Jurnal Penelitian Kelapa Sawit, 2005, 13(3): 127 - 136

ISOLASI PROMOTOR SPESIFIK AKAR PADA TANAMAN KELAPA SAWIT DALAM RANGKA PENGEMBANGAN KELAPA SAWIT TAHAN *GANODERMA*

Condro Utomo, A. Razak Purba, Endang Nurhayati, Retno D. Setiowati, Nancy D. Haro

ABSTRAK

Pasangan primer Aka1f dan Aka2 yang diamplifikasi dengan metoda polymerase chain reaction (PCR) menghasilakan pita DNA berukuran 650 bp. Setelah tahapan purifikasi, kloning dan sekuensing pita DNA tersebut, sekuen DNA selanjutnya dikirim ke GenBank melalui program BLASTN dan dikonfirmasi sebagai promotor spesifik akar pada tanaman kelapa sawit. Pada sekuen yang diperoleh dari hasil amplifikasi dengan menggunakan primer Aka1f dan Aka 2 terbukti terdapat beberapa elemen penting antara lain: a root specific element, an ethylene responsive element (ERE), a metal responsive element (MRE) dan GCC box sekuen yang merupakan ciri khas dari promotor yang spesifik beraktifitas pada daerah perakaran atau promotor spesifik akar.

Kata kunci: *Isolasi, kelapa sawit, promotor spesifik akar, PCR*

ABSTRACT

Primer pairs of Aka1f and Aka2 in the polymerase chain reaction produced a single PCR product of 650 bp. After purification of PCR product, the DNA was cloned and sequenced. A computer-assisted comparison of the nucleotide sequences with the existing nucleotide sequences in gene databases was performed by using the BLASTN program. The PCR product amplified by these primers was confirmed as DNA fragments of the root specific promoter from oil palm. The DNA sequence amplified by using primer pair Aka1f and Aka2 contains several important elements such as a root specific element, an ethylene responsive element (ERE), and a metal responsive element (MRE), these elements indicated a distinctive feature of promoter with the activities in the root system or root specific promoter.

Key words: *Isolation, kelapa sawit, root spesific promoter, PCR*

PENDAHULUAN

Berbagai kendala utama dalam pemuliaan konvensional untuk memperoleh bahan tanaman kelapa sawit tahan *Ganoderma* terbentur pada kenyataan bahwa (i) siklus pemuliaan kelapa sawit memerlukan waktu yang cukup lama (10

– 13 tahun) dan (ii) sumber gen yang resisten terhadap *Ganoderma* tidak tersedia diantara plasma nutfah kelapa sawit. Untuk itu salah satu strategi untuk mendapatkan tanaman kelapa sawit tahan *Ganoderma* adalah dengan jalan menyisipkan gen-gen (transgenik) yang menghasilkan zat-zat yang berfungsi sebagai anti jamur. Dalam rekayasa genetik tanaman kelapa sawit, gen-gen yang akan disisipkan diharapkan dapat diekspresikan secara terus-menerus sepanjang hidup tanaman kelapa sawit terutama pada bagian perakaran, untuk itu pemilihan promoter yang bersifat konstitutif dan cocok untuk kelapa sawit sangatlah penting demi keberhasilan dalam pengendalian *Ganoderma*.

Secara alami tanaman kelapa sawit telah mempunyai gen-gen tertentu yang berfungsi sebagai sistem pertahanan diri untuk menghambat atau meminimalkan serangan jamur *Ganoderma* dengan menghasilkan zat-zat yang bersifat anti jamur seperti dari golongan pitoalexin, sebagai contohnya adalah resveratrol (4) atau patogenesis related protein (PR protein) seperti enzim kitinase dan glukanase, tetapi karena konsentrasinya secara alami relatif rendah di dalam tanaman kelapa sawit sehingga tidak mampu menahan serangan jamur *Ganoderma*. Untuk meningkatkan kandungan zat-zat tersebut diatas didalam tanaman kelapa sawit diperlukan introduksi gen-gen asing yang berpotensi tinggi penghasil zat anti jamur tersebut. Gen pengendali resveratrol yang memberi harapan untuk disisipkan kedalam genom tanaman kelapa sawit adalah yang berasal dari tanaman anggur dimana telah terbukti bahwa tanaman transgenik yang disisipi gen tersebut tahan terhadap serangan jamur patogen (3,8,9), sedangkan gen PR protein yang akan disisipkan ke genom kelapa sawit adalah gen kitinase yang berasal dari jamur *Trichoderma harzianum* dimana gen tersebut telah ditransfer ke beberapa spesies tanaman untuk menginduksi ketahanan terhadap jamur patogen (2,5). *T. harzianum* mengeluarkan dua komponen enzim yaitu kitinase dan glukanase dimana enzim kitinase dapat melisis dinding hifa jamur patogen dari klas Basidiomycetes dan Askomycetes, karena itu gen kitinase dari *T. harzianum* cocok untuk pengendalian jamur *Ganoderma* yang berasal dari klas Basidiomycetes. Agar zat-zat yang bersifat antijamur tersebut dapat diekspresikan secara terus-menerus di perakaran kelapa sawit, untuk itu harus dicari promotor yang bersifat promotor spesifik akar.

Penelitian ini bertujuan untuk mendesain pasangan primer dalam rangka untuk mengisolasi promotor spesifik akar pada tanaman kelapa sawit yang akan digunakan dalam pengembangan tanaman transgenik kelapa sawit tahan *Ganoderma*.

BAHAN DAN METODA

Ekstraksi DNA kelapa sawit

DNA genomik dari daun kelapa sawit diekstraksi berdasarkan metoda Orozco-Castillo *et al.* (6) dengan modifikasi penambahan polivinilpolipirolidon (PVPP) sebanyak 0,1 gr dan merkaptoetanol selama penggerusan.

Sebanyak 0.4 gr daun anggur atau kelapa sawit dipotong-potong menjadi kecil-kecil kemudian dihaluskan di dalam mortar dengan penambahan nitrogen cair beberapa kali. Hasil gerusan dimasukkan ke dalam tabung mikro 2 ml kemudian ditambahkan 1 ml bufer ekstraksi CTAB dan diinkubasi pada suhu 65 °C selama 30 menit dengan sekali-kali dikocok. Suspensi dicampur dengan larutan 1 ml kloroform : isoamilalkohol dan dikocok-kocok hingga merata selanjutnya disentrifugasi pada 11.000 rpm selama 5 menit. Pada tahap ini untuk memperoleh kemurnian DNA yang tinggi, supernatan dari suspensi ini dapat diperlakukan dengan campuran kloroform : isoamilalkohol sebanyak 2 atau 3 kali sebelum dilakukan pengendapan DNA hasil ekstraksi. Supernatan ditransfer ke dalam tabung mikro baru lalu ditambah 1 ml isopropanol dingin kemudian disentrifugasi pada 11.000 rpm selama 5 menit. Pelet DNA dilarutkan dengan 0,5 ml bufer TE dan ditambahkan 10 µl (20 µg) ribonuclease A, diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam selanjutnya ditambah 1 ml ethanol absolute dan diinkubasikan selama 30 menit pada suhu -20 °C kemudian disentrifugasi pada 11.000 rpm selama 5 menit, pelet dicuci dengan 70 % ethanol dan dikeringkan. Pelet dilarutkan dengan 50 µl bufer TE dan disimpan pada - 20 °C sampai digunakan.

Kemurnian dan konsentrasi DNA ditetapkan dengan 2 cara, yaitu menggunakan spektrofotometer UV dan elektroforesis agarose. Larutan DNA contoh dipipet sebanyak 50 µl kemudian diencerkan dengan aquades menjadi 3 ml. Absorban diukur pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Pembacaan absorbansi = 1 berarti konsentrasi DNA adalah 50 µg/ml dan dianggap sebagai faktor konversi. Tingkat kemurnian DNA yang diukur UV spektofotometer ditetapkan berdasarkan nilai perbandingan A260 dengan A280 yaitu sekitar 1,8-2,0 (7). αi samping itu juga dilakukan penetapan konsentrasi DNA contoh dengan elektroforesis agarose. Sebagai standar digunakan DNA yang telah diketahui konsentrasinya.

Desain primer dan amplifikasi PCR

Pasangan primer untuk mengisolasi promotor spesifik akar kelapa sawit didesain dengan menggunakan data sekuen dari kelapa sawit dengan nomor registrasi AJ236914 sebagai Aka1f dan Aka2. Amplifikasi PCR untuk mendapatkan promotor spesifik akar dilakukan dengan menggunakan total campuran reaksi PCR (25 µl) mengandung 100 ng DNA genomik, bufer PCR, dNTPmix dengan konsentrasi 10 mM, 1 µM untuk masing-masing primer forward dan reverse serta sebanyak 1 unit *Taq* polymerase. Reaksi amplifikasi dilakukan menggunakan alat *GeneAmp PCR System* 2400, dengan tahapan sebagai berikut 2 menit pada 94 °C, diikuti dengan siklus termal sebanyak 40 kali terdiri dari 45 detik untuk denaturasi pada 94°C, 40 detik untuk annealing pada 53-55 °C dan 60 detik untuk ekstension pada 72°C diikuti dengan ekstension akhir selama 10 menit pada 72 °C. Fragmen DNA dari hasil amplifikasi PCR sebanyak 10 µl dicampur dengan 1 µl loading bufer dan dipisahkan dengan menggunakan

elektroforesis 1,5% selama 80 menit dengan voltase 50 V. Hasil elektroforesis direndam dalam larutan ethidium bromide selama 45 menit dan divisualisasikan dengan UV transiluminator dan didokumentasi dengan camera polaroid.

Preparasi sel bakteri kompeten

Bakteri yang digunakan dalam transformasi adalah strain *Escherichia coli* DH5α yang diperoleh dari BPPT Serpong Tangerang. Bahan kimia untuk perlakuan bakteri adalah 100 mM $MgCl_2$ $6H_20$, 100mM $CaCl_2$ $2H_20$ dan gliserol. Bakteri diinokulasikan pada media LB (10.0 g Tryptone, 5.0 g ekstrak yeast dan 10.0 g NaCl untuk per liter media dan disterilkan dengan autoclave pada suhu 121 °C selama 15 menit) pada erlenmeyer kemudian diinkubasikan pada suhu 37 °C selama kira-kira 16 jam. Bakteri dipipet sebanyak 250 µl dan dimasukkan pada erlenmeyer yang berisi 25 ml media LB dan diinkubasikan pada suhu 37 °C. Setelah 3-4 jam, pengamatan perkembangan bakteri dilakukan dengan mengukur OD_{600} hingga diperoleh nilai 0,35-0,40. Nilai absorbansi OD_{600} = 1 setara dengan 5 x 10^8 sel bakteri/ml, sehingga nilai absorbansi 0,35-0,40 setara dengan 1,75 - 2,00 x10^8 sel bakteri/ml. Bila pembacaan spektrofotometer telah mencapai nilai 0,40 biakan bakteri kemudian dimasukkan ke dalam lemari es (suhu 4 °C) selama 10 menit.

Pemanenan bakteri dilakukan dengan mengendapkan biakan bakteri dengan sentrifugasi 6.000 rpm selama 1menit dalam tabung eppendorf 2 ml dan diulang sebanyak 3-5 kali. Pelet diinkubasikan pada es selama 10 menit kemudian ditambahkan 1 ml $MgCl_2$ dan disuspensikan hingga homogen, lalu diinkubasikan pada es selama 5 menit. Bakteri disentrifugasi 4.000 rpm selama 10 menit lalu supernatant dibuang. Pelet kemudian ditambah dengan 1 ml $CaCl_2$ disuspensikan dan kembali disentrifugasi selanjutnya supernatan dibuang. Pelet ditambah dengan 200 µl ($CaCl_2$ + 15 % gliserol) dan disuspensikan. Tabung eppendorf disimpan dalam termos yang berisi nitrogen cair dan pada tahap ini bakteri siap untuk ditransformasikan.

Kloning gen dari produk PCR

Sebelum dikloning produk PCR dimurnikan dengan menggunakan QIAquick PCR purification kit untuk mengeliminasi primer dimer yang berukuran dibawah 100 bp. Setelah dimurnikan produk PCR kemudian dikloning pada plasmid pCR^R 4-TOPO dari TOPO TA cloning kit. Sesudah terjadi ligasi plasmid dengan PCR produk, plasmid ditransformasi ke dalam *E. coli* (DHα5) dengan cara 'heat shock' pada suhu 42 °C selama 45 detik kemudian ditumbuhkan pada media LB padat (dengan penambahan agar-agar) yang mengandung ampisilin (100 µg ampisilin per 1 ml media) dan selanjutnya diinkubasikan pada suhu 37 °C selama semalam. Koloni bakteri yang berwarna putih dipilih dan diambil dengan menggunakan tusuk gigi yang telah disterilkan untuk diamplifikasi dengan menggunakan primer M13 forward (5` GTAAAACG ACGGCCAGT '3 dan M13 reverse (5` CAGGAAACAGCTATGAC `3) dimana

sekuen tersebut mengapit situs kloning untuk menentukan bahwa penyisipan gen ke plasmid telah terjadi. Amplifikasi PCR dilakukan dengan menggunakan total reaksi PCR (20 µl) mengandung bakteri, bufer PCR, dNTPmix dengan konsentrasi 10 mM, 10 pmol untuk masing-masing primer M13 forward dan reverse dan 1 unit *Taq* polymerase. Reaksi amplifikasi dilakukan menggunakan alat *GeneAmp PCR System* 2400, dengan tahapan sebagai berikut 5 menit pada 95°C, diikuti dengan siklus termal sebanyak 35 kali terdiri dari 1 menit pada 94°C, 35 detik pada 55 °C dan 1 menit pada 72°C diikuti dengan ekstension akhir selama 10 menit pada 72 °C.

Sekuensing produk PCR

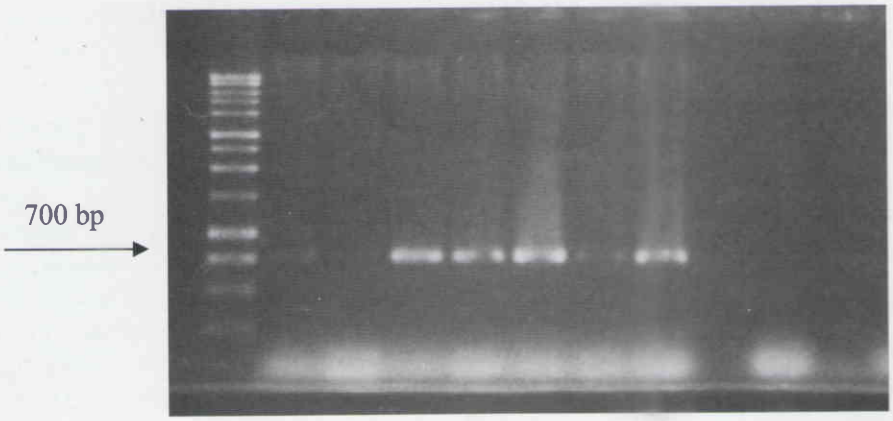
Bakteri yang telah positif mengandung plasmid tersisipi gen diperbanyak pada media cair LB yang mengandung ampisilin dan diinkubasi selama satu malam pada temperatur kamar pada shaker dengan putaran 200 rpm. Bakteri diendapkan dengan melakukan sentrifugasi pada putaran 6.000 rpm. µelet bakteri diproses dengan QIA-prep spin miniprep kit untuk mengisolasi kembali plasmid. Konsentrasi plasmid ditentukan dengan spektropotometer kemudian plasmid dikirim ke lembaga Eikjman (Jakarta) untuk disekuensing.

HASIL

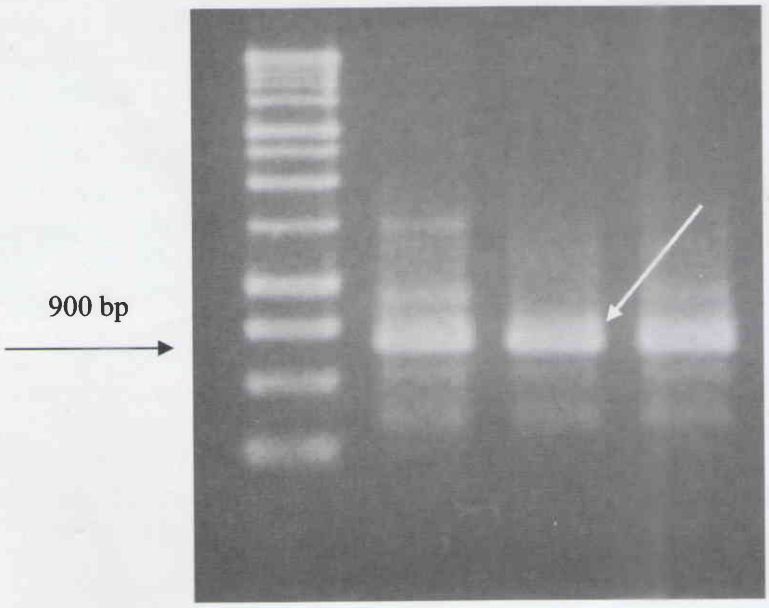
PCR produk

Promotor spesifik akar pada kelapa sawit telah diisolasi dan didepositkan di GenBank dengan nomor registrasi AJ236914. Dengan diketahui sekuen dari promotor spesifik akar tersebut maka dapat didesain pasangan primer Aka1f dan Aka2. µanjang sekuen promotor tersebut kira-kira sekitar 650 bp dan dengan menggunakan pasangan primer Aka1f dan Aka2 telah dihasilkan pita DNA tunggal dari amplifikasi PCR yang berukuran sekitar 650 bp atau sama dengan ukuran yang diharapkan (Gambar 1).

Sebelum dikloning produk PCR dimurnikan dengan menggunakan QIAquick PCR purification kit (Qiagen) untuk meghilangkan primer dimer yang berukuran dibawah 100 bp. µositif transforman dapat dipastikan dan ditandai dengan produk PCR yang bertambah panjang sebesar 150 bp (posisi pasangan primer 13 forward dan reverse pada Plasmid TOPO). Produk PCR hasil amplifikasi pasangan primer Aka1f dan Aka2 yang semula berukuran sekitar 650 bp setelah diligasikan pada plasmid TOPO dan ditransformasikan pada *E. coli*, menghasilkan produk PCR berukuran 800 bp setelah diamplifikasi dengan pasangan primer M13 forward dan reverse (Gambar 2).



Gambar 1. Hasil amplifikasi PCR dari total genomik kelapa sawit dengan menggunakan pasangan primer Aka1f-Aka2 dengan produk PCR berupa pita DNA berukuran kira-kira 650 bp sesuai dengan ukuran yang diharapkan.



Gambar 2. Hasil amplifikasi PCR dari positif transforman yang mengandung gen promotor spesifik akar dimana menghasilkan produk PCR berukuran 800 bp setelah diamplifikasi dengan pasangan primer M13 forward dan reverse (anak panah).

Konfirmasi sekuen pada GenBank

Hasil sekuensing diolah dengan menggunakan program EditSeq dari DNAStar untuk mengurutkan hasil sekuen dari primer reverse agar cocok dengan urutan sekuen basa hasil dari primer forward. Konfirmasi sekuen dilakukan dengan menggunakan program BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool) pada situs NCBI (1). Hasil konfirmasi sekuen disajikan dibawah ini:

BLASTN 2.2.11 [Jun-05-2005]
RID: 1123498894-28519-143420036876.BLASTQ3

Query=
(662 letters)

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS,environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
3,409,957 sequences; 14,873,957,084 total letters

Taxonomy reports

Sequences producing significant alignments: (Bits) Value

gi|5731774|emb|AJ236914.1|EGU236914	Elaeis guineensis mt3-B gene	605	7e-170
gi|19424464|gb|AC087336.5|	Mus musculus chromosome 6, clone RP23	46.1	0.13
gi|48926779|gb|AC134336.2|	Mus musculus BAC clone RP23-134A10...	46.1	0.13
gi|37805613|emb|BX005374.5|	Zebrafish DNA sequence from clone...	42.1	2.0
gi|20334511|gb|AC108695.2|	Homo sapiens 3 BAC RP11-744C8 (Ros...	42.1	2.0
gi|17975430|gb|AC098853.2|	Homo sapiens BAC clone RP11-343D12 fr	40.1	7.8
gi|67008332|emb|BX927247.19|	Zebrafish DNA sequence from clon...	40.1	7.8
gi|5702033|emb|AJ242506.1|TPY242506	Tetrahymena pyriformis pa...	40.1	7.8
gi|5702021|emb|AJ238858.1|TPY238858	Tetrahymena pyriformis pa...	40.1	7.8
gi|21217787|emb|AL646047.9|	Mouse DNA sequence from clone RP2...	40.1	7.8
gi|68342255|gb|AC161601.4|	Mus musculus BAC clone RP23-333L19...	40.1	7.8
gi|16304304|gb|AC093897.3|	Homo sapiens BAC clone RP11-721G13 fr	40.1	7.8
gi|15145611|gb|AC079925.6|	Homo sapiens BAC clone RP11-544E17 fr	40.1	7.8
gi|18087696|gb|AC009455.9|	Homo sapiens chromosome 18, clone ...	40.1	7.8
gi|61675755|gb|AC125482.9|	Medicago truncatula clone mth2-15h11,	40.1	7.8
gi|60301728|gb|AC148295.3|	Mus musculus BAC clone RP24-346N5 fro	40.1	7.8
gi|59676863|gb|AC124990.16|	Mus musculus chromosome 3, clone RP2	40.1	7.8
gi|66275440|gb|AC114603.15|	Mus musculus chromosome 1, clone RP2	40.1	7.8

Hasil konfirmasi dengan menggunakan BLASTN tersebut menunjukkan bahwa fragmen DNA yang disekuen adalah benar dengan homologi sebesar 95 % dengan MT3-B gen dari kelapa sawit yang merupakan promotor spesifik akar.

Karakterisasi DNA sekuen sebagai promotor spesifik akar

Hal penting yang perlu diperhatikan dalam mengekspresikan gen asing pada daerah perakaran tanaman transgenik adalah promoter yang bersifat spesifik beraktifitas di perakaran atau sering disebut promotor spesifik akar. Pada sekuen yang diperoleh dari hasil amplifikasi dengan menggunakan primer Aka 1f dan Aka 2 terbukti terdapat beberapa elemen penting antara lain: a root specific element, an ethylene responsive element (ERE), a metal responsive element (MRE) dan GCC box sekuen (Gambar 3) yang merupakan ciri khas dari promoter yang spesifik beraktifitas pada daerah perakaran atau promotor spesifik akar.

CTTTTGATGTTCAGCTAGAAAAAATCTTACTAGTAAAGAGGGGNAAAACCAAAATCGGCAAC

CTTTTTTTTTTGGTAGAAAAATCAGCAACC**TTTCAA**TAAAGAGTTTTAATCCTGTAAAATATCA
ERE

NGTCTAGCAAATTACCAAAGTAAAGGGTTG **AAAAAAATTAAAAAAAAAAAAA**GGGAATCCG
AT-rich

ATCTTCCACAACCTTATAGCATTCCAGCTAATTGCGGCTATCCCAAAAATAAAGATGGATTGG

GATGCCACCCGAGTCCTTTCTGATTGTGC**TTAGAATT**TCCCATCCAAAACTCTATCNGGCAA
ERE-reverse

CTTGTGATTTGACAATTTCAGAGGTCGATGGGGCAGTGTC**CACCTTTCAT**GCA**TGCACGC**AA
MRE **RSE**

GAATCCGGGGCCCTTGCGAGAGTATTTGCATG TTNAGCAAACGTTAAAAATAAAGGGATTTG

ACATCAGAGGCTCTTAGCCCTCCTACCAAAAAAAGAGAGAGAGAAACTTCAACCCTCCATTA

TTGAGATTCCATTTGGATAGTTTTGGTCGAGGCGTGT**GCCGCC**ACTGTAGCGTCAGTAATCC
GCC box

GTTTAAGCCCACGCTCGCTTTCCTCATCCTTGAAAACGCC**TATAAATAT** GGGCGGCACCCAA
TATA box

GCCTCTTTCCTCACAGCCAGACCCAGCAAACCTTCTCTC

Gambar 3. DNA sekuen dari promotor spesifik akar pada kelapa sawit

DISKUSI

Untuk mengekspresikan gen-gen penghasil zat anti jamur pada sistem perakaran kelapa sawit diperlukan promotor khusus yaitu promotor spesifik akar yang dapat mengekspresikan produknya bentuk protein maupun zat metabolit sekunder yang diinginkan pada perakaran kelapa sawit guna menghambat serangan jamur *Ganoderma* pada perakaran kelapa sawit. Promotor spesifik akar pada kelapa sawit telah diisolasi dan didepositkan di GenBank dengan nomor registrasi AJ236914, berdasarkan informasi DNA sekuen tersebut, maka dapat didesain pasangan primer yaitu Aka1f dan Aka2. Pasangan primer tersebut menghasilkan pita DNA berukuran kira-kira 650 bp yaitu ukuran yang diharapkan sebagai hasil amplifikasi pasangan primer Aka1f dan Aka2. Setelah disekuen dari kedua arah pita DNA berukuran kira-kira 650 bp dapat dibaca secara lengkap dan dengan melalui program BLASTN yang tersedia pada GenBank, sekuen DNA tersebut dikonfirmasikan sebagai sekuen promotor spesifik akar kelapa sawit. Dengan keberhasilan isolasi promotor spesifik akar tersebut akan membuka peluang yang lebih besar untuk mendapatkan tanaman kelapa sawit transgenik tahan *Ganoderma*. Selanjutnya promotor spesifik akar tersebut akan dikonstruksi dalam plasmid dengan orientasi yang benar agar gen-gen yang disisipkan dapat mengekspresikan produknya.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kementrian Riset dan Telknologi Republik Indonesia atas Dana RUT XI dalam pembiayaan riset ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHÄFFER A. A., ZHANG , J., ZHANG Z., MILLER, W., and LIPMAN, D. J. 1997. „Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402.

2. BOLAR, J. P., J. L. NORELLI, G. E. HARMAN, S. K. BROWN and H. S. ALDWINCKLE. 2001. Synergistic activity of endochitinase and exochitinase from *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum*) against the pathogenic fungus (*Venturia inaequalis*) in transgenic apple plants. Transgenic Res. 10, 533-543.

3. COUTOS-THÉVENOT, P., OINSSOT, B., BONOMELLI, A.,YEAN, H., BREDA, C. and BUFFARD, D. 2001. *In vitro* tolerance to *Botrytis cinerea* of grapevine 41B rootstock in transgenic plants expressing the stilbene synthase *Vst*1 gene under the control of a pathogen-inducible PR10 promoter. J Exp Bot 52, 901-910.

4. HIPSKIND, J. D., and N. L. PAIVA. 2000. Constitutive accumulation of a resveratrol-glucoside in transgenic alfalfa increases resistance to *Phoma medicaginis*. Mol Plant-Microbe Interact 13, 551-562.

5. LORITO, M. 1998. Chitinolytic enzymes and their genes, p. 73-99. *In* G. E. Harman, and C. P. Kubicek (ed.), *Trichoderma* and *Gliocladium*, vol. 2. Taylor and Francis Ltd., London, United Kingdom.

6. OROZCO-CASTILLO, K. J. CHALMERS, WAUGH R. and POWELL W. (1994). Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 87, 934-940.

7. SAMBROOK, J., FRITSCH E. F. and MANIATIS T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2 ed. Vol. I-III. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. USA.

8. SBAGHI, M., P. JEANDET, B. FAIVRE, R. BESSIS and J.C. FOURNIOUX. 1995. Development of methods using phytoalexin (resveratrol) assessment as a selection criterion to screen grapevine *in vitro* cultures for resistance to grey mould (*Botrytis cinerea*). Euphytica 86, 41-47.

9. SPARVOLI, F., MARTIN, C., SCIENZA, A., GAVAZZI, G. and TONELLI, C. 1994. Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.). Plant Mol. Biol. 24, 743–755.