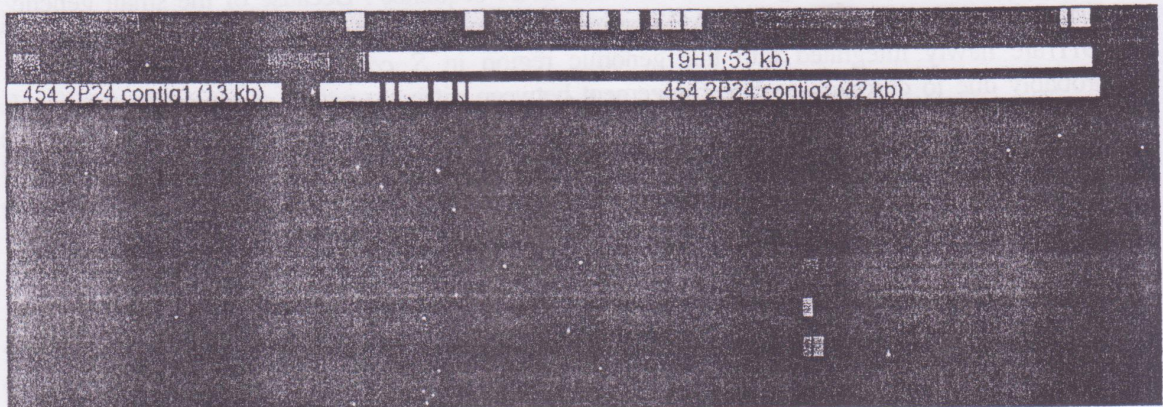


Figure 3. 2P24 454 sequencing and several genes found in this area.

Approaches to extend the BAC contig

The existing contig were extended to conceal *R* gene that may present as functional resistance gene homologs (RGH). The existing putative gene in the 2P24 overhang sequence was predicted using FGenesh and InterProScan. FGenesh algorithm from the Softberry website was used to find genes within the 2P24 sequence and InterProScan was used to identify the gene families. From this blasting we found retrotransposons and aminotransferase and we did not find any additional *R* gene homologs in the overhang sequence. The *R* gene cluster was found only in the overlap between 2P24 and 19H1 sequence. With retrotransposons in contig 2P24 overhang and RGA in contig 19H1 end it is difficult to develop markers that could be use to extend the BAC contig. Therefore synthenous sequence from *S. capsicibacatum* relatives was used to develop markers.

DISCUSSION

BAC screening and contig extension

The T region of 2P24 contig contains retrotransposons (Figure 2) that hindered the BAC screening. Retrotransposons as transposable elements are frequently found in plant genome (Wessler 1996). Consequently primers from this region will amplify bands from almost all of the BAC pools available, for this reason it is impossible to screen for BACs flanking 2P24 with markers located at the ends. BAC screening with 2P24 S primers was not successful also, because in this region contains an resistance gene analogs (RGA). Because of those difficulties the synthenous *S. phureja* sequence was used to develop markers. A huge gap between 1F4 and 2P24 is suggested since different

Huffman, Z. and D. M. Spooner (2002). "Reclassification of landraces populations of cultivated tomatoes (*Solanum esculentum* L.)". *American Journal of Botany* 89(6): 947-963.

Jacobs, M. M. J., R. Voerman, et al. (1999). "A novel approach to locate Phytoalexin biosynthetic resistance genes on the potato genome map". *Theor Appl Genet*.

Kohs, G. M. (1997). *Cloning High-Throughput DNA Libraries into the Gateway-1 Vector Systems*. *Primer3 Notes Magazine*.

Konieczny, A. and F. M. Ausubel (1980). "A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR based markers". *Theor Appl Genet* 4: 411-416.

DM scaffolds are aligned with 1F4 and 2P24 sequence. Because of the small genetic distance observed between the BAC contigs, it is postulated that the RGA from 2P24 and 19H1 are newly integrated into this genomic region in *S. capsicibacatum*. Another reason probably due to chromosomal rearrangement between different potato species. Chromosomal rearrangement was observed in potato and tomato short arm chromosome 6 using cross species multi color BAC-FISH method (Xiaomin Tang, Dora Szinay et al. 2008), this phenomenon might occur also in chromosome 11 where the *Rpi-cap1* gene cluster is located.

Repulsion and coupling phase

HRM distinguishes alleles and measures differential expression of alleles between different organs, storage treatments, stage of tubers, and between varieties (Yuan, Haroon et al. 2009). While the HRM sensitivity of heterozygote scanning approaches 100% (Wittwer 2009). The difficulties to determine the coupling or repulsion phase using HRM, caused by lack of information in the alleles involved which determine the pattern observed.

Single pattern in susceptible plants and large diversity observed in resistant plants HRM curve differences (Figure 1) indicate that the susceptible plants are homozygous while the resistant plants are heterozygous. The resistance alleles sequencing resulted in two different consensus with three SNP's observed. While from the susceptible alleles only one consensus observed and the K18 amplicon is similar to this consensus. It is concluded that K18 BAC clone screened with 825_24b using Light Scanner was in repulsion phase, therefore the putative R gene was not in this plasmid. This finding suggested that in some cases (solid and different curve of resistant and susceptible plants) the HRM could be used to distinguish between coupling or repulsion phase of screened clones.

For further study, the K18 BAC end can be used to screen other BAC pools in coupling phase. The BAC end sequence of K18 is more informative than the *S. phureja* sequence, since the R-gene cluster in *S. capsicibacatum* might be newly integrated in the *S. capsicibacatum* hence the R-gene cluster was not available in *S. phureja* sequence. Alternatively, the rest of the BAC library can be screened using the melting curve of 825_24b marker on K18 BAC as control for the repulsion phase.

ACKNOWLEDGEMENT

We like to thank Prof. Dr. Ir. Evert Jacobsen and Dr. Ir. Yuling Bai, for supervising this study; Ing. Gert van Arkel for lab work assistance; Hendrik Rietman and Gerard Bijsterbosch for providing the effectors; and Koen Pelgrom for the agroinfiltration and greenhouse preparation.

REFEREES

- Agrios, G. N. (2005). Plant Pathology. Burlington, Elsevier Academic Press.
- Andersson, B., A. K. Widmark, et al. (2009). The role of oospores in the epidemiology of potato late blight. Acta Horticulturae, **834**: 61-68.
- Andrews, J. H. and I. C. Tommerup (1995). Botanical Research. London, Academic Press.
- Borges, A., M. S. Rosa, et al. (2009). "CTAB methods for DNA extraction of sweet potato for microsatellite analysis." Sci. Agric. **66**(4): 529-534.
- Bradshaw, J. E., Bryan G, et al. (2006). "Genetic resources (including wild and cultivated *Solanum* species) and progress in their utilization in potato breeding." Potato Research **49**: 49-65.
- Bradshaw, J. E., M. F. B. Dale, et al. (2009). "Improving the yield, processing quality and disease and pest resistance of potatoes by genotypic recurrent selection." Euphytica **170**(1): 215-227.
- Ewing, E. E. and Simko. (2000). "Genetic mapping from field test of qualitative and quantitative resistance to *Phytophthora infestans* in population derived from *Solanum tuberosum* and *Solanum berthaultii*." Mol. Breed **6**: 25-34.
- FAOSTAT. (2010). Retrieved 22 February, 2010, from <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>.
- Golmirzaie, A. and J. Toledo (1998). In vitro conservation of potato and sweet potato germplasm, CIP Program report 1997-8: 351-356.
- Gopal, J. and S. M. P. Khurana (2006). Handbook of potato production, improvement, and post harvest management. New York, Food Product Press.
- Haverkort, A. J., P. M. Boonekamp, et al. (2008). "Societal costs of late blight in potato and prospects of durable resistance through cisgenic modification." Potato Research **51**(1): 47-57.
- Hawkes, J. G. and J. Francisco-Ortega (1993). "The early history of the potato in Europe." Euphytica **70**(1-2): 1-7.
- Howard, H. W. (1970). Genetics of potato *Solanum tuberosum*. London, Logos Press Limited.
- Huaman, Z. (1986). Systematic botany and morphology of the potato. Lima, International Potato Center.
- Huaman, Z. and D. M. Spooner (2002). "Reclassification of landrace populations of cultivated potatoes (*Solanum* sect. *Petota*)." American Journal of Botany **89**(6): 947-965.
- Jacobs, M. M. J., B. Vosman, et al. (2009). "A novel approach to locate *Phytophthora infestans* resistance genes on the potato genetic map." Theor Appl Genet.
- Kobs, G., Ed. (1997). Cloning Blunt-End DNA Fragments Into the pGEM®-T Vector Systems. Promega Notes Magazine
- Konieczny, A. and F. M. Ausubel (1993). "A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR based markers." Plant J **4**: 403-410.

- Lokossou, A. A., T. H. Park, et al. (2009). "Exploiting knowledge of R/Avr genes to rapidly clone a new LZ-NBS-LRR family of late blight resistance genes from potato linkage group IV." Molecular plant-microbe interactions : MPMI 22(6): 630-641.
- Martin, G. B., S. H. Brommonschenkel, et al. (1993). "Map-Based Cloning of a Protein Kinase Gene Conferring Disease Resistance in Tomato." Science 262: 1432-1436.
- Nassonova, E. S. (2008). "Pulsed Field Gel Electrophoresis: Theory, Instruments and Application." CELL AND TISSUE BIOLOGY 2(6): 557-565.
- O'Brien, M. and E. Mullins (2009). "Relevance of genetically modified crops in light of future environmental and legislative challenges to the agri-environment." Annals of Applied Biology 154(3): 323-340.
- Rehman, A.-U., B. Stodart, et al. (2007). "A high throughput, non-organic method for plant genomic DNA isolation." Pak. J. Bot. 39(3): 831-840.
- Simko, I. (2002). "Comparative analysis of quantitative trait loci for foliage resistance to *Phytophthora infestans* in tuber-bearing *Solanum* species." Am. J. Potato Res 79: 125-132.
- Spooner, D. M. and J. B. Bamberg (1994). "Potato genetic resources: Sources of resistance and systematics " American Journal of Potato Research 71(5): 325-337.
- Van der Vossen E.A.G., Gros J, et al. (2005). "The Rpi-blb2 gene from *Solanum bulbocastanum* is an Mi-1 gene homolog conferring broad-spectrum late blight resistance in potato." Plant J 44: 208-222.
- Wessler, S. R. (1996). "Plant retrotransposons: turned on by stress." Current Biology 6(8): 959-961.
- Wittwer, C. T. (2009). "High-resolution DNA melting analysis: Advancements and limitations." Human Mutation 30(6): 857-859.
- Xiaomin Tang, Dora Szinay, et al. (2008). "Cross-species BAC-FISH painting of the tomato and potato chromosome 6 reveals undescribed chromosomal rearrangements." Genetics 180: 1319-1328.
- Yuan, J., M. Haroon, et al. (2009). "A high-resolution melting approach for analyzing allelic expression dynamics." Current Issues in Molecular Biology 11(SUPPL. 1).