

DEVELOPMENT OF NEW PCR MARKER FOR FAST AND RELIABLE DETECTION OF POTATO R1 GENE, WHICH CONFERS RESISTANCE AGAINST LATE BLIGHT

NOVÝ PCR MARKER PRO RYCHLOU A SPOLEHLIVOU DETEKCI GENU R1 REZISTENCE BRAMBORU VŮČI PHYTOPHTHORA INFESTANS

Křenek P., Vejl P.

Katedra genetiky a šlechtění, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 16521 Praha - Suchbátka, Česká republika.

E-mail: krenek@af.czu.cz, vejl@af.czu.cz

ABSTRACT

The aim of this work was to test possibility that potato R1 gene, which confers resistance against Late Blight, is present in potato genome in more sequentially different copies expressing similar or the same phenotype. To check out this possibility we used bioinformatic tools for development of specific R1M3 marker. This marker is designated to amplify 3' end of R1 gen third exon. We amplified R1M3 in common with R1M1, which was published earlier for detection of R1 gene, on set of 103 potato varieties. According to public databases 45 potato clones from this set express R1 phenotype. Results of amplification were identical for both markers among all 103 genotypes tested. 12 clones which express R1 phenotype showed no amplification of either specific markers. In face of those results we did not prove hypothesis about R1 gene functional homologues. Nevertheless the amplification reliability of R1M3 makes it grate candidate for routine application in MAS of potato against Late Blight.

Keywords: R1 gene, PCR, MAS, potato, Late blight, resistance

ABSTRAKT

Cílem předkládané publikace bylo ověřit hypotézu existence dosud nepublikovaných funkčních homologů R1 genu, který řídí specifickou rezistenci bramboru vůči plísni bramboru, se stejným nebo podobným fenotypem jako R1 gen. Pro tyto účely byl navržen prostřednictvím nástrojů bioinformatiky specifický PCR marker R1M3 na 3' konec třetího exonu R1 genu. Marker R1M3 byl testován společně s dříve publikovaným markerem R1M1 na kolekci 103 odrůd brambor, kde 45 genotypů mělo fenotypově deklarovanou přítomnost genu R1. Výsledky amplifikace obou markerů v rámci testovaného souboru odrůd byly naprosto identické. Přesto, že u 12 ze 45 odrůd s deklarovanou přítomností fenotypu R1 nedošlo k amplifikaci obou specifických markerů nebyla potvrzena hypotéza o existenci neznámého homologu R1 genu. Spolehlivost amplifikace markeru R1M3 umožňuje jeho rutinní využití v procesu (MAS) bramboru na rezistenci vůči plísni bramboru.

Klíčové slova: R1 gen, PCR, MAS, brambor, plíseň bramboru, rezistence

ÚVOD

Rezistence bramboru (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) vůči plísni bramboru (*Phytophthora infestans*), má charakter horizontální i vertikální. Rasově specifická rezistence (vertikální rezistence) bramboru byla v minulosti získána šlechtěním bramboru hexaploidním botanickým druhem *Solanum demissum* (WASTIE, 1991). Vertikální rezistence pocházející ze *S. demissum* je řízena R geny. Tyto geny poprvé popsal a charakterizoval společně s odpovídajícími geny virulence patogena BLACK *et al.* (1953), který založil jejich analýzu na hypotéze „gen proti genu“. Celkově bylo klasifikováno jedenáct R genů (R1 – R11) na základě vzájemné kompatibility a inkompatibility specifických ras patogena a diferenciačních klonů (MALCOLMSON *et al.* BLACK, 1966). Přesto, že v současné době převažují v evropské i americké populaci plísně bramboru komplexní rasy patogena virulentní ke všem jedenácti R genům, je intenzivně studována reziduální účinnost jednotlivých R genů a především jejich pyramidálních kombinací (VAN ECK, 2000). Možné využití R genů v budoucích šlechtitelských programech spočívá zejména v pyramidování major genů rezistence u velmi raných odrůd bramboru, kdy reziduální účinnost R genů oddálí nástup infekce *P. infestans* v období intenzivní tvorby asimilačního aparátu bramboru.

Vůbec nejrozšířenějším a z hlediska molekulární genetiky nejlépe charakterizovaným R genem bramboru je R1 gen lokalizovaný na horním ramenu chromozómu V. Během posledních let byl tento gen úspěšně mapován pomocí RFLP (LEONARDS-SCHIPPERS *et al.* 1992, marker GP21) a AFLP (MEKSEM *et al.* 1995, marker AFLP1 a DE JONG *et al.*, 1997, marker SPUD237) technik. BALLVORA *et al.* (2002) R1 gen izoloval, identifikoval a přenesl do náchylné odrůdy Desiree. K identifikaci transgenu použil specifický PCR marker, který SEDLÁK *et al.* (2005a) a SEDLÁK *et al.* (2005b) označil jako R1M1 marker a použil jej k detekci R1 genu u 320 odrůd brambor a 40 botanických druhů rodu *Solanum*. Výsledky, které publikoval SEDLÁK *et al.* (2005a) a SEDLÁK *et al.* (2005b) vedly autora k formulaci hypotézy o existenci dosud neznámého funkčního paralogu, nebo alely R1, který/á řídí stejný fenotypový projev jako R1 gen popsán BALLVORA *et al.* (2002). Cílem předkládané práce bylo s využitím nástrojů bioinformatiky vytvořit PCR markery specifické pro R1 gen a na souboru odrůd brambor s deklarovaným fenotypem R1 ověřit hypotézu o existenci funkčního paralogu nebo alely R1 genu. Dalším cílem bylo vytvořit nový PCR marker, který by umožnil rychleji a spolehlivěji detekovat gen R1 než marker R1M1, pro rutinní využití v procesu markery asistovaná selekce (MAS) brambor na rezistenci vůči plísni bramboru.

MATERIÁL A METODIKA

Základním materiálem pro celou analýzu bylo široké spektrum 103 odrůd bramboru. Tato kolekce byla z části tvořena genotypy, které již testoval SEDLÁK *et al.* (2005a) a SEDLÁK *et al.* (2005b) a z části byly získány nové genotypy (zejména nositelé fenotypu R1) jako etiolizované 10 cm rostlinky z *in vitro* genové banky při Výzkumném ústavu bramborářském v Havlíčkově Brodě. Fenotypové údaje byly laskavě poskytnuty VÚB Havlíčkův Brod, s.r.o. případně doplněny z veřejně přístupných databází (europotato.org a genres.de/eva). Izolace DNA byla provedena pomocí kitu „DNeasy plant Mini Kit“ (Qiagen,

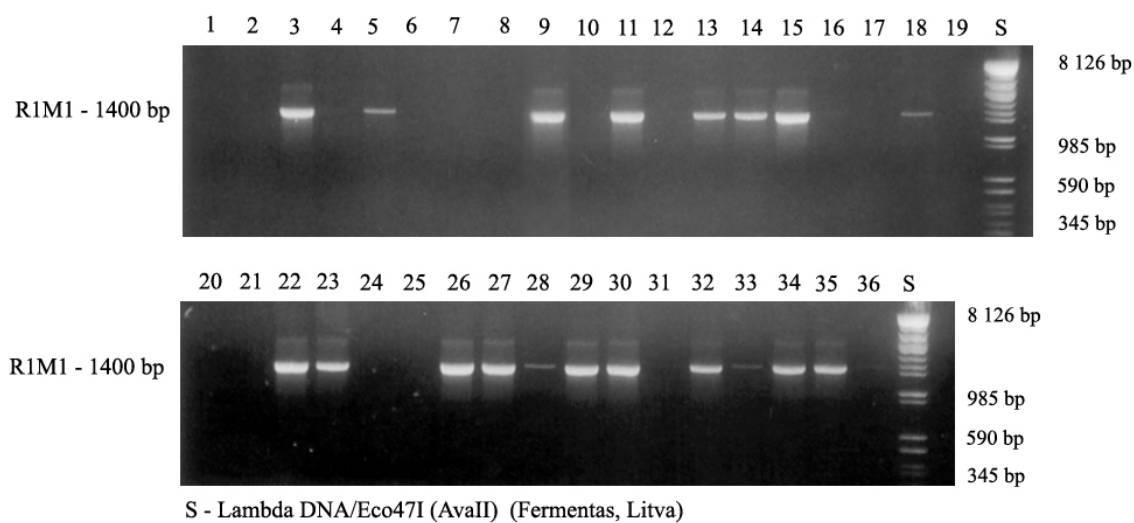
SRN) podle instrukcí výrobce. Kvalita izolované DNA byla potvrzena elektroforeticky. Pro amplifikaci všech testovaných markerů byly použity komponenty PCR reakce firmy FERMENTAS (Litva). Všechny testované PCR markery byly amplifikovány za identického složení PCR reakční směsi: 60 – 90ng templátové DNA; 1X PCR reakční pufr + 50mM KCl; 2,5mM MgCl₂; 0,5μM primery; 200μM dNTP, 1U *Taq* na 25μl reakce. Markery R1M1 a R1M3 (primery: forward: *ttgtcaagtcagccttgaat* a reverse: *ctatcttatttctgcaagaa*) byly také optimalizovány vzhledem k úspoře nákladů pro objem 12,5μl PCR reakce. I v tomto případě bylo chemické složení PCR reakce identické pro oba markery a lišilo se od 25μl reakcí pouze množstvím templátové DNA, které bylo 30ng. R1M1 marker byl amplifikován podle reakčního profilu uváděného SEDLÁK *et al.* (2005a) a marker R1M3 v případě 25μl reakce podle reakčního profilu 94°C 3min., (94°C 6s, 52°C 18s, 72°C 14s)35x, 72°C 2min. a v případě 12,5μl reakce podle identického profilu, pouze doba nasedání primerů byla zkrácena na 16s. PCR reakce probíhala v termocykleru T-gradient Thermocycler (Biometra WhatmanGmbH, SRN). Separace produktů PCR reakcí probíhala v 1,5% horizontálním agarózovém gelu, v 1x TBE pufru, při stejnosměrném napětí 120V po dobu 75minut. DNA byla barvena ethidium bromidem jehož hmotnostní podíl v agarózovém gelu byl 0,064% a 0,05% v 1x TBE pufru. Celkové množství produktu amplifikace nanášené na gel bylo vždy 10μl + 1,8 nanášecí barvy. Pro navržení specifických PCR markerů bylo využito nástrojů bioinformatiky BLASTN a Primer3.

VÝSLEDKY A DISKUZE

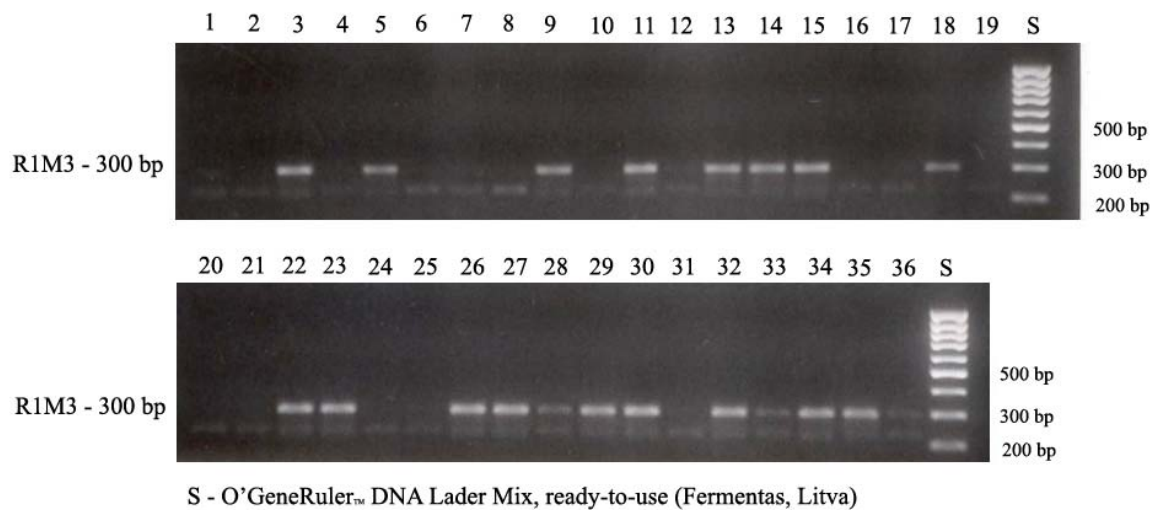
Na elektroforeogramech 1 a 2 je znázorněna amplifikace markeru R1M1, respektive markeru R1M3 u kolekce 36 odrůd brambor. Seznam odrůd společně s fenotypovou charakteristikou a výsledky amplifikace obou markerů je uveden v tabulce 1. Z obrázků 1 a 2 a tabulky 1 vyplývá, že markery R1M1 a R1M3 amplifikovaly u vybraného souboru 36 odrůd brambor naprosto identicky. V obou případech byl získán očekávaný produkt, v prvním případě o délce 1400bp a ve druhém případě o délce 300bp. Z obou elektroforeogramů je patrné, že amplifikace markeru R1M1 a R1M3 probíhala u odrůd číslo 5, 18, 28, 33, 36 slabě. Stejná velikost produktů ve srovnání se zónami s intenzivními amplifikacemi a reproducibilita slabých amplifiací mezi oběma markery nás vedla k označení slabých amplifiací jako dostačujících k detekci přítomnosti R1 alely.

Výsledky amplifikace obou markerů byly u všech 103 odrůd naprosto identické. Byla potvrzena nespecifičnost amplifikace R1M1 a R1M3 vzhledem k dostupným fenotypovým údajům. Celkově bylo v rámci testovaného souboru 103 odrůd brambor přítomno 45 genotypů s deklarovaným fenotypem R1. U celkem 12 genotypů z celkového počtu 45 genotypů (26,6%) s fenotypově deklarovanou přítomností R1 genu nedošlo k amplifikaci markerů R1M1 a R1M3.

Obrázek 1 Amplifikace markeru R1M1 u kolekce 36 odrůd brambor



Obrázek 2 Amplifikace markeru R1M3 u kolekce 36 odrůd brambor



*Tabulka 1 Vybrané odrůdy brambor s fenotypovými charakteristikami a výsledky amplifikace markerů R1M1 a R1M3, - nedošlo k amplifikaci, * došlo k amplifikaci*

klon	číslo odrůdy	R1M1	R1M3	deklarovaný fenotyp
Adura	1	-	-	?
Adretta	2	-	-	R1,3
Atleet	3	*	*	R1
Baraka	4	-	-	R3
Breza	5	*	*	R1
Carla	6	-	-	r
Fortuna	7	-	-	r
Gloria	8	-	-	r
Hertha	9	*	*	?
Chengo	10	-	-	?
Jizera	11	*	*	R1
Karmona	12	-	-	R1
Karpina	13	*	*	R1
Lúčnica	14	*	*	R1
Maris peer	15	*	*	R1
Milva	16	-	-	R1
Morene	17	-	-	R1
Oda	18	*	*	R1
Petland crown	19	-	-	R1,2,3
Prinzes	20	-	-	R3
Rubin	21	-	-	R3
Saturna	22	*	*	R1
Shiretoko	23	*	*	R2 (R4)
Sulew	24	-	-	R1
Schwalbe	25	-	-	R1, 3
Tatranka	26	*	*	?
Virginia	27	*	*	R1 R4
Camila	28	*	*	R1
Costella	29	*	*	R1
Dětkoselskij	30	*	*	R1
Dmosser	31	-	-	R1
Echo	32	*	*	R1
Fanal	33	*	*	R1
Feldslohn	34	*	*	R1
Fidelid	35	*	*	R1
Chenango	36	*	*	R1

Tato práce charakterizuje vytvoření nového PCR markeru R1M3 genu R1, který udílí bramboru hypersenzitivní rezistenci vůči plísni bramboru. Časová nenáročnost a spolehlivost amplifikace markeru umožňuje jeho rutinní využití v procesu markery asistované selekce (MAS) brambor na rezistenci vůči plísni bramboru.

SEDLÁK *et al.* (2005b) pro detekci genu R1 použil CAPS vazbové markery GP21 (LEONARDS-SCHIPPERS *et al.* 1992, MEKSEM *et al.* 1995) a SPUD237 (DE JONG *et al.*, 1997), lokalizované 2,1 cM respektive 0,1 cM proximálně od R1 genu a specifický marker R1M1 (BALLVORA *et al.* 2002). Všechny tři markery byly testovány na rozsáhlé kolekci 320 odrůd bramboru a 40 botanických druhů rodu *Solanum*. Polymorfismus vazbových markerů GP21 a SPUD237 markerující dominantní alelu R1 byl překvapivě přítomen u 56% (marker GP21) a 60% (marker SPUD237) testovaných genotypů z celkového počtu 360 klonů. V důsledku této vysoké frekvence výskytu jsou uvedené vazbové markery nepoužitelné pro MAS donorů R1 rezistence. Lze předpokládat, že hlavním důvodem nespecifičnosti vazbových markerů je, vzhledem k jejich malým genetickým vzdálenostem od R1 genu, jejich vysoká frekvence výskytu a/nebo sekvenční homologie v rámci rodu *Solanum* (SEDLÁK *et al.*, 2005b).

R1M1 marker byl amplifikován pouze u 16% testovaných genotypů z celkového počtu 360 klonů (SEDLÁK *et al.*, 2005b). Nízká frekvence výskytu markeru v kolekci 320 odrůd brambor a prezence markeru pouze u botanického druhu *Solanum demissum*, představují důkaz specifičnosti jeho amplifikace (SEDLÁK *et al.*, 2005b). Výsledky testování kolekce genotypů markerem R1M1 porovnával SEDLÁK *et al.* (2005b) s fenotypovými charakteristikami rezistence získanými z veřejně přístupných databází (europotato.org a genres.de/eva). Výskyt markeru napříč spektrem odrůd s deklarovanou přítomností genu R1, odrůd s deklarovanou absencí genu R1 a přítomností jiných genů R, byl neočekávaně značně nespecifický.

V důsledku experimentálních důkazů (EL KHARBOTLY *et al.* 1995, ORDONEZ *et al.* 1997) o existenci supresorů R genů, řídících hypersenzitivitu bramboru vůči plísni bramboru, bylo možno vysvětlit proč došlo k amplifikaci R1M1 markeru u odrůd s fenotypově deklarovanou absencí R1 genu. Možná nespecifičnost amplifikace byla v tomto případě vyvrácena s velkou pravděpodobností štěpením R1M1 produktu sadou restriktáz, které prováděl SEDLÁK *et al.* (2005a). V důsledku výše uvedených skutečností je mnohem překvapivější absence amplifikace markeru R1M1 u odrůd s deklarovanou přítomností R1 fenotypu; celkem 12 z 45 odrůd. Protože vzhledem k vysoké frekvenci výskytu absence amplifikace markeru R1M1 ($12/45 = 26,6\%$) lze vyloučit nespolehlivost fenotypových údajů, pak se jako pravděpodobná jeví existence dosud neznámého paralogu nebo alely R1 genu, který/á řídí stejný, nebo podobný fenotypový projev jako R1 gen. K amplifikaci markeru R1M1 by pak u tohoto funkčního homologu R1 genu nedocházelo v důsledku sekvenčních odlišností v oblastech nasedání primerů R1M1 markeru (SEDLÁK *et al.*, 2005b).

Možný výskyt alely, nebo paralogu se stejným, nebo podobným fenotypovým projevem jako R1 gen naznačují nedávno publikované výsledky studia genů RB, Rpi-blb1 a R3. Gen RB (SONG *et al.*, 2003) a gen Rpi-blb1 (VAN DER VOSSSEN *et al.*, 2003) jsou

geny širokospektrální rezistence *S. bulbocastanum* vůči *P. infestans*, které byly nezávisle na sobě klonovány a jejich funkce byla úspěšně potvrzena transformací náchylných odrůd. Oba geny jsou lokalizovány na stejném lokusu chromozómu 8 a jsou naprosto identické v kódující sekvenci, liší se pouze bodovými mutacemi a inzercemi v lemujících oblastech a jediném společném intronu. Vzhledem k výskytu jednonukleotidového polymorfizmu byly geny RB a Rpi-blb1 označeny jako alely (VAN DER VOSSSEN *et al.*, 2003).

Výsledky podrobného mapování genu R3, který udílí bramboru specifickou rezistenci vůči plísni bramboru, vedly k nalezení dvou genů R3a a R3b, které vykazují rozdílný fenotyp v interakci se stejnými specifickými rasami patogena (HUANG *et al.* 2004). Objev vedl k nové klasifikaci ras plísně bramboru, kdy například rasa 89148-27 původně označená podle virulence jako 3,7 má nyní virulenci 3a,3b,7 (HUANG *et al.* 2004). Je možné, že i lokus R1 představuje více genů R s dosud podrobněji nedefinovanými specifickými rezistencemi. Obdobně by pak mohla existovat rasa, původně s virulencí 1 a nyní například s virulencí 1a, 1b. Dosud neznámé podrobnější rozčlenění R1 genové rodiny by pak mohlo vysvětlit absenci amplifikace markeru R1M1 u odrůd s deklarovaným fenotypem R1.

Naším cílem bylo ověřit hypotézu existence funkčního homologu R1 genu prostřednictvím nových specifických PCR markerů R1 genu vytvořených nástroji bioinformatiky. Pro navrhování primerů bylo využito databáze NCBI, podprogramu BLASTN a programu Primer3.

Většina dosud známých R genů je součástí početných genových rodin, kde jsou jednotliví členové rodiny na sebe úzce vázáni v rámci vazbových skupin (VAN DER VOSSSEN *et al.*, 2003). Příčinou tohoto typu uspořádání je možnost tvorby nových typů rezistence prostřednictvím reorganizace vazbových skupin (inter a/nebo intra genových rekombinací) rovnoměrným a/nebo nerovnoměrným crossing – overem (VAN DER VOSSSEN *et al.*, 2003). Výskyt analogů rezistentních genů a jejich pseudogenů znesnadňuje navržení specifických markerů pro spolehlivou detekci funkčních R genů. Generování specifických markerů pro gen R1 bylo komplikováno i v našem případě desítkami sekvencí publikovaných v NCBI databázi vysoce příbuzných R1 genu. V naší laboratoři bylo navrženo několik PCR markerů kromě genu R1 i pro detekci genu R3a (HUANG *et al.* 2005). Přestože v programu BLASTN navrhované primery vykazují nízkou homologii se všemi publikovanými sekvencemi pro vyšší rostliny, amplifikují značně nespecificky, prakticky u všech testovaných odrůd bramboru a botanických druhů rodu *Solanum*. Tyto předběžné výsledky naznačují existenci celé řady dosud nepublikovaných homologů genů rezistence bramboru vůči plísni bramboru.

Při studiu homologie R1 genu a jeho analogů, se jako nejvíce specifická pro R1 gen jevila 3' oblast třetího exonu R1 genu. Na tuto oblast navržený marker R1M3 amplifikoval specificky a naprosto identicky jako R1M1 marker u souboru 103 testovaných genotypů. Nebyla tak zatím potvrzena hypotéza o existenci funkčního homologu R1 genu. Vytvořený marker je však možno použít pro rutinní MAS brambor na rezistenci vůči plísni bramboru. Marker lze spolehlivě amplifikovat v ekonomickém reakčním objemu 12,5μl, při množství

30ng DNA za reakčních podmínek uvedených v části metodika. Při objemu 12,5μl reakce a 30ng DNA někdy docházelo k rozdílné amplifikaci markeru R1M1 u některých odrůd během opakování pokusů. Naproti tomu marker R1M3 amplifikoval za těchto podmínek vždy naprosto stejně u všech odrůd ve všech opakováních. Navržený teplotní a časový profil pro amplifikaci markeru R1M3 trvá v termocykleru T-gradient Thermocycler (Biometra WhatmanGmbH, SRN) 51 minut zatímco pro amplifikaci markeru R1M1 je zapotřebí ve stejném termocykleru 125 minut. Marker R1M3 lze rutinně využít pro MAS bramboru na rezistenci vůči plísni bramboru za dodržení podmínek křížení definovaných Sedlák *et al.* (2005b) pro R1M1 marker.

ZÁVĚR

Nebyla potvrzena hypotéza o existenci nejméně jednoho funkčního homologue R1 genu, který řídí specifickou rezistenci bramboru vůči plísni bramboru, se stejným nebo obdobným fenotypovým projevem jako R1 gen. PCR marker R1M3 navržený pro testování této hypotézy se jeví jako rychlejší a spolehlivější specifický marker pro MAS bramboru na specifickou rezistenci vůči plísni bramboru, řízenou R1 genem, než dříve publikovaný marker R1M1.

LITERATURA

Ballvora A., Ercolano M.R., Weiss J., Meksem K., Bormann C., Oberhagemann P., Salamini F., – Gebhardt C. (2002): The R1 gene for potato resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) belongs to the leucine zipper/NBS/LRR class of plant resistant genes. The Plant Journal, 30: 361–371.

Black W., Mastenbroek C., Mills W.R., Peterson L.C. (1953): A proposal for an international nomenclature of races of *Phytophthora infestans* and of genes controlling immunity in *Solanum demissum* derivatives. Euphytica, 2: 173 – 240.

De Jong W., Forsyth A., Leister D., Gebhardt C., Baulcombe D. (1997): A potato hypersensitive resistance gene against potato virus X maps to a resistance gene cluster on chromosome 5. Theoretical and Applied Genetics, 95: 246-252.

El-Kharbotly A., Pereira A., Stiekema W., Jacobsen E. (1996): Race specific resistance against *Phytophthora infestans* in potato is controlled by more genetic factors than only R-genes. Euphytica 90(3): 331-336.

Huang G., Van der Vossen E., Kuang H., Vleeshouwers V., Zhang N, Borm T., Van Eck, H., Baker B, Jacobsen E., Visser, R. (2005): Comparative genomics enabled the isolation of the R3a late blight resistance gene in potato. The Plant Journal, 42: 251–261.

Huang G., Vleeshouwers V., Werij J., Hutten R., Van Eck H., Visser R., Jacobsen E. (2004): The R3 Resistance to *Phytophthora infestans* in Potato is Conferred by Two Closely Linked R Genes with Distinct Specificities. Molecular Plant-Microbe Interactions, 17(4): 428–435.

Leonards-Schippers C., Gieffers W., Salamini F., Gebhardt C. (1992): The R1 gene conferring race-specific resistance to *Phytophthora infestans* in potato is located on potato chromosome V.. Mol. Gen. Genet., 233: 278-283.

Malcomson J.F., Black W. (1966): New R genes in *Solanum demissum* Lindl. and their complementary races of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Euphytica, 15: 199–203.

Meksem K., Leister D., Peleman J., Zabeau M., Salamini F., Gebhardt C.(1995): A high-resolution map of the vicinity of the R1 lokus on chromosome V of potato based on RFLP and AFLP markers. Mol. Gen. Genet., 249: 74-81.

Sedlák P., Křenek P., Vejl P., Melounová M., Zoufalá J., Kreuz L., Domkářová J.(2005b): Posouzení praktické využitelnosti vybraných DNA markerů rezistence bramboru vůči *Phytophthora infestans*. Osivo a sadba, sborník referátů, ČZU v Praze, 162-168.

Sedlák P., Vejl P., Melounová M., Křenek P., Domkářová J., Zoufalá J. (2005a): Characterisation of resistance genes resources against late blight available for Czech potato breeding by means of selected DNA markers. Plant, Soil and Environment, 51(2): 82–86.

Song J., Bradeen J., Naess K., Raasch J., Wielgus S., Haberlach T., Liu J., Kuang H., Phillips A., Buell R., Helgeson P., Jiang J.(2003): Gene RB cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight. Proc Natl Acad Sci, USA., 16: 9128–9133.

Van der Vossen E., Sikkema A., Lintel Hekkert B., Gros J., Stevens P., Muskens M., Wouters D., Pereira A., Stiekema W., Allefs S. (2003): An ancient R gene from the wild potato species *Solanum bulbocastanum* confers broad-spectrum resistance to *Phytophthora infestans* in cultivated potato and tomato. The plant journal 36: 867 – 882.

VAN ECK, E.: The localisation of R-genes conferring resistance against phyto specific resistance against *Phytophthora infestans*. in: <http://www.dpw.wau.nl/pv/res2000.htm#R0014>

WASTIE R. L.(1991): Breeding for resistance. In: Ingram, D. S. – Williams, P. H. eds. Advances in Plant Pathology *Phytophthora infestans*, the cause of late blight of potato. Academic Press, 193-224.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>

http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi

Príspevek vznikl za podpory grantu NAZV QF 4107 Vývoj metod identifikace a charakterizace donorů rezistence vůči plísni bramborové v genofondu bramboru pomocí DNA markerů a biologického testu v in vitro podmínkách.