

ANALISIS POLA SEGREGASI DNA GENOM KLOROPLAS HASIL HIBRIDISASI SOMATIK TANAMAN KENTANG MENGGUNAKAN TEKNIK RAPD (RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA)

(Analysis of Chloroplast Genome Segregation Pattern in the Somatic Hybridization Potato Using Rflp Method from Amplified Polymerase Chain Reaction (PCR))

Sudirman Numba*

**)Study Program of Agrotechnology, Agriculture Faculty, UMI Makassar*

ABSTRACT

Segregation pattern of the chloroplast genome in somatic hybridization potato between *S. tuberosum* cv. BF-15 and the wild species of *S. stenotomum* was identified through RFLP analysis in 3.2 kb fragment produced from PCR amplification for specific regions of DNA chloroplast. PCR amplification was performed by using *rbcL* primer and ORF106, i.e. specific primer located on konsenrvatiive sequence which flanking 3.2 kb fragment region of DNA chloroplast. PCR amplification product used two primers, in conformity with the target region on DNA chloroplast, where generated fragments or DNA bands with a size of about 3.2 kb. The 3.2 kb fragment produced from amplification was cut by using two kinds of restriction enzymes *HhaI* and *RSAl*. Restriction Enzym treatment with *HhaI* resulted in four bands each measuring; those were 2.0 kb, 1.2 kb, 0.8 kb and 0.4 kb. While the treatments by using *RSAl* restriction enzymes, also resulted in four bands each measuring, those were 1.6 kb, 0.7 kb, 0.3 kb and 0.2 kb. Band pattern that produced from restriction enzyme showed that monomorphic nature or not polymorphic at all elder fusion plant, so this method can not be used to identify the patterns of chloroplast genome segregation in plant which is produced by somatic hybridization.

Keywords: DNA chloroplast, *rbcL* (ribulose 1.5-bisphosphate carboxylase gene), Open reading frame 106 (ORF106), PCR, RFLP, *S.tuberosum*, *S. stenoton*

PENDAHULUAN

Informasi mengenai pola segregasi material genetik organel sel, khususnya genom kloroplas pada tanaman hibrida somatik sangat diperlukan, karena beberapa sifat agronomi yang penting disandikan oleh genom kloroplas. Selain itu genom kloroplas lebih mudah teridentifikasi dibanding genom mitokondria yang seringkali mengalami *rearrangement* (penyusunan ulang).

Keragaman fenotipik di lapang terjadi pada tanaman hibrida somatik kentang hasil hibridisasi somatik antara *S. tuberosum* cv. BF-15 dan spesies liarnya *S. stenotomum*, seperti yang dapat dilihat pada jumlah umbi per tanaman maupun bobot umbi pertanaman (Purwito, 1999). Keragaman tersebut mungkin ada kaitannya dengan pola segregasi kloroplas pada tanaman hibrida somatik, karena diketahui bahwa kloroplas merupakan organel yang bertanggung jawab terhadap

kemampuan tanaman untuk berfoto sintesis.

Identifikasi pola segregasi genom kloroplas kentang hibrida somatik hasil fusi antara BF-15 dan *S.phureja* dilakukan oleh Sihachakr *et al.*, (komunikasi pribadi) dengan menggunakan metode RAPD pada DNA genom kloroplas. DNA murni genom kloroplas digunakan sebagai DNA cetakan pada analisis RAPD. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa pola segregasi kloroplas terjadi secara acak, karena dari sepuluh tanaman hibrida somatik terdapat dua tanaman yang membawa genom kloroplas BF-15 dan delapan tanaman yang membawa kloroplas *S. phureja*.

Berdasarkan hasil analisis keragaman genetik antara tetua fusi menunjukkan bahwa *S. phureja* lebih sekerabat terhadap BF-15 (tingkat kesamaan sekitar 70 %) dibanding dengan *S. stenotomum* terhadap BF-15 (tingkat kesamaan sekitar 60 %), sehingga dengan demikian kemungkinan pola segregasi genom kloroplas pada hasil hibridisasi somatik antara BF-15 dan *S.phureja* berbeda dengan BF-15 dan *S.stenotomum*.

Analisis *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) terhadap fragmen hasil amplifikasi PCR dari DNA kloroplas

telah dikembangkan, dan menjadi metode handal dan terbaru yang dapat digunakan untuk mendeteksi variasi DNA kloroplas. Arnold *et al.* (1991) melaporkan bahwa polimorfisme pola pita DNA yang dihasilkan dapat digunakan untuk mengidentifikasi tetua dari biji suatu tanaman.

Analisis RFLP terhadap fragmen hasil amplifikasi PCR dari genom kloroplas memiliki beberapa kelebihan dibanding analisis RFLP menggunakan DNA pelacak dari DNA kloroplas, karena prosedurnya lebih sederhana, jumlah DNA yang dibutuhkan lebih sedikit, serta lebih efisien dari segi waktu dan biaya (Liston, 1992). Oleh karena itu metode ini lebih menguntungkan digunakan dalam mendeteksi variasi DNA kloroplas.

Analisis keragaman DNA kloroplas tanaman terong (*S. melongena*) dan spesies liarnya telah dilakukan untuk tujuan studi taksonomi (Sakata *et al.*, 1991; Sakata and Lester, 1994), dan untuk mengidentifikasi pola segregasi DNA sitoplasmik pada tanaman hibrida somatik (Guri dan Sink, 1988; Daunay *et al.*, 1993), akan tetapi metode yang digunakan pada studi tersebut tidak didasarkan pada analisis RFLP pada hasil amplifikasi PCR.

Penggunaan primer spesifik yang dapat mengamplifikasi bagian tertentu dari genom kloroplas juga dapat digunakan untuk mempelajari pola segregasi genom kloroplas. Pola segregasi dapat dipelajari dengan melakukan pemotongan menggunakan enzim restriksi terhadap fragmen hasil amplifikasi yang dihasilkan. Oghihara *et al.*, (1991) melaporkan bahwa dengan menggunakan primer spesifik dari sekuen konservatif antara gen *Ribulosa-1,5-bisphosphate carboxylase (rbcL)* dan *open reading frame 106 (ORF1-6)* dapat mengamplifikasi daerah yang bervariasi dari DNA kloroplas sebesar 3,2 kb.

Keragaman DNA dari fragmen berukuran 3,2 kb tersebut ditemukan terjadi pada beberapa spesies tanaman (Arnold *et al.*, 1991 ; Liston *et al.*, 1992 ; Badenes dan Parfitt, 1995 ; Yonemori *et al.*, 1996), seperti pada tanaman terong (*Solanum melongena*) dilaporkan bahwa fragmen ini dapat menunjukkan pola pita yang polimorfik bila dipotong menggunakan enzim restriksi seperti *TaqI*, *AluI*, *RsaI*, *StyI*, *AseI*, *HinfI* dan *XbaI* (Issiki *et al.*, 1998). Dengan demikian maka primer spesifik tersebut berpotensi untuk digunakan pada studi pola segregasi

genom kloroplas pada tanaman kentang hasil hibridisasi somatik.

Untuk mempelajari pola segregasi genom kloroplas dan untuk mengetahui apakah ada hubungan antara keragaman fenotipik di lapang dengan pola segregasi kloroplas hasil fusi BF-15 + *S.stenotomum*, maka dilakukan percobaan untuk mengidentifikasi tipe kloroplas pada masing-masing tanaman hibrida somatiknya.

Informasi yang diperoleh dari percobaan ini diharapkan dapat digunakan untuk membantu menyeleksi tanaman hibrida somatik yang memiliki potensi produksi yang tinggi, serta memiliki sifat ketahanan terhadap hama penyakit.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler dan Selluler PAU Bioteknologi IPB dan Laboratorium Terpadu Pusat Studi Pemuliaan Tanaman, Jurusan Budidaya Pertanian Institut Pertanian Bogor.

Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun tanaman kentang yang diambil dari tempat perbanyakan pada Laboratorium Kultur Jaringan Kentang Jurusan Budidaya

tanaman Fakultas Pertanian IPB Bogor. Contoh daun diambil dari tetua fusi yang digunakan Purwito (1999) yaitu BF-15, Nicola, Aminca, Cardinal, SpV-10 dan *S. stenotomum*, serta tanaman hasil hibridisasi somatik antara BF-15 dan *S. stenotomum* (A-5, A-5A, A-5C, A-10C, A-17, A-18A, A-18B1, A-18B3, A-18B4, A-18C, A-18D, A-18E1, A-18E3, A-18E4, A-18E5, A-18E6, A-18E8, A-20, A-20A, A-20B, dan A-20C).

Amplifikasi PCR Menggunakan Primer Spesifik

Penelitian ini dilakukan dengan melakukan amplifikasi PCR menggunakan primer spesifik untuk bagian tertentu dari genom kloroplas, seperti yang dilaporkan oleh Arnold *et al.* (1991) yaitu primer spesifik *rbcL* (5'-ATGTCACCACAAACAGAACTAAA GCAAGT-3') dan primer *ORF106* (5'-ACTACAGATCTCATACTACCCC-3') yang digunakan mengamplifikasi beberapa DNA total genom tetua fusi. Fragmen DNA hasil Amplifikasi PCR berukuran 3,2 kb seperti yang dilaporkan Oghihara *et al.* (1991) kemudian dipotong menggunakan dua macam enzim restriksi yaitu *RsaI*, dan *HhaI*.

Jenis enzim restriksi yang menghasilkan pola pita DNA yang menunjukkan polimorfisme dari fragmen berukuran 3,2 kb tersebut, selanjutnya digunakan untuk mengidentifikasi pola segregasi kloroplas pada tanaman hasil hibridisasi somatik.

1. Ekstraksi DNA Total Genom Tanaman dan Analisis PCR

Ekstraksi DNA total genom tanaman yang akan digunakan sebagai DNA cetakan dan prosedur analisis PCR dilakukan seperti pada percobaan sebelumnya.

Campuran reaksi untuk PCR (*Polymerase Chain Reaction*) disiapkan dengan total volume 100 μ L (Arnold *et al.*, 1991) yang masing-masing mengandung 250 ng/ μ L DNA cetakan, 10 mM dNTP (dATP, dGTP, dTTP dan dCTP), 70 pmol primer, 2,5 unit *Taq DNA polymerase* dan 1,5 M Buffer+MgCl₂. Amplifikasi dilakukan dengan menempatkan campuran reaksi pada blok, dimana suhu pra amplifikasi 94°C selama 1 menit untuk terjadinya denaturasi DNA. Selanjutnya mengatur reaksi siklus dengan program step cycle (*DNA Thermal Cycler*) sampai mencapai 30 siklus yang masing-masing siklus terdiri dari 3 tahap yaitu

tahap 1 untuk denaturasi dengan pemanasan 94°C selama 1 menit, tahap 2 untuk pelekatan primer pada suhu 55°C selama 1 menit dan tahap 3 untuk perpanjangan pada suhu 72°C selama 4 menit. Setelah 30 siklus ditambahkan waktu inkubasi pada suhu 72°C selama 5 menit untuk memastikan bahwa DNA yang diamplifikasi telah mengalami renaturasi, untuk keperluan tersebut digunakan program *thermal delay* yaitu inkubasi pada suhu 72°C selama 5 menit, kemudian diikuti pendinginan (4°C).

2. Pemotongan Fragmen DNA 3,2 kb dengan Enzim Restriksi

Sebanyak 10 µl aliquots hasil amplifikasi PCR dari DNA tetua dan hasil hibridisasi somatik antara BF-15 dan *S. stenotomum* selanjutnya dipotong dengan masing-masing enzim restriksi (*HhaI*, dan *RsaI*). Fragmen DNA hasil pemotongan enzim restriksi tersebut selanjutnya ditambahkan dengan 3 µL *buffer loading* (mengandung bromo fenol blue dan sukrosa), kemudian dimigrasikan pada elektroforesis gel agarosa (1,8 %) dengan tegangan 45 volt selama 2 jam. Gel hasil elektroforesis selanjutnya direndam pada larutan etidium bromida selama lima

menit, lalu dibilas dengan aquades. Gel kemudian diamati dengan menggunakan UV transilluminator, dan pola pita (profil) DNA hasil amplifikasi diamati dan difoto menggunakan kamera polaroid.

3. Analisis Pola Segregasi Genom Kloroplas

Enzim restriksi dengan hasil pemotongan yang menunjukkan pola pita yang polimorfik antara dua tetua yang difusikan yaitu BF-15 dan *S. stenotomum*, selanjutnya digunakan untuk menguji pola pita DNA kloroplas terhadap semua tanaman hasil fusi dari kedua tetua tersebut. Pola segregasi DNA kloroplas pada tanaman hasil hibridisasi somatik ditentukan dengan membandingkan pola pita DNA atau tipe kloroplas kedua tetuanya.

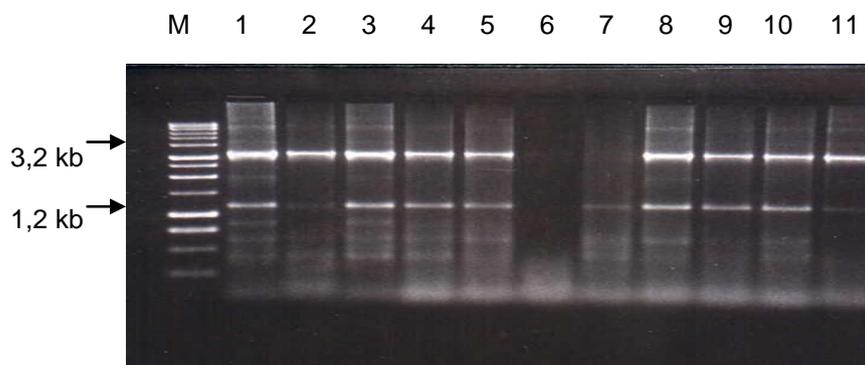
HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Ekstraksi DNA Total Genom Tanaman dan Analisis PC

Hasil amplifikasi PCR dengan primer *rbcL* dan *ORF106* pada DNA tetua fusi sebagai cetakan (template) menunjukkan bahwa selain fragmen berukuran 3,2 kb yang dihasilkan oleh primer spesifik tersebut, juga terdapat fragmen berukuran

1,2 kb. Fragmen dengan ukuran sekitar 3,2 kb muncul pada semua sampel yang dianalisis dan menunjukkan bahwa tidak terdapat variasi antara setiap tetua fusi, hal ini berarti pula bahwa bagian tertentu dari DNA kloroplas yang dijadikan target dapat teramplifikasi secara benar. Sedangkan fragmen dengan ukuran sekitar

1,2 kb hanya muncul pada sampel BF-15, *S.phureja*, Aminca, Cardinal, Nicola, tetapi tidak muncul pada *S. stenotomum*. Data mengenai hasil amplifikasi PCR menggunakan primer *rbcL* dan *ORF106* pada tetua fusi dan beberapa hibrida somatik disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Profil DNA Hasil ampilfikasi PCR dengan Menggunakan Primer *rbcL* dan *ORF 106*. 1-kb ladder (M), BF-15 (1), *S.stenotomum* (2), *S.phureja* (3), Aminca (4), Cardinal (5), Nicola (6), SpV-10 (7), BFP-56 (8), A.5A (9), Amcar.33 (10), BF-15.P10 (11).

Pada tanaman terong (*S. melongena*) dan beberapa spesies liarnya dilaporkan bahwa amplifikasi dengan menggunakan primer *rbcL* dan *ORF106* hanya menghasilkan fragmen tunggal berukuran sekitar 3,2 kb (Isshiki et al, 1998), sedangkan fragmen dengan ukuran sekitar 1,2 kb tidak ditemukan. Fragmen berukuran sekitar 1,2 kb ini kemungkinan tidak spesifik terdapat pada kloroplas karena DNA cetakan yang digunakan adalah DNA total genom tanaman.

2. Pemotongan DNA Hasil Amplifikasi dengan Enzim Restriksi

Fragmen DNA yang merupakan hasil amplifikasi PCR kemudian dipotong dengan menggunakan enzim restriksi *RsaI* dan *HhaI*. Hasil pemotongan menunjukkan bahwa fragmen 3,2 kb dan 1,2 kb bila dipotong dengan enzim restriksi *HhaI* menghasilkan empat fragmen dengan ukuran masing-masing 0,4 kb, 0,8 kb, 1,2 kb dan 2,0 kb. Demikian pula bila dipotong dengan

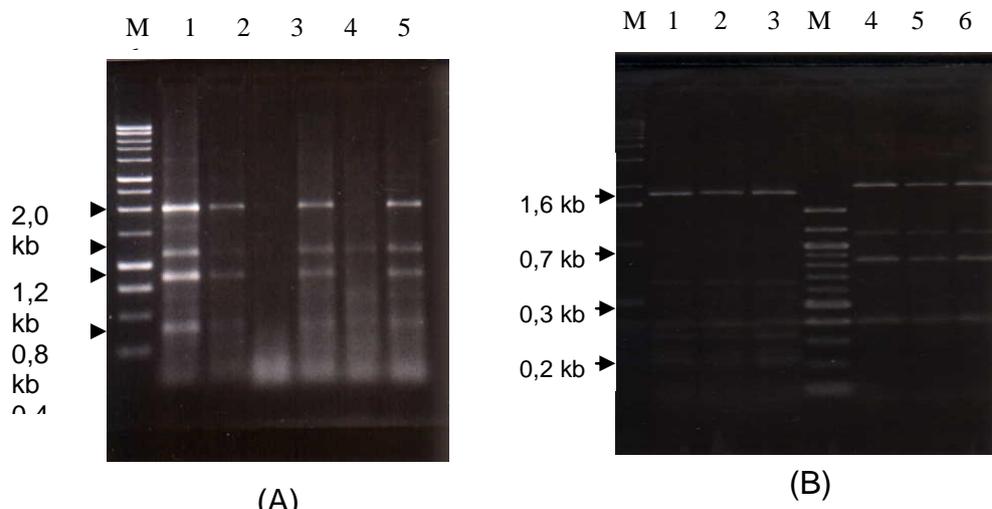
enzim restriksi *RsaI* juga menghasilkan empat fragmen dengan ukuran masing-masing 0,2 kb., 0,3 kb, 0,7 kb dan 1,6 kb. Data hasil pemotongan fragmen DNA 3,2 kb dan 1,2 kb menggunakan enzim restriksi *HhaI* dan *RsaI* disajikan pada Gambar 2.

Gambar 2 menunjukkan bahwa pola pita hasil pemotongan dari kedua enzim restriksi yang digunakan (*RsaI* dan *HhaI*) pada semua sampel masih bersifat monomorfik, sehingga metode analisis RFLP dari fragmen 3,2 kb tersebut tidak dapat digunakan untuk identifikasi pola segregasi genom kloroplas pada tanaman hasil hibridisasi somatik antara BF-15 dan *S. stenotomum*. Dengan demikian masih harus dicari enzim lain yang memungkinkan memberikan hasil pemotongan yang bersifat polimorfik.

Hasil penelitian sebelumnya pada *Solanum melongena* (Isshiki *et al.*, 1998) menggunakan beberapa enzim restriksi

lain, ternyata dapat menunjukkan variasi pada daerah amplifikasi yaitu *AluI*, *AseI*, *BamHI*, *HinfI*, *MspI*, *ScrFI*, *StyI*, *TaqI*, dan *XbaI*. Kemungkinan lain dari hasil yang monomorfik tersebut disebabkan karena memang tidak ada variasi pada daerah yang teramplifikasi.

Pada waktu yang hampir bersamaan, studi tentang pola segregasi kloroplas pada tanaman hasil hibridisasi somatik antara BF-15 dan *S. phureja* serta BF-15 dan *S. stenotomum*, juga dilakukan oleh Sihachackr *et.al.* (2000). Pendekatan yang digunakan adalah dengan melakukan analisis RAPD pada genom kloroplas. Analisis RAPD dilakukan dengan cara mengisolasi organel kloroplas dan memisahkannya dengan organel mitokondria dan inti sebelum kegiatan ekstraksi DNA kloroplas, sehingga diperoleh total DNA kloroplas yang murni tanpa terkontaminasi dengan DNA mitokondria dan inti.



Gambar 2. Profil DNA Hasil amplifikasi PCR yang dipotong dengan enzim restriksi *HhaI* (A), *RsaI* dan *HhaI* (B). 1-kb ladder (M), BF-15 (1), *S. stenotomum* (2), *S. phureja* (3), Aminca (4), Cardinal (5), Nicola (6), 1-kb ladder (M), BF-15 (1), *S. phureja* (2), D.25 A (3) dengan *RsaI*, 100 bp ladder (M), B-15 (4), *S. phureja* (5), D.25 A (6) dengan *HhaI*

Hasil penelitian sebelumnya pada *Solanum melongena* (Isshiki *et al.*, 1998 dan Ames *et al.*, 2008) menggunakan beberapa enzim restriksi lain, ternyata dapat menunjukkan variasi pada daerah amplifikasi yaitu *AluI*, *AseI*, *BamHI*, *HinfI*, *MspI*, *ScrFI*, *StyI*, *TaqI*, dan *XbaI*. Kemungkinan lain dari hasil yang monomorfik tersebut disebabkan karena memang tidak ada variasi pada daerah yang teramplifikasi.

Pada waktu yang hampir bersamaan, studi tentang pola segregasi kloroplas pada tanaman hasil hibridisasi somatik antara BF-15 dan *S. phureja* serta BF-15 dan *S. stenotomum*, juga dilakukan oleh Sihachackr *et.al.* (2000). Pendekatan

yang digunakan adalah dengan melakukan analisis RAPD pada genom kloroplas. Analisis RAPD dilakukan dengan cara mengisolasi organel kloroplas dan memisahkannya dengan organel mitokondria dan inti sebelum kegiatan ekstraksi DNA kloroplas, sehingga diperoleh total DNA kloroplas yang murni tanpa terkontaminasi dengan DNA mitokondria dan inti.

Selanjutnya dilaporkan bahwa hasil analisis RAPD genom kloroplas pada tetua fusi dan hasil hibridisasi somatiknya, menunjukkan bahwa pola segregasi genom kloroplas pada tanaman kentang hasil hibridisasi somatik bersifat acak, dimana dari 10 tanaman hibrida somatik

antara BF-15 dan *S. phureja* terdapat dua nomor individu yang identik dengan genom kloroplas BF-15 dan delapan nomor individu yang identik dengan genom kloroplas *S. phureja*. Demikian pula terjadi pada hibridisasi somatik antara BF-15 dan *S. stenotomum*, sebagian tanaman hasil hibridisasi somatiknya mengikuti tipe kloroplas tetua BF-15 dan sebagian lainnya mengikuti tipe kloroplas tetua *S. stenotomum* (Sihachakr, 2000) (komunikasi pribadi).

Dengan demikian maka analisis segregasi genom kloroplas lebih memungkinkan dilakukan dengan menggunakan metode RAPD pada genom kloroplas murni, dibanding menggunakan metode RFLP hasil amplifikasi PCR daerah tertentu dari DNA kloroplas. Hal yang penting diperhatikan pada analisis RAPD genom kloroplas adalah kemampuan untuk memisahkan dan memurnikan organel kloroplas dari organel mitokondria dan inti. Perbedaan hasil yang diperoleh dari analisis RFLP DNA kloroplas antara kentang (*Solanum tuberosum* L) dan terong (*Solanum melongena* L) dengan spesies liarnya, adalah kemungkinan fragmen 3,2 kb dari DNA kloroplas kentang lebih konservatif.

Informasi tersebut menunjukkan pula bahwa pada tanaman kentang hasil hibridisasi somatik, hanya satu tipe genom kloroplas tetua yang bertahan dan yang lainnya akan mengalami kejadian *sorting out*. Selain itu, diketahui pula bahwa genom kloroplas tanaman kentang hasil hibridisasi somatik tidak mengalami rekombinasi dan *rearrangement*, karena pola pita DNA kloroplas tanaman hasil hibridisasi somatiknya semuanya identik dengan pola pita DNA kloroplas tetuanya.

KESIMPULAN

1. Amplifikasi genom kloroplas pada semua tetua fusi menggunakan primer *rbcL* dan *ORF106* dengan PCR menghasilkan fragmen DNA berukuran 3,2 kb. Analisis RFLP pada fragmen 3,2 kb menggunakan enzim restriksi *RsaI* dan *HhaI* pada semua sampel tetua fusi yang digunakan menghasilkan pola pita yang bersifat monomorfik.
2. Metode analisis RFLP pada fragmen DNA berukuran 3,2 kb hasil amplifikasi PCR menggunakan primer *rbcL* dan *ORF106* dari genom kloroplas, tidak dapat digunakan untuk identifikasi pola segregasi genom kloroplas tanaman hasil hibridisasi

somatik antara BF-15 dan *S. stenotomu*.

hybrids of eggplant (*Solanum melongena* L.) with *Solanum aethiopicum* L. *Theor Appl Genet* 85: 841-850.

DAFTAR PUSTAKA

- Ames, M., and Spooner, M.,D. 2008. DNA from herbarium specimens settles a controversy about origins of the European potato. *American Journal. Botanic.* 95 (2) 252-257
- Arnold, M.L., C.M. Buckner and J.J. Robinson, 1991. Polen mediated introgression and hybrid speciation in Louisiana irises. *Proc. Natt. Acad Sci USA* 88: 1398-1402.
- Badenes, M.L. and D.E. Parfitt, 1995. Phylogenetic relationships of cultivated *Prunus* species from an analysis of chloroplast DNA variation. *Theor Appl Genet.* 90: 1035-1041.
- Barone A, Li J, Sebastiano A, Cardi T, Fruscianta L. 2002. Evidence for tetrasomic inheritance in a tetraploid *Solanum commersonii* (+) *S. tuberosum* somatic hybrid through the use of molecular markers. *Theor Appl Genet.* 104:539-546
- Behera TK, Singh N. 2002. Inter-specific crosses between eggplant (*Solanum melongena* L.) with related *Solanum* species. *Sci Hort* 95:165-172.
- Chen ZJ, Ni Z. 2006. Mechanism of genomic rearrangements and gene expression change in plant polyploids. *Bioessay* 28:240-252
- Daunay, M.C., M.H. Chaput, D. Sihachakr, M. Allot, F. Vedel And D. Ducreux, 1993. Production and characterization of fertile somatic hybrids of eggplant (*Solanum melongena* L.) with *Solanum aethiopicum* L. *Theor Appl Genet* 85: 841-850.
- Furini A, Wunder J. 2004. Analysis of eggplant (*Solanum melongena*)-related germplasm: morphological and AFLP data contribute to phylogenetic interpretations and germplasm utilization. *Theor Appl Genet.* 108:107-208.
- Guri, A. and K.C. Sink, 1988. Interspecific somatic hybrid plants between eggplant (*Solanum melongena*) and *Solanum torvum*. *Theor Appl Genet* 76: 321-326.
- Isshiki, S., T. Uchiyama, Y. Tashiro and S. Miyazaki, 1998. RFLP analysis of PCR amplified region of chloroplast DNA in eggplant and related *Solanum* species. *Euphytica* 102: 295-299.
- Isshiki S, Okubo H, Fujieda K. 2000. Segregation of isozymes in selfed progenies of a synthetic amphidiploid between *Solanum integrifolium* and *S. melongena*. *Euphytica* 112:9-14.
- Isshiki S, Suzuki S, Yamashita K. 2003. RFLP analysis of mitochondrial DNA in eggplant and related *Solanum* species. *Genet Resour Crop Evol.* (2003) 50:133-137.

- Liston, A., I.H. Rieseberg and M.A. Hanson, 1992. Variation in the chloroplast genes *rpoC1* and *rpoC2* of the genus *Astragalus* (Fabaceae); evidence from restriction site mapping of a PCR amplified fragment. *Amer J. Bot* 79: 953-961.
- Ogihara, Y.T., Terachi and T. Sasamuka. 1991. Molecular analysis of the hot spot region related to length mutations in wheat chloroplast DNAs. 1 nucleotide divergence of genes and intergenic spacer regions located in the hot spot region. *Genetics* 129: 873-884
- Purwito, A. 1999. Fusi protoplas Intra dan inter spesifik pada tanaman kentang. Disertasi Doktor pada Program Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor (tidak dipublikasi).
- Sakata, Y., T. Nishio and P.J. Matthews, 1991. Chloroplast DNA analysis of eggplant (*Solanum melongena*) related species for their taxonomic affinity. *Euphytica* 55: 21-26.
- Sakata, Y. and R.N. Lester, 1994. Chloroplast DNA diversity in eggplant (*Solanum melongena*) and its related species *S. incanum* and *S. marginatum*. *Euphytica* 80: 1-4.
- Sihachakr, D., Fock, C. Collonier, A. Purwito, J. Luisetti, V. Souvannavong, F. Vedel, A. Servaes, A. Ambroise, H. Kodja and G. Ducreux, 2000.
- Spooner, M.D., Jorge Núñez, J., and Trujillo, G. 2007. Extensive simple sequence repeat genotyping of potato landraces supports a major reevaluation of their gene pool structure and classification. The National Academy of Sciences of the USA.
- Resistance to bacterial wilt in somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *S. phureja*. *Plant Sci.* (accepted)
- Yonemori, K., D. E. Parfitt, S. Kanzaki, A. Sugiura, N. Utsunomiya and S. Subhandrabandu, 1996. RFLP analysis of an amplified region of CpDNA for phylogeny of the genus *Diospyras*, *J Jpn.Soc.Hor.Sci.* 64: 771-777.