

PERAN SDG DAN BIOTEKNOLOGI UNTUK PERTANIAN BERKELANJUTAN

Dwinita W. Utami dan Yadi Suryadi

PENDAHULUAN

Sumber Daya Genetik (SDG) adalah kekayaan sumber daya hayati nasional yang sangat bermanfaat bagi kemajuan pertanian. Varietas unggul yang saat ini telah mengubah budi daya pertanian dari usaha tani subsisten menjadi usaha tani komersial, tidak terlepas dari kontribusi keragaman genetik dari kekayaan SDG yang kita miliki yang telah berabad-abad lalu terpelihara oleh petani secara turun temurun. Keberhasilan perakitan varietas unggul sangat tergantung dengan ketersediaan SDG dan kegiatan *pre breeding*, yang mencakup karakterisasi, peningkatan keragaman melalui hibridisasi, proses seleksi dan pemanfaatan SDG. Berbagai pengembangan teknologi terkini berbasis genom dan marka molekuler memungkinkan dilakukan seleksi berbasis gen.

Segala aspek terkait dengan peran faktor genetik dalam berkontribusi membentuk keragaman SDG yang selanjutnya dimanfaatkan dalam perakitan varietas unggul akan lebih mudah dipahami melalui pemahaman tentang aplikasi berbagai teknik Bioteknologi yang selama ini telah dikembangkan di Indonesia. Buku bunga rampai ini menyajikan hasil pemikiran berdasarkan penelitian dan pengalaman lapangan para peneliti yang bergerak dalam bidang manajemen SDG dan pemuliaan berbasis bioteknologi. Secara garis besar pembahasan aspek SDG dan biotek-

nologi terbagi dalam 3 bagian utama, yaitu Aspek SDG, yang meliputi pengelolaan, karakterisasi dan pembentukan *core collection*; karakterisasi, hibridisasi dan mikropropagasi serta pengembangan metode seleksi dan bioprospeksi.

SDG: PENGELOLAAN, KARAKTERISASI DAN PEMBENTUKAN *CORE COLLECTION*

SDG sebagai sumber keragaman genetik perlu senantiasa harus dijaga ketersediaannya. Keragaman beberapa tanaman penting yang tersebar di seluruh dunia saat ini telah terancam oleh urbanisasi dan erosi habitat, dan kejadian iklim yang tidak dapat diprediksi seperti naiknya frekuensi kekeringan, panas, dan banjir (Prasanna 2012). Berkurangnya keragaman genetik berarti mengurangi dan mempersempit pilihan dalam beberapa aspek dalam upaya pengembangan varietas dan dalam mendukung keamanan pangan. Mengingat terbatasnya jumlah tanaman pertanian yang tersedia untuk menjaga keamanan pangan secara global, maka keragaman genetik pada tanaman utama perlu dikonservasi secara efektif dan dikelola secara bijaksana, sebagaimana telah menjadi sorotan dan perhatian dunia Internasional (FAO 2016). Dalam konteks SDG pertanian, tujuan pengelolaan SDG, selain untuk pelestarian adalah untuk dapat menunjang pemanfaatannya. Lestarinya SDG dan ketersediaannya untuk penelitian dan pengembangan merupakan dua hal yang saling terkait. Pemanfaatan SDG akan sangat ditentukan oleh ketersediaan informasi mengenai sifat/karakter dari SDG tersebut dan kemudahannya untuk diakses (Upadhyaya *et al.* 2008). Data-data yang terkait dengan suatu materi harus dikelola dalam suatu *database* yang akurat, selalu terbaru, dan mudah diakses. Untuk menjamin kelestarian SDG dan mendukung pemanfaatan yang berkelanjutan, maka diperlukan tatalaksana pengelolaan SDG yang sesuai standar yang mencakup pengelola-

an materi dan data/informasi, dan alat/fasilitas pendukungnya (FAO, 2014).

Sebuah pendekatan dengan pembentukan *core collection* (koleksi inti) dipercaya dapat meningkatkan efisiensi karakterisasi dan pemanfaatan koleksi di bank gen, disamping menyimpan sebanyak mungkin variasi genetik seluruh koleksi. *Core collection* didefinisikan sebagai sekelompok aksesori dalam jumlah terbatas namun mewakili variasi genetik total aksesori dalam koleksi spesies tanaman maupun kerabat liarnya. *Core collection* menjadikan pengelolaan bank gen menjadi lebih efektif karena ukuran jumlah aksesori yang lebih kecil dari total koleksi. Pembentukan *core collection* dapat dilakukan berdasarkan beberapa kriteria seperti karakter morfoagronomi, biokimia, dan marka DNA/molekuler (Brown & Spillane 1999).

Karakterisasi keragaman genetik SDG dan identifikasi penciri genetik (sidik jari DNA) terkait dengan pengelolaan SDG baik tanaman maupun mikroba. Pengelolaan SDG mencakup serangkaian kegiatan dari akuisisi, konservasi yang mencakup monitoring dan regenerasi, karakterisasi dan evaluasi, dokumentasi, dan pemanfaatannya. Aplikasi kultur *In vitro* untuk pengadaaan benih secara massal pada tanaman yang mempunyai nilai ekonomi tinggi pada tanaman perkebunan maupun hortikultura, produksi metabolit sekunder dan pelestarian plasma nutfah pada tanaman yang tergolong langka. Informasi tentang keragaman SDG dan potensinya sangat diperlukan untuk menunjang pertanian berkelanjutan.

Pesatnya perkembangan teknologi *sekuensing* seperti NGS akhir-akhir ini, sangat mendukung karakterisasi SDG sehingga dapat mempercepat pengungkapan potensi genetik dan penentuan penciri spesifiknya. Pengungkapan potensi genetik akan mendukung nilai manfaat dari SDG tersebut. Sedangkan penentuan penciri spesifik penting dalam hal untuk perlindungan SDG.

PENINGKATAN KERAGAMAN GENETIK MELALUI HIBRIDISASI DAN MIKROPROPAGASI

Proses hibridisasi diperlukan untuk meningkatkan keragaman genetik SDG. Hibridisasi dilakukan menggunakan beberapa aksesori SDG terpilih berdasarkan kegiatan karakterisasi, sehingga diperoleh *hybrid* turunannya yang memiliki karakter target yang berasal dari kedua tetuanya. Disamping melalui tahap hibridisasi, peningkatan keragaman genetik dapat juga dilakukan melalui perlakuan *In vitro* atau mikropropagasi, seperti: hibridisasi somatik, transformasi, induksi mutasi dan poliploidisasi, serta hasil variasi genetik lainnya. Hal ini seperti misalnya pada tanaman jeruk, dimana pemuliaannya lebih banyak dilakukan melalui pendekatan non konvensional karena persilangan seksual menghadapi kendala system reproduksi jeruk yang unik. Jeruk adalah komoditas hortikultura penting dengan tingkat heterozigositas, poliembrionik dan apomiksis yang cukup tinggi, serta masa juvenile yang panjang, sehingga proses pemuliaan memerlukan waktu yang sangat panjang, lebih dari 10 tahun (Imai *et al.* 2016; Rai & Shekhawat 2014).

Keberhasilan meregenerasikan jaringan atau organ di dalam kultur jaringan, seperti transformasi gen, fusi protoplas dan kultur antera, menjadi kunci utama untuk meningkatkan keragaman genetik sehingga materi seleksi menjadi lebih luas (Gantait *et al.* 2010; Ślesak *et al.* 2013; Iqbal *et al.* 2016; Ahmadpour *et al.* 2017; Siddique *et al.* 2015). Material genetik potensial yang terpilih selanjutnya perlu untuk diperbanyak dan di sinilah teknologi mikropropagasi kembali berperan. Teknik mikropropagasi dinilai perlu diterapkan untuk menyediakan benih dalam jumlah besar, terutama untuk varietas baru hasil persilangan, seleksi, mutasi, dan rekayasa genetika (Firoozabady & Moy 2004; Nursandi *et al.* 2005). Teknologi *In vitro* juga berperan dalam mengatasi berbagai kendala dalam perbanyakan/poduksi benih berkualitas secara cepat yang sehat, bebas penyakit/virus, misal-

nya pada komoditas nanas, beberapa tanaman obat (Kumar & Reddy 2011; Seran 2013), rumput hijauan pakan dan tebu (Nkwanyana *et al.* 2010).

PENGEMBANGAN METODE SELEKSI DAN BIOPROSPEKSI

Kesuksesan yang dicapai pemuliaan konvensional perlu dimaksimalkan dengan bantuan bioteknologi. Genetika molekuler atau pemanfaatan teknik marka yang berfungsi untuk mendeteksi diferensiasi individu-individu pada level DNA-nya mempunyai implikasi yang besar dalam usaha perakitan tanaman baru. Teknologi marka DNA yang dikembangkan berdasarkan berbagai motif dan variasi nukelotida di dalam genom, menawarkan harapan baru dengan berbagai kelebihannya dalam usaha memaksimalkan pencapaian pada proses pemuliaan tanaman konvensional (Eathington *et al.* 2007). Penggunaan marka DNA dalam pemuliaan tanaman biasa disebut *marker-assisted selection* (MAS) dan menjadi komponen disiplin keilmuan baru “pemuliaan molekuler” (Wammanda & Jonah 2006; Collard & Mackill 2008). Teknologi MAS telah banyak diterapkan untuk mendukung produksi berbagai komoditas tanaman, khususnya tanaman pangan yang berkorelasi langsung dengan ketahanan pangan nasional.

Upaya peningkatan produksi tanaman pangan, khusus padi telah dilakukan melalui berbagai upaya seperti penyediaan air melalui sistem irigasi, pemakaian pupuk kimia, penerapan pestisida sesuai tingkat serangan OPT dan penggunaan varietas unggul sebagai bahan tanam yang berkualitas. Namun dalam jangka panjang ternyata upaya ini berdampak negatif, seperti penurunan keanekaragaman hayati karena pengembangan varietas unggul monokultur secara luas, kemampuan daya produksi tanah yang makin menurun karena pencemaran oleh pengguna-

an pupuk buatan yang berlebihan, munculnya jenis ras/stain/ biotipe penyakit dan hama yang baru karena besarnya tekanan seleksi akibat pemakaian varietas unggul dan pestisida yang berkelanjutan. Salah satu cara untuk menghadapi tantangan di atas adalah dengan menggunakan teknologi yang ramah lingkungan, tetapi tetap dapat meningkatkan produktivitas tanaman, misalnya dengan memperbaiki produktivitas varietas lokal. Varietas lokal yang telah teradaptasi pada kondisi lingkungan tercekam sangat berpotensi sebagai sumber genetik, potensi genetik tersebut dapat dimanfaatkan secara optimal untuk peningkatan produksi padi nasional melalui pembentukan atau perbaikan varietas padi terutama dengan menggunakan teknologi molekuler (Jamil *et al.* 2015).

Pemanfaatan gen-gen unggul untuk mendukung program pemuliaan padi rawa dapat ditempuh melalui teknologi molekuler. Pemuliaan molekuler dapat meningkatkan presisi seleksi dengan mendasarkan pada gen-gen unggul tersebut. Pemuliaan molekuler juga dapat menentukan arah seleksi, misalnya dapat meminimalisir kekurangan dari padi lokal, yaitu daya hasil yang rendah dan umur yang dalam atau justru dipertahankan karena terkadang karakter ini memudahkan petani untuk menanam. Namun demikian pemuliaan molekuler tidak dapat berdiri sendiri, tetapi sebagai *tools* yang melengkapi sekaligus meningkatkan presisi seleksi yang mendasarkan pada seleksi fenotipe.

Teknologi rekayasa genetika menawarkan solusi untuk memanfaatkan gen lintas komoditas dan bahkan lintas spesies, yang terkendala apabila disilangkan untuk dibuat *hybrid*-nya. Seperti misalnya pada perakitan kentang tahan *P. infestans* yang dilakukan melalui teknik rekayasa genetika dengan menyisipkan gen-gen ketahanan ke dalam tanaman. Saat ini telah diperoleh kentang hasil persilangan Atlantic atau Granola dengan Katahdin SP951 yang mengandung gen tunggal yaitu gen *RB* yang berasal dari kerabat liar kentang *Solanum bulbocastanum*. Kentang hasil

persilangan terbukti memberikan ketahanan di lapang sampai umur 45–50 hari setelah tanam tanpa penyemprotan fungisida (Ambarwati *et al.* 2015).

Penemuan teknologi pengeditan genom telah membuka peluang untuk perbaikan atau modifikasi tanaman yang lebih efisien dan presisi. Pengeditan genom lebih terarah menggunakan *nuclease* artifisial yang memiliki potensi untuk mempercepat penelitian dasar dan pemuliaan tanaman melalui modifikasi genom secara tepat dan terprediksi (Bortesi & Fisher 2015). Pengeditan genom pada situs spesifik juga memungkinkan melakukan penelitian di bidang *reverse genetic*, rekayasa genom dan integrasi transgen terarah (*targeted transgene integration*) dengan cara yang lebih efisien dan presisi. Teknologi ini melibatkan introduksi potongan DNA utas ganda terarah (*DNA double-strand breaks*, DSBs) menggunakan *nuclease* yang sudah direkayasa untuk menstimulasi mekanisme reparasi DNA secara seluler (Bortesi & Fisher 2015; Abdallah *et al.* 2015). Teknologi CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat*) adalah teknologi terobosan terbaru untuk pengeditan genom. CRISPR pertama kali diidentifikasi pada genom *Escherichia coli* pada tahun 1987 (Ishino *et al.* 1987). Teknik pengeditan genom yang banyak digunakan sebelumnya adalah *zinc finger nuclease* (ZFNs; Kim *et al.* 1996) dan *transcription activator-like effector nucleases* (TALENs, Christian *et al.* 2010). Keduanya merupakan protein fusi artifisial yang terdiri atas sebuah domain pengikatan DNA yang dimodifikasi difusikan dengan domain enzim restriksi *nuclease* nonspesifik *FokI*, dan fusi tersebut telah berhasil digunakan pada banyak organisme termasuk tanaman (Jankele & Svoboda 2014; Palpant & Dudzinski 2013). Di antara teknik pengeditan genom, teknik CRISPR/Cas9 merupakan sistem modifikasi genom terarah yang paling banyak dikembangkan dikarenakan sistem ini lebih efisien, tidak mahal, mudah, dan tidak kompleks (Abdallah *et al.* 2015; Mishra & Zhao 2018).

Gen sintetik yang banyak digunakan untuk mengatasi hama penggerek batang adalah gen *Cry* atau dikenal dengan sebutan gen *Bt*, berasal dari bakteri *Bacillus thuringiensis*. Gen *Cry* dengan perkembangan genetik rekombinan, genetik engineering dan bioteknologi dapat dimasukkan ke dan menjadi bagian dari genom tanaman padi. Pendekatan dengan gen sintetik *Cry* telah terbukti mampu menimbulkan sifat tahan pada tanaman padi terhadap hama penggerek batang kuning dan penggerek batang bergaris (Wu *et al.* 2000). Pengembangan tanaman tahan hama penggerek dengan menggunakan gen sintetik *Cry*, selain pada padi (Fujimoto *et al.* 1993) adalah pada tanaman jagung (Koziel *et al.* 1993), kapas (Zhu *et al.* 2004), kedelai (Stewart *et al.* 1996a), canola (Stewart *et al.* 1996b) dan tebu (Arencibia *et al.* 1997). Tanaman hasil rekayasa genetik mengekspresikan protein *Cry* telah diadopsi secara luas di dunia; mencapai 98,5 juta hektar pada tahun 2016 (ISAAA 2016).

KESIMPULAN

Pembangunan pertanian Indonesia sangat perlu dukungan ketersediaan sumber daya genetik (SDG) yang terpelihara. SDG tersebut bernilai penting dan strategis bagi ketahanan pangan, kesehatan, energi, lingkungan dan keamanan negara.

Bioteknologi merupakan salah satu teknologi inti yang bisa memacu transformasi perekonomian negara, sehingga banyak negara telah menginvestasikan secara besar-besaran dalam hal kemampuan invensi pengembangan sumber daya, ilmu dan bisnis secara global. Kemajuan bioteknologi berpeluang untuk memanfaatkan SDG lokal yang kita miliki.

Peran bioteknologi antara lain membuka terobosan untuk meningkatkan produktivitas, mutu, dan mengurangi biaya produksi serta menciptakan produk dan sarana produksi yang ramah lingkungan serta meningkatkan nilai tambah. Invensi di

bidang pertanian, pangan dan farmasi telah menunjukkan potensi yang besar dari bioteknologi untuk mengembangkan berbagai macam produk, varietas, farmasi terapitik,

Bidang prioritas penelitian dan pengembangan bioteknologi ke depan, antara lain: (a) Pengungkapan aspek biokimia dan molekuler serta struktur biologi yang menjadi dasar pertumbuhan tanaman (kultur jaringan); (b) Pemetaan, eksplorasi gen-gen penting dan sekuen genom hewan, tanaman dan mikroba untuk perakitan genetik; (c) Perakitan dan pengujian galur-galur unggul responsif terhadap cekaman abiotik (kekeringan, lahan masam, salinitas tinggi) dan kondisi biotik (ketahanan terhadap OPT); (d) Pengembangan bibit dan benih unggul yang mempunyai produktivitas tinggi, tahan terhadap hama dan penyakit, serta kandungan gizi yang lebih baik; (e) Pengembangan teknik deteksi dan metode untuk pengujian keamanan pangan; (f) Pengembangan bioprospeksi yaitu dalam hal penentuan biokimia dan mekanisme kontrol genetik dalam metabolisme pada hewan, tanaman dan mikroba potensial dalam rangka pengembangan produk bahan pangan baru ataupun bahan kimia untuk keperluan industri dan farmasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdallah NA, Prakash CS, McHughen AG. 2015. Genome editing for crop improvement: Challenges and opportunities. *GM Crops & Food*. 6:183-205.
- Ahmadpour R, Zare N, Asghari-Zakarta R, Sheikhzadeh P. 2017. Efficient *in vitro* somatic embryogenesis and plant regeneration from mature and immature embryos of Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Braz Arch Biol Technol*. 59:1-12.
- Ambarwati AD, Kusmana, Listanto E. 2015. Klon-klon kentang transgenik hasil persilangan terseleksi tahan terhadap

- penyakit hawar daun *Phytophthora infestans* tanpa penyemprotan fungisida di empat lapangan uji terbatas. J Biol Indones. 1:177-186.
- Arencibia A, Vazquez RI, Prieto D, Pilar Téllez P, Carmona ER, Coego A, Hernández L, De la Riva G, Selman-Housein G. 1997. Transgenic Sugarcane plants resistant to stem borer attack. Mol. Breed. 3:247-255.
- Bortesi L, Fischer R. 2015. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. Biotechnol Adv. 33:41-52.
- Brown AHD, Spillane C. (1999). Implementing *core collections*-principles, procedures, progress, problems and promise. In: Johnsonm RC, Hodgkin T editors. Core collections for today and tomorrow. Crop Sci Soc Am, Madison. Pp. 1-10.
- Collard BCY, MacKill DJ. 2008. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. Philos Transact Royal Soc. 363:557-572.
- Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, Hummel A, *et al.* 2010. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. Genetics. 186:757-761.
- Eathington SR, Crosbie TM, Edwards MD, Reiter RS, Bull JK. 2007. Molecular markers in a commercial breeding program. Crop Sci. 47:S154-S163.
- FAO. 2016. National level conservation and use of farmers' varieties/landraces: Revised draft voluntary guidelines. CGRFA-16/17/Inf.18.
- FAO. 2014. Genebank standards for plant genetic resources for food and agriculture. Rev. ed. Rome. pp. 182.

- Firoozabady E, Moy Y. 2004. Regeneration of pineapple via somatic embryogenesis and organogenesis *In vitro*. *Cell Dev Biol Plant*. 40:67-74.
- Gantait S, Mandal N. 2010. Tissue culture of *Anthurium andreaeanum*: A significant review and future prospective. *Int J Bot*. 6:207-219.
- Imai A, Kuniga T, Yoshioka T, Nonak K. 2016. Evaluation of the best linear unbiased prediction method for breeding values of fruit-quality traits in citrus. *Tree Genetics & Genomes*. [Online] *Tree Genetics & Genomes*. Available from: doi:10.1007/s11295-016-1078-8.
- Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. 1987. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*. 169:5429-33.
- Iqbal M, Raja NI, Asif S, Ilyas N, Hussain M, Yasmeen F, Javed H. 2016. *In-vitro* study of callogenesis and regeneration potential of elite wheat (*Triticum aestivum* L.) Cultivars. *Am J Plant Sci*. 7:2515-2526.
- ISAAAC. 2016. Global status of commercialized biotech/GM crops. ISAAA brief No. 52. Ithaca (USA): International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications.
- Jankele R, Svoboda P. 2014. TAL effectors: tools for DNA targeting. *Funct Genom*. 13:409-19.
- Jamil A, Abdurachman S, Zaeni Z, Baliadi Y. 2015. Pembangunan pertanian berbasis persawahan dalam perspektif ekoregion. Dalam: Pasandarana E, Nursyamsi D, Suradisastra K, Mardianto S, Haryono. *Pembangunan Pertanian Berbasis Ekoregion*. Jakarta (Indonesia): (IAARD) Press.

- Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. 1986. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to FokI cleavage domain. Proc Natl Acad Sci USA. 93:1156-60.
- Kumar N, Reddy MP. 2011. *In vitro* plant propagation: A review. J Forest Sci. 27:61-72.
- Mishra R, Zhao K. 2018. Genome editing technologies and their applications in crop. Plant Biotech. Rep.
- Nkwanyana PD, Snyman SJ, Watt MP. 2010. Micropropagation of sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) *In vitro*: a comparison between semi-solid and liquid RITA temporary immersion culture systems with respect to plant production and genotypic and phenotypic fidelity. SA J Bot. 76:400.
- Nursandi F, Poerwanto R, Sobir, Sujiprihati S. 2005. Perbanyakkan *In vitro* nenas (*Ananas comosus* (L.) Merr.) dengan menggunakan BAP dan TDZ. Simposium Nasional dan Kongres VIII. Bandar Lampung.
- Palpant NJ, Dudzinski D. 2013. Zinc finger nucleases: looking toward translation. Gene Theor. 20:121-127.
- Prasanna V, Annamalai H. (2012). Moist dynamics of extended monsoon breaks over South Asia. J Clim. 25:3810-383.
- Rai MK, Shekhawat N. 2014. Recent advances in genetic engineering for improvement of fruit crops. Plant Cell Tiss Organ Cult. [Online] 116:1-15. Available from: doi:10.1007/s11240-013-0389-9.
- Seran TH. (2013) *In vitro* propagation of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) through direct organogenesis: A review. Pak J Biol Sci. 16:1826-1835.
- Ślesak H, Góralski G, Pawłowska H, Skucińska B, Popielarska-Konieczna M, Joachimiak A. 2013. The effect of genotype on a

- barley scutella culture. Histological aspects. Open Life Sci. 8:30-37.
- Siddique I, Bukhari NAW, Perveen K, Siddiqui I. 2015. Influence of plant growth regulators on *In vitro* shoot multiplication and plantlet formation in *Cassia angustifolia* Vahl. Braz Arch Biol Technol. 58:686-691.
- Stewart Jr CN, Adang MJ, All JN, Raymer PL, Ramachandran S, Parrott W. 1996a. Insect control and dosage effects in transgenic canola containing a synthetic *Bacillus thuringiensis* cryIAC Gene. Plant Physiol. 112:115-120. <https://doi.org/112/1/115> [pii].
- Stewart Jr CN, Adang MJ, All JN, Boerma HR, Cardineau G, Tucker D, Parrott WA. 1996b. Transformation, recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis* cryIAC Gene. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.112.1.121>.
- Upadhyaya HD, Gowda CLL, Sastry DVRRR. 2008. Plant genetic resources management: collection, characterization, conservation and utilization. SAT e-Journal ICRISAT 6. Pp. 14.
- Wammanda DT, Jonah PM. 2006. Biotechnology as a useful tool in wheat (*Triticum aestivum*) improvement. J Res Agric. 3:18-23.
- Wu G, Cui H, Ye G, Xia Y, Sardana R, Cheng X, Shu Q. 2000. Inheritance and expression of the cry1Ab gene in Bt (*Bacillus thuringiensis*) transgenic rice. Theor Appl Genet. 104:727-734. <https://doi.org/10.1007/s001220100689>.
- Zhu YC, Adamczyk J. 2004. PCR confirmation of the cry1Ac Gene in Transgenic BT (Bollgard ®) COTTON. Beltwide Cotton Conferences, San Antonio, TX-Jan. 5, 023672, 1849-1851. <https://doi.org/10.1093/cercor/bht212>.