

Konstruksi dan Kloning Plasmid *pCambia1301* dengan Gen *Cry1Ab*

Edy Listanto, Habib Rizjaani, Liberty, Tri J. Santoso, Saptowo J. Pardal, Ida H. Somantri, I. Altosar, dan M. Herman

ABSTRAK

Penelitian konstruksi dan kloning plasmid *pCambia1301* dengan gen *cry1Ab* telah dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan konstruksi plasmid *pCambia* yang mengandung gen *cry1Ab*. Proses konstruksi dilakukan dengan penyisipan gen *cry1Ab* pada vektor *pCambia1301* menggunakan proses ligasi. Ligan ditransformasi ke dalam *Escherichia coli* DH5 α dengan metode kejutan panas dan ke dalam *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 dengan metode kejutan dingin atau *tri-parental mating*. Hasil ligasi dan transformasi ke dalam bakteri diperoleh dua DNA plasmid dari dua koloni berbeda. DNA plasmid rekombinan tersebut sebagai *pC1Ab* dengan ukuran 14,8 kb berdasarkan uji pola restriksi dengan enzim *HindIII* yang membentuk dua fragmen DNA berukuran 11,8 kb dan 3,0 kb. Uji pola restriksi dengan enzim *HindIII* dan *EcoRI* diperoleh 3 fragmen DNA berukuran 11,8 kb, 2,7 kb, dan 0,3 kb. Uji pola restriksi dengan *BamHI* dan *HindIII* diperoleh 3 fragmen DNA berukuran 11,8 kb, 2,1 kb, dan 0,8 kb. Sedangkan, pemotongan dengan enzim *EcoRI* menunjukkan dua fragmen DNA berukuran 14,5 kb dan 0,3 kb dari kedua DNA plasmid *pC1Ab* yang menunjukkan arah yang sama, yaitu ke kiri. Hasil uji PCR dari plasmid *pC1Ab* diperoleh fragmen gen *cry1Ab* berukuran 1,0 kb. Hasil uji GUS terhadap plasmid *pC1Ab* yang ditransformasikan ke eksplan kotiledon melalui *A. tumefaciens* menunjukkan reaksi GUS positif berwarna biru.

Key words: Plasmid biner, gen *cry1Ab*, *Agrobacterium tumefaciens*, uji pola restriksi.

PENDAHULUAN

Perakitan tanaman unggul merupakan langkah untuk peningkatan produktivitas dan produksi pertanian. Salah satu usaha untuk merakit tanaman tersebut, yaitu dengan menggunakan teknik rekayasa genetik. Teknik ini dapat digunakan untuk menyisipkan gen-gen yang berasal dari tanaman, bakteri, virus ataupun dari hewan. Pemanfaatan gen yang berasal dari organisme lain dilakukan apabila tidak ada sumber gen yang diperlukan dari plasma nutfah tanaman.

Contoh gen asing yang berasal dari organisme lain adalah gen *cry1Ab* yang diisolasi dari bakteri *Bacillus thuringiensis*. Produk dari gen tersebut merupakan protein δ -endotoxin yang bersifat racun terhadap kelompok serangga tertentu. Gen *cry1Ab* tersebut merupakan kelompok gen penghasil protein δ -endotoxin yang racun terhadap serangga dari ordo Lepidoptera, seperti penggerek polong kedelai. Penyisipan gen *cry1Ab* ke dalam genom kedelai diharapkan akan diperoleh tanaman kedelai yang tahan terhadap hama penggerek polong.

Teknik rekayasa genetik yang melibatkan transfer gen asing ke dalam tanaman, pertama kali dilakukan melalui *Agrobacterium* (Horsch *et al.* 1984). Sedangkan, Luthra *et al.* (1997) melaporkan beberapa hasil penelitian melalui teknik mikroproyektile atau *particle bombardment*. Keberhasilan transfer gen asing ke dalam tanaman dipengaruhi oleh beberapa faktor, di antaranya (1) daya regenerasi bahan tanaman sampai menjadi tanaman fertil, (2) efisiensi teknik transfer gen ke dalam sel, dan (3) sifat dan jenis vektor yang digunakan (Bommineni dan Jauhar 1997).

Faktor yang cukup menentukan keberhasilan transfer gen adalah teknik transfer gen. Transfer gen asing melalui *Agrobacterium* dapat terjadi apabila bakteri tersebut membawa plasmid biner yang mengandung struktur DNA khusus (T-DNA). Fragmen DNA (gen tertentu) yang disisipkan ke dalam T-DNA akan ditransfer ke dalam genom tanaman secara efisien dan akan dipertahankan kestabilannya (Smith dan Hood 1995; An *et al.* 1988). Saat ini, efisiensi transformasi melalui *Agrobacterium* terjadi pada tanaman dikotil dengan stabilitas integrasi pada kromosom, ekspresi dan pewarisan yang mantap. Transformasi kedelai melalui *Agrobacterium* telah terbukti bisa dilakukan dan relatif lebih murah dibandingkan dengan metode penembakan partikel. Ber-

dasarkan keberhasilan transformasi tersebut, maka perlu dilakukan pembuatan vektor plasmid khusus yang mengandung gen *cry1Ab* guna transformasi melalui *Agrobacterium*.

Damak dan Bullock (1993) menyebutkan bahwa terdapat dua tahap penting dalam proses penyisipan fragmen DNA (gen interes) ke plasmid vektor, yaitu ligasi antara DNA sisipan dan vektor, dan ligasi kembali vektor tanpa sisipan (*self-ligation*). Ullrich *et al.* (1977) melaporkan bahwa adanya proses defosforilasi dapat menurunkan terjadinya *self-ligation*. Listanto dan Wang (1996) berhasil menyisipkan gen *cad* ke dalam vektor *pUb*- dengan persentase keberhasilan sebesar 30%.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan konstruksi plasmid *pCambia* yang mengandung gen *cry1Ab*. Hasil konstruksi ini akan digunakan pada penelitian transfer gen *cry1Ab* ke dalam genom tanaman kedelai melalui *A. tumefaciens* guna mendapatkan sifat tahan terhadap hama penggerek polong (*Etiela zinkenella*).

BAHAN DAN METODE

Bakteri *Escherichia coli* DH5 α (*E. coli* DH5 α) mengandung gen *cry1Ab* pada plasmid *pSBB* (Dr. Altosar, The University of Ottawa, Canada), *A. tumefaciens* EHA105 pembawa *pCambia1301* (Cambia, Australia).

DNA plasmid diisolasi dari kedua bakteri tersebut dengan metode lisis alkali (Sambrook *et al.* 1989). Kualitas dan kuantitasnya dicek dengan elektroforesis pada gel agarose 0,8% dan dianalisis dengan program QuantityOne™ (Biorad). Gen *cry1Ab* diisolasi dengan memotong plasmid *pSBB* dengan enzim restriksi *Hind*III. Hasil potongan dipisahkan dengan agarose elektroforesis. DNA gen *cry1Ab* diisolasi dari gel agarose dengan metode Freeze 'N Spin (Biorad).

Plasmid *pCambia1301* dipotong dengan enzim restriksi *Hind*III serta dihilangkan gugus fosfatnya dengan metode defosforilasi menggunakan *alkaline phos-phatase*. Fragmen *pCambia* yang telah terdefosforilasi diligasi dengan gen *cry1Ab* menggunakan enzim ligase. Hasil ligasi ditransformasi ke dalam *E. coli* dan *A. tumefaciens*.

Transformasi ke dalam *E. coli* menggunakan metode kejutan panas (Sambrook *et al.* 1989), sedangkan transformasi ke dalam *A. tumefaciens* dilakukan dengan metode kejutan dingin (An *et al.* 1988) atau *tri-parental mating*. Hasil transformasi ditumbuhkan pada media yang mengandung kanamisin 50 mg/l. Setiap koloni yang tumbuh diisolasi dan dipotong dengan beberapa enzim restriksi untuk mengetahui kombinasi penyisipan gen *cry1Ab* dan arahnya di dalam vektor *pCambia1301*.

Kemampuan *A. tumefaciens* pembawa plasmid rekombinan diuji dengan mentransformasikan ke dalam kotiledon kedelai berdasarkan metode Olhofs *et al.* (1998) untuk melihat ekspresi gen *gus* yang ada pada plasmid rekombinan tersebut dari eksplan yang telah dikokultivasi dengan *Agrobacterium* selama 3-5 hari (Jefferson *et al.* 1986).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi DNA plasmid dari *E. coli* DH α yang mengandung plasmid *pSBB* maupun dari *A. tumefaciens* EHA105 yang mengandung plasmid *pCambia1301* telah berhasil dilakukan dengan DNA plasmid cukup memenuhi syarat untuk proses penyisipan (Gambar 2A).

Berdasarkan peta restriksi plasmid *pSBB* (Gambar 1), untuk memperoleh potongan gen *cry1Ab* beserta promoter 35S-nya, plasmid dipotong dengan menggunakan enzim restriksi *Hind*III dan *Bam*HI. Hasil pemotongan plasmid *pSBB* dengan kedua enzim ini diperoleh 3 fragmen DNA dengan pemotongan sempurna, yaitu 0,8 kb fragmen promoter 35S, 1.845 kb fragmen gen *cry1Ab* dengan terminator nos, dan 2,7 kb fragmen vektor pGEM4z. Plasmid *pSBB* yang dipotong dengan enzim *Hind*III diperoleh dua fragmen DNA berukuran 3,0 kb, dan 2,7 kb (Gambar 2), sedangkan fragmen yang berada di atasnya berukuran sekitar 5,7 kb sebagai DNA plasmid *pSBB* belum terpotong oleh enzim *Hind*III.

Fragmen berukuran 2,7 kb sesuai dengan ukuran vektor pGEM4z dan fragmen berukuran 3,0 kb sesuai dengan ukuran fragmen gen *cry1Ab* (1.845 kb) lengkap dengan promoter 35S (0,8 kb) dan terminator nosnya (dari data plasmid lain, potongan nos berukuran sekitar 0,3 kb). Diperkirakan juga bahwa ukuran fragmen nos (antara situs *EcoR* I dan *BamH* I) sekitar 0,3 kb.

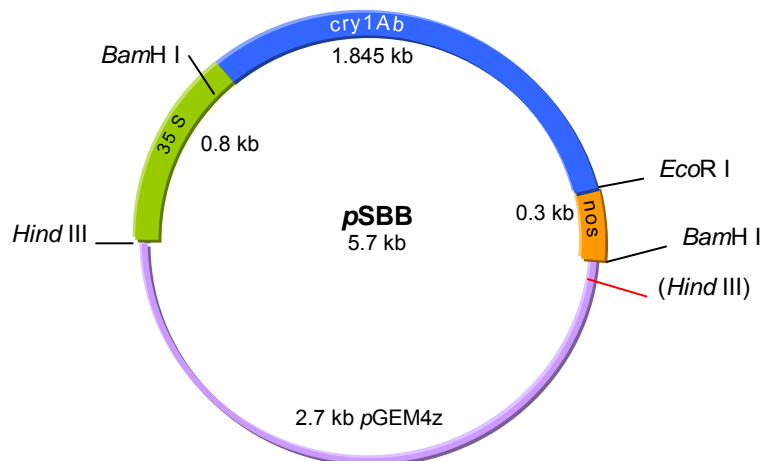
Hasil pemotongan *pCambia1301* dengan enzim *Hind*III menghasilkan satu fragmen DNA dengan ukuran sekitar 11,8 kb (Gambar 2A). Setelah proses defosforilasi dari ujung 5' potongan *pCambia* ini, fragmen tersebut digunakan untuk proses ligasi dengan fragmen gen *cry1Ab* sebagai sisipan dengan bantuan enzim ligase. Tahap defosforilasi pada DNA vektor sangat berguna untuk menekan jumlah penyambungan kembali (religasi) vektor *pCambia* yang dapat menyebabkan pengurangan terbentuknya plasmid rekombinan yang tersisipi gen *cry1Ab*.

Transformasi *E. coli* DH5 α dengan ligan tersebut diperoleh sejumlah koloni transforman yang diduga membawa plasmid rekombinan. Berdasarkan hasil uji pola restriksi dengan enzim restriksi terhadap DNA plasmid dari koloni transforman diperoleh dua transforman yang memiliki pola restriksi plasmid rekombinan, yaitu sampel nomer 3 dan 8 (Gambar 2B). Pemotongan menggunakan enzim *Hind*III menghasilkan dua potongan DNA berukuran sekitar 11,8 kb dari vektor *pCambia1301* dan 3,0 kb dari fragmen gen *cry1Ab*. Hasil pemotongan DNA plasmid rekombinan dengan enzim *Hind*III dan *EcoR*I diperoleh 3 fragmen DNA berukuran 11,8 kb dari vektor *pCambia*, fragmen gen *cry1Ab* dan promoternya berukuran 2,7 kb dan fragmen nos berukuran 0,3 kb. Hal ini membuktikan ukuran fragmen nos tersebut sekitar 0,3 kb. Sedangkan fragmen berukuran 2,7 kb tersebut terdiri fragmen gen *cry1Ab* berukuran 1.845 kb dan fragmen promoter berukuran 0,8 kb.

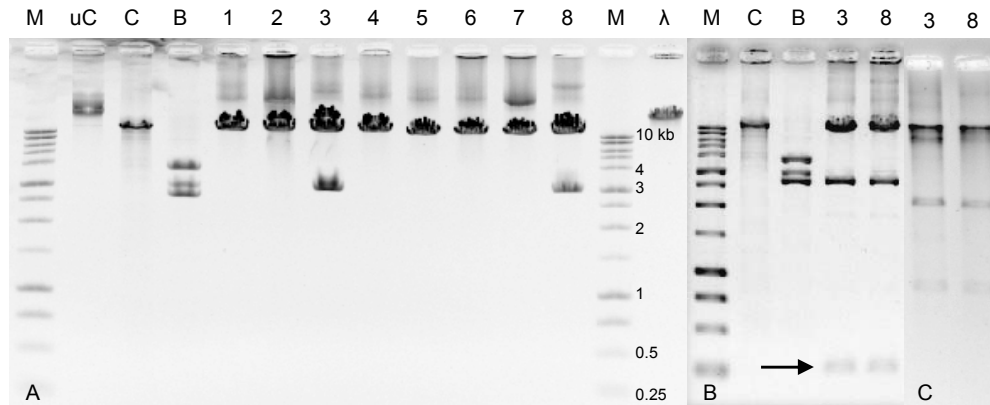
Pemotongan DNA plasmid dengan enzim *Bam*HI dan *Hind*III menunjukkan bahwa fragmen gen *cry1Ab* telah berhasil tersisipkan ke dalam *pCambia1301*. Kombinasi enzim ini menghasilkan 3 fragmen DNA berukuran sekitar 11,8 kb, 2,1 kb dan 0,8 kb (Gambar 2C). Selanjutnya, plasmid rekombinan ini disebut sebagai *pC1Ab*.

Karena plasmid rekombinan *pC1Ab* ini dibentuk dari ligasi atas dua potongan DNA yang dipotong oleh satu enzim restriksi yang sama, maka secara teori akan terdapat dua arah penyisipan fragmen gen *cry1Ab* terhadap vektor induk *pCambia1301*. Satu kemungkinan akan menempatkan promoter 35S gen *cry1Ab* sisipan berdekatan dengan promoter 35S dari gen *hpt* *pCambia1301*. Sementara kemungkinan lainnya menempatkannya berdekatan dengan promoter 35S dari gen *gus*.

Arah penyisipan ini akan mempengaruhi proses ekspresi gen yang kita sisipkan ke suatu vektor. Hal ini terutama berlaku jika kita hanya menyisipkan gen saja tanpa perangkat promoter sehingga bergantung kepada aktifitas promoter yang tersedia di dalam vektor tersebut. Pada



Gambar 1. Peta restriksi plasmid *pSBB*.



Gambar 2. A = pemotongan plasmid rekombinan dengan enzim *Hind*III. B = pemotongan plasmid rekombinan dengan enzim *Hind*III dan *Eco*RI. C = pemotongan plasmid rekombinan dengan enzim *Hind*III dan *Bam*HI. M = 1 kb plus DNA Ladder, uC = *pCambia*1301 utuh, C = *pCambia*1301 terpotong, B = *pSBB* terpotong, 1-8 = sampel DNA plasmid, λ = DNA lambda.

kondisi seperti ini, vektor rekombinan yang fungsional hanya diperoleh jika arah penyisipan gen tersebut sesuai dengan arah kerja promoter. Untuk itu, analisis restriksi dengan memotong plasmid rekombinan menggunakan kombinasi beberapa enzim restriksi perlu dilakukan. Hasil uji pola restriksi tersebut menunjukkan arah gen *cry*1Ab yang sama yaitu ke kiri dengan promoter 35s berdekatan dengan promoter 35s dari gen *gus*.

Pada percobaan ini, arah penyisipan sepertinya tidak terlalu menimbulkan masalah. Hal ini dikarenakan kaset gen *cry*1Ab yang kami sisipkan telah mempunyai perangkat ekspresinya sendiri, baik promoter maupun terminator. Oleh karena itu, fungsi ekspresinya tidak tergantung kepada perangkat ekspresi dari vektor induk.

Meskipun demikian, ketika plasmid rekombinan *pC1Ab* dipotong dengan enzim *Eco*RI saja, dihasilkan 2 potongan berukuran sekitar 14,5 kb dan 0,3 kb (Gambar 3). Ukuran potongan ini sesuai dengan prediksi jika arah penyisipan kaset gen *cry*1Ab menempatkan promoternya berdekatan dengan promoter 35S dari gen *gus* pada vektor *pCambia*1301. Arah penyisipan yang sebaliknya, diduga akan menghasilkan 2 potongan berukuran sekitar 12,2 kb dan 2,6 kb. Ukuran fragmen DNA sebesar ini tidak teramati di dalam hasil pemotongan dengan *Eco*RI. Jadi hasil ligasi gen *cry*1Ab pada vektor *pCambia*1301 hanya diperoleh satu macam plasmid rekombinan dengan arah ke kiri.

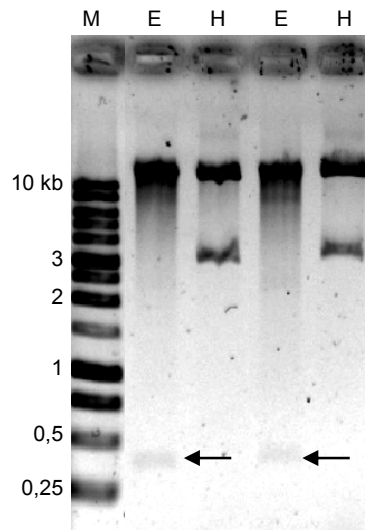
Berdasarkan analisis restriksi, diperkirakan bahwa plasmid rekombinan *pC1Ab* memiliki peta restriksi seperti terlihat pada Gambar 4. Arah ekspresi dari gen *cry*1Ab yang disisipkan berlawanan dengan arah ekspresi gen *gus*. Terlihat bahwa promoter 35S dari kedua gen saling berdekatan dan berlawanan arah. Susunan seperti ini biasa disebut *inverted repeat* yang dapat menimbulkan masalah dalam ekspresi gen karena mRNA yang dihasilkan bisa saling berkomplemen, melekat, membentuk struktur *hairpin* pada daerah *inverted repeat* tersebut (Jorgensen *et al.* 1996).

Transformasi sel *A. tumefaciens*LBA4404 dengan plasmid rekombinan *pC1Ab* menghasilkan sejumlah koloni transforman. Berdasarkan uji PCR dengan primer khusus untuk menggandakan bagian dari gen *cry*1Ab diperoleh beberapa transforman yang membawa plasmid *pC1Ab* (Gambar 5). Hasil PCR ini membuktikan bahwa fragmen gen *cry*1Ab telah berhasil disisipkan ke dalam vektor *pCambia*1301. Fragmen DNA gen *cry*1Ab hasil amplifikasi PCR ini berukuran 1,0 kb.

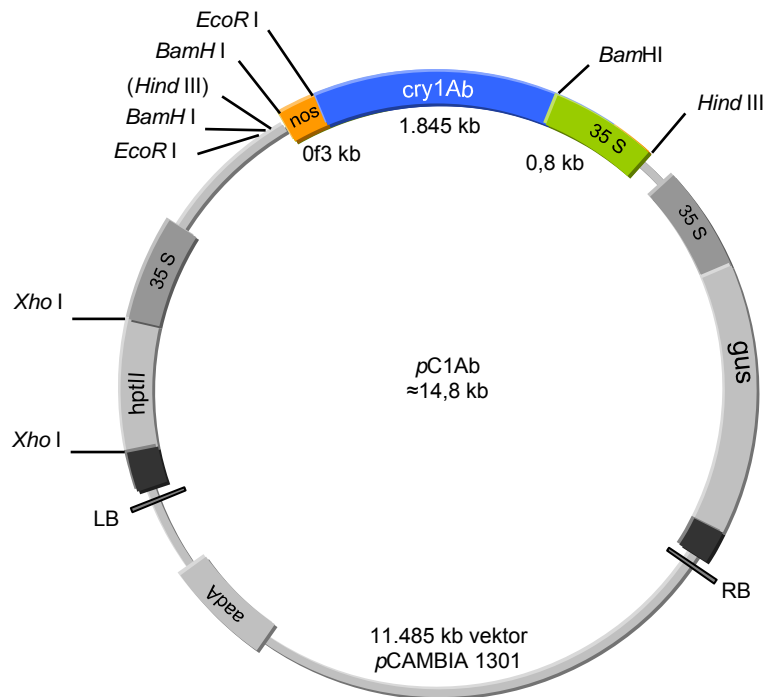
Untuk menguji berfungsi atau tidaknya plasmid rekombinan ini, dilakukan transformasi *Agrobacterium* pembawa plasmid *pC1Ab* pada kotiledon kedelai. Dari hasil percobaan ini dilihat kemampuan *Agrobacterium* dalam menginfeksi dan mentransfer gen *cry*1Ab ke dalam sel tanaman. Untuk tahap awal ini hanya dilakukan uji ekspresi sementara dari gen *gus*. Percobaan ini tidak dilakukan uji ekspresi dari gen *cry*1Ab, karena gen *gus* atau gen *cry*1Ab berada dalam T-DNA,

secara teori keduanya akan ditransfer bersama-sama ke dalam sel tanaman. Jadi, jika sel tanaman tertransformasi dan menunjukkan ekspresi gen *gus*, maka diharapkan gen *cry1Ab* juga telah masuk di dalam sel tanaman tersebut. Pengujian ini cukup untuk mengetahui potensi dari *Agrobacterium* ini dalam mentransformasi tanaman.

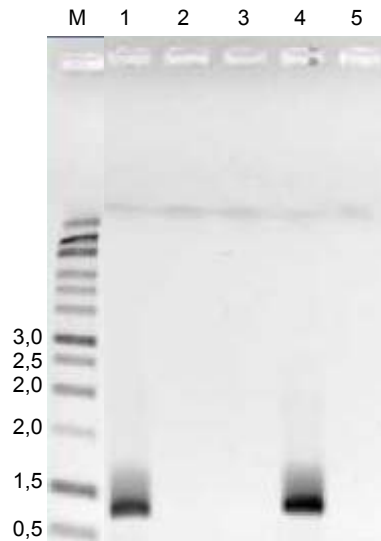
Hasil uji GUS menunjukkan bahwa plasmid rekombinan ini berfungsi dengan baik (Gambar 6). Hasil tersebut membedakan antara kotiledon kedelai yang tidak ditransformasi maupun yang ditransformasi dengan *Agrobacterium* LBA 4404 (tidak mengandung T-DNA) dengan yang di-



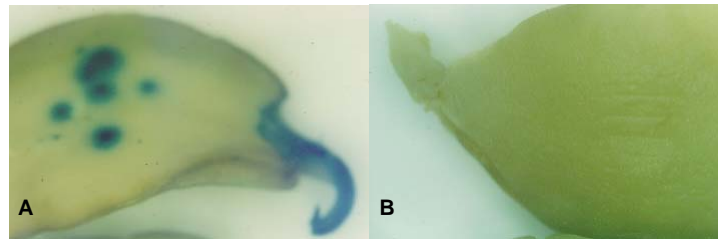
Gambar 3. Pemotongan plasmid rekombinan *pC1Ab* dengan enzim *HindIII* menunjukkan gen *cry1Ab* berukuran sekitar 3,0 kb (baris H). Pemotongan dengan enzim *EcoRI* diperoleh dua fragmen DNA berukuran 14,5 dan 0,3 kb (anak panah) yang menunjukkan arah sisipan seperti pada Gambar 4.



Gambar 4. Peta restriksi plasmid rekombinan.



Gambar 5. Hasil uji PCR gen *cry1Ab* pada beberapa koloni *Agrobacterium*. M. 1 Kb Plus DNA Ladder, 1-5 sampel koloni mengandung pC1Ab.



Gambar 6. Hasil uji GUS. A = eksplan kotiledon kedelai yang tertransformasi dengan *Agrobacterium* mengandung plasmid rekombinan pC1Ab dan B = tanpa plasmid pC1Ab.

Tabel 1. Hasil uji ekspresi gen *gus* pada kotiledon kedelai..

	Jumlah eksplan		Ekspresi sementara <i>gus</i>	
	Sindoro	Willis	Sindoro	Willis
Tidak ditransformasi	7	7	0 (0%)	0 (0%)
LBA 4404	7	7	0 (0%)	0 (0%)
pCambia1301	7	7	6 (86%)	6 (86%)
pC1Ab	60	11	59 (98%)	11 (100%)

transformasi menggunakan pC1Ab. Hampir seluruh kotiledon yang ditransformasi dengan pC1Ab menghasilkan bintik biru pertanda diekspresikannya gen *gus*. Warna biru ini terutama terlihat di daerah yang mengalami pelukaan, sesuai dengan perilaku *Agrobacterium* yang akan menempel pada sel-sel tanaman yang luka karena daya tarik dari senyawa phenol yang dikeluarkan oleh sel tanaman (Gelvin *et al.* 2000). Kemungkinan bahwa aktifitas gen *gus* ini berasal dari *Agrobacterium* tertutup karena gen ini disisipi oleh intron yang menyebabkannya tidak aktif di dalam bakteri dan hanya akan teraktifkan di dalam sel eukaryotik tanaman.

Dari pembahasan di atas dapat membuktikan bahwa perakitan vektor biner *Agrobacterium* pembawa gen *cry1Ab* telah berhasil dilakukan dan vektor rekombinan pC1Ab tersebut dapat berfungsi dengan baik di dalam *Agrobacterium* serta sel tanaman.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan:

1. Diperoleh dua koloni bakteri *E. coli* DH5 α yang mengandung plasmid rekombinan.
2. Plasmid rekombinan berukuran 14,8 kb disebut sebagai *pC1Ab* dengan arah ekspresi ke kiri berlawanan dengan arah ekspresi gen *gus* pada plasmid *pCambia1301*.
3. Uji pola restriksi plasmid *pC1Ab* dengan enzim *Hind*III diperoleh dua fragmen DNA berukuran 11,8 kb sebagai fragmen *pCambia1301* dan 3,0 kb sebagai fragmen DNA gen *cry1Ab*.
4. Uji pola restriksi plasmid *pC1Ab* dengan enzim *Hind*III dan *Eco*RI diperoleh 3 fragmen DNA berukuran 11,8 kb, 2,7 kb dan 0,3 kb.
5. Uji pola restriksi plasmid *pC1Ab* dengan enzim *Bam*HI dan *Hind*III diperoleh 3 fragmen DNA berukuran 11,8 kb, 2,1 kb, dan 0.8 kb.
6. Uji pola restriksi plasmid *pC1Ab* dengan enzim *Eco*RI diperoleh dua fragmen DNA berukuran 14,5 kb dan 3,0 kb yang menunjukkan arah ekspresi gen *cry1Ab* ke kiri.
7. Uji PCR DNA plasmid *pC1Ab* dari *Agrobacterium* diperoleh fragmen hasil amplifikasi berukuran 1,0 kb.
8. Uji ekspresi gen *gus* plasmid *pC1Ab* dalam *Agrobacterium* yang ditransformasi ke dalam eksplan kotiledon kedelai menunjukkan reaksi GUS positif berwarna biru.

DAFTAR PUSTAKA

- An, G., P.R. Ebert, A. Mitra, and S.B. Ha. 1988. Binary vectors. *Plant Mol. Biol. Man.* A3:1-19.
- Bommineni, V.R. and P.P. Jauhar. 1997. An evaluation of target cells and tissue used in genetic transformation of cereals. *Maydica* 42:107-120.
- Damak, S. and D.W. Bullock. 1993. A simple two-step method for efficient blunt-end ligation of DNA fragments. *Biotechniques* 15(3):448-452.
- Gelvin, S.B. 2003. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: The Biology behind the "Gene-Jockeying" Tool. *Microbiology and Molecular Biology Review* 67 (1):16-37
- Horsch, R., R. Fraley, S. Rogers, P. Sanders, A. Lloyd, and N. Hoffman. 1984. Inheritance of functional foreign genes in plants. *Science* 223:496-498.
- Jefferson, R.A., T.A. Kavanagh, and M.W. Bevan. 1987. GUS fusion: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* 6:3901-3907.
- Jorgensen, R.A., P.D. Cluster, J. English, Q. Que, and C.A. Napoli. 1996. Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: Comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences. *Plant Mol. Biol.* 31:957-973.
- Luthra, R., Varsha, R.K. Dubey, A.K. Srivasta, and S. Kumar. 1997. Microprojectile mediated plant transformation: a bibliographic search. *Euphytica* 95:269-294.
- Olhoft, P.M., L.E. Flagel, C.M. Donovan, and D.A. Somers. 2003. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. *Planta* 216:723-735.
- Ooms, G., P.J.J. Hooykaas, G. Moolenaar, and S.A. Schilperoort. 1981. Crown gall plant tumors of abnormal morphology, induced by *Agrobacterium tumefaciens* carrying mutated octopine Ti plasmids; analysis of T-DNA functions. *Gene* 14:33-50.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning, a laboratory manual*^{2nd} Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Book 1, 2, dan 3.
- Smith, R.H. and E.E. Hood. 1995. Review and interpretation, *Agrobacterium tumefaciens* transformation of monocotyledons. *Crops Science* 35:301-309.

Ullrich, A., J. Shine, J. Chingwin, R. Pictet, E. Tischer, W.J. Rutter, and H.M. Goodman. 1977.
Rat insulin genes: Construction of plasmids containing the coding sequences. *Science*
196:1313-1319.