

## **Pengembangan pelacak DNA spesifik gen melalui bioinformatika: Identifikasi gen penyandi protein biji 21 kDa pada kakao UAH Indonesia**

*The development of gene-specific probe by bioinformatica: Identification of 21 kDa-encoding seed protein gene on Indonesian UAH cacao*

Djoko SANTOSO

Unit Penelitian Bioteknologi Perkebunan, Bogor 16151, Indonesia

### **Summary**

*A proper gene-specific probe is inevitable for the process of gene discovery. In addition such probe can be utilized to study the expression of corresponding gene. Probe, which is specific to gene of interest maybe developed using internet-accessible database coupled with molecular techniques. This research aimed to develop a probe, specific to 21 kDa-encoding seed protein gene and try it on cacao genomes. Two pairs of DNA primers were made based on the conserved regions. Examined on the cacao genomes with PCR technique demonstrated that both the specific and nested primer pairs were able to amplify the targeted gene fragments with predicted sizes, about 465 and 160 bp. RT-PCR with total RNA from cacao seeds suggested that the specific primer can be utilized to determine the expression level of the gene in the organ. Furthermore, Southern blotting analysis with genomic DNA from five different cacao clones in Indonesia indicated that the probe was significantly specific to the gene. These conclude that a probe specific to the 21 kDa-encoding gene was developed and tested effective to identify the presence and determine the expression of the gene.*

[Key words: Primers DNA, bioinformatica, seed protein, *Theobroma cacao* L. ]

### **Ringkasan**

Proses penemuan gen memerlukan adanya pelacak spesifik gen tersebut. Selain itu, pelacak spesifik juga dapat digunakan dalam mempelajari ekspresi suatu gen yang sesuai. Pelacak spesifik gen dapat dikembangkan dengan memanfaatkan kemajuan bioinformatika teknik-teknik biologi molekuler. Penelitian ini bertujuan untuk merintis pengembangan pelacak spesifik gen dan mengujinya pada genom kakao. Adapun targetnya adalah gen penyandi protein 21 kDa yang diekspresikan di biji kakao namun bukan merupakan protein penyimpanan (*storage protein*). Dua pasang primer DNA dihasilkan dari perancangan menggunakan dasar daerah terkonservasi. Pengujian di tingkat genom kakao dengan teknik PCR membuktikan bahwa kedua pasangan primer tersebut dapat mengamplifikasi secara spesifik gen penyandi protein target. Baik PCR dengan pasangan primer spesifik gen maupun *nested*, terhadap dua klon kakao, masing-masing menghasilkan dua amplicon yang ukurannya sesuai dengan ukuran prediksi, yaitu sekitar 465 dan 160 pb-an. Pengujian dengan RT-PCR menunjukkan bahwa pelacak tersebut dapat digunakan untuk menentukan ekspresi gen tersebut di biji kakao. Lebih dari itu, *Southern blotting* terhadap genom dari lima klon kakao yang berbeda menegaskan bahwa pelacak gen tersebut memiliki spesifisitas yang tinggi. Dengan demikian pelacak spesifik gen penyandi protein biji 21 kDa dapat dikembangkan dan terbukti efektif untuk beberapa klon kakao di Indonesia.

## Pendahuluan

Salah satu input penting untuk riset biologi molekuler dan pengembangan bioteknologi adalah gen, bagian dari genom yang membawa sifat suatu organisme. Usaha untuk memahami ataupun memodifikasi berbagai proses biologi pada tingkat molekuler, memerlukan tersedianya gen-gen yang terlibat di dalam proses tersebut termasuk informasi yang terkait dengan gen-gen tersebut. Identifikasi dan karakterisasi gen seringkali diperlukan dalam berbagai percobaan molekuler antara lain isolasi, kloning ataupun mempelajari ekspresinya. Untuk itu diperlukan adanya pelacak spesifik gen yang dapat mengidentifikasi keberadaannya maupun ekspresinya dengan cara yang mudah namun akurat.

Ada beberapa pendekatan yang dapat digunakan untuk mengembangkan pelacak spesifik tersebut. Pendekatan yang memanfaatkan kemajuan bioinformatika dan teknik PCR, saat ini merupakan salah satu cara yang relatif mudah yang dapat dilakukan. Southerton *et al.* (1998) mengidentifikasi dan mempelajari gen pembungaan *ELF1* dan *ELF2* pada *Eucalyptus* menggunakan primer heterologus dari sekuen gen *LFY Arabidopsis* (Weigel *et al.*, 1992) dan *FLO Anhirrhinum* (Coen *et al.*, 1990). Pada penerbitan nomor ini gen pembawa sifat toleransi kekeringan P5CS pada tebu diidentifikasi menggunakan primer yang berasal dari sekuen P5CS dari *Vigna aconitifolia* (Minarsih *et al.*, 2001). PCR spesifik ini juga dapat digunakan untuk mengkuantifikasi ekspresi mRNA dengan biaya yang lebih murah daripada metoda PCR *real-time* (Watzinger *et al.*, 2001).

Tulisan ini menguraikan hasil penelitian tentang pengembangan penanda spesifik gen dengan memanfaatkan informasi dari database yang diakses melalui internet dan teknik PCR. Gen interes yang dipilih menyandi protein 21 kDa yang dapat

ditemukan pada biji kakao (Tai *et al.*, 1991). Protein ini tidak menunjukkan karakteristik protein penyimpanan (*storage protein*), oleh karenanya diduga memiliki fungsi biologis tertentu. Untuk menentukan daerah terkonservasi (*conserved regions*) dari gen tersebut dilakukan analisis BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) dengan input sekuen baik asam aminonya maupun nukleotidanya. Primer DNA dirancang atas dasar sekuen pada daerah terkonservasi ini secara semimanual ataupun dengan program komputer antara lain *GeneRunner*. Primer yang disintesis berdasarkan hasil rancangan tersebut digunakan dalam PCR baik dengan cetakan (*template*) DNA maupun RNA total organisme sumber atau target.

## Bahan dan Metoda

### Merancang DNA primer spesifik

Protein biji kakao dengan ukuran 21-kDa digunakan sebagai gen target. Sekuen asam amino dan nukleotidanya dipakai sebagai referensi (Tai *et al.*, 1991). Sekuen-sekuen ini kemudian dianalisis BLAST untuk menentukan daerah-daerah terkonservasi, dan sekuen nukleotidanya dikonfirmasi. Dua di antara daerah tersebut dipilih untuk dasar merancang sepasang primer yang jaraknya di antara 300-700 pb. Perancangan ini dapat dilakukan dengan program komputer *GeneRunner* ataupun secara semimanual dengan memperhatikan parameter-parameter yang umum, antara lain jumlah nukleotida 15-22 mers, kandungan GC 50% atau lebih. Tidak terdapat kemungkinan adanya saling komplemen antara basa di dalam satu rantai primer ataupun antara primer yang satu dengan lainnya.

### Mempersiapkan DNA kakao terikat pada membran

DNA genomik kakao diekstraksi dengan

### *Pengembangan pelacak DNA spesifik gen melalui bioinformatika...*

metoda yang dimodifikasi dari Khanuja *et al.* (1999). Sebagai pengganti jaringan sumber, inti sel yang dipreparasi menurut metoda Couch & Fritz (1990) digunakan sebagai sumber DNA tersebut. Setelah diuji kualitas dan ditentukan kuantitasnya, larutan DNA yang diperoleh dapat langsung digunakan untuk berbagai percobaan atau disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Untuk percobaan *Southern blotting*, DNA diperlakukan sebagai berikut. Setelah digesti dengan enzim *EcoRI* atau *HindIII*, DNA difraksinasi pada gel agarosa 0,7 – 1%, ditransfer ke membran nilon dengan daya kapiler semalam, lalu difiksasi dengan pemanasan oven  $80^{\circ}\text{C}$  (Santoso, 1995).

#### *PCR spesifik dengan template DNA*

Reaksi PCR dengan template DNA dilakukan dengan prosedur standar (Heuvel, 2001)) menggunakan *Thermal Cycler* dari MJ Research<sup>TM</sup> yang dilengkapi dengan pemanas tutup (*lid heating system*). PCR dilakukan dengan program denaturasi pada suhu  $95^{\circ}\text{C}$  selama 30 detik, pemasangan (*annealing*)  $50^{\circ}\text{C}$  x 30 detik, pemanjangan (*extension*)  $72^{\circ}\text{C}$  x 2 menit, dan jumlah siklus 35. Suhu pemasangan tersebut sekitar  $6^{\circ}\text{C}$  di bawah  $T_m$  teoritis. Hasil PCR dielektroforesis dengan gel agarosa 1,4%.

#### *Isolasi RNA total dari buah kakao*

RNA total diisolasi dari jaringan biji kakao dengan metoda yang dimodifikasi dari Asif *et al.* (2000). Sebanyak 5  $\mu\text{L}$   $\beta$ -merkaptotanol ditambahkan ke dalam setiap mL bufer ekstrak. Selain itu PVPP ditambahkan ke dalam bufer ekstrak sebagai antioksidan. Penambahan kedua antioksidan tersebut dilakukan sesaat sebelum bufer ekstrak digunakan. Ekstraksi dengan pelarut dilakukan tiga kali masing-masing dengan kloroform:isoamilalkohol (24:1), fenol:

kloroform:isoamilalkohol (24:1), dan kloroform : isoamilalkohol (24:1). Ekstraksi pertama dilakukan bersamaan dengan tahapan inkubasi  $65^{\circ}\text{C}$  selama 1 jam. Sedangkan sentrifugasi dilakukan sedikit lebih kuat yaitu pada 12000 g selama 20 menit atau 15000 g selama 15 menit.

#### *PCR spesifik dengan template RNA total (RT-PCR)*

RNA total yang digunakan dalam RT-PCR memiliki kualitas baik, yaitu tidak terdegradasi dan kemurnian tinggi, rasio A260/A280 1,6 and A260/A230 1,0 atau lebih besar. Reaksi RT-PCR dilakukan dengan pendekatan *one tube reaction*, transkripsi balik dengan amplifikasi dikerjakan dalam satu tabung mikro 0,5 mL. Kondisi reaksi dipilih sesuai dengan rekomendasi dalam *User Manual* dari *DuraScript RT-PCR kit* (Sigma *Biological Cat. no.* HSRT-20). Asam nukleat hasil amplifikasi dielektroforesis menggunakan gel agarosa 1,4%.

#### *Analisis Southern blot*

Sebagai pengganti pelacak berlabel isotop  $^{32}\text{P}$ , pelacak berlabel non-radioaktif digunakan dalam metode deteksi ini. Untuk pelabelan dan deteksi digunakan kit dari Amersham Biosciences (Piscataway, NJ-USA). Produk PCR spesifik dilabel langsung dengan salah satu komponen kit tersebut. Probe berlabel yang diperoleh dapat langsung digunakan atau disimpan selama 6 bulan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ . Deteksi dilakukan dengan autografi menggunakan film sinar-x dengan waktu *exposure* optimum memberikan signal yang kuat namun dengan latar belakang yang rendah. Waktu optimum ini biasanya antara 2 menit hingga beberapa jam. Film diproses sesuai dengan prosedur standard, inkubasi dalam larutan pengem-

bang selama 1–3 menit. Setelah sisa pengembangan dibilas dengan air ledeng, film difiksasi dalam larutan fiksasi (*fixer*) selama 1 menit atau lebih. Film dikering-anginkan dan tidak boleh dipegang selama masih basah.

**Hasil dan Pembahasan**

*Analisis sekuen nukleotida dari gen penyandi 21kDa protein biji kakao*

Untuk mengetahui daerah terkonservasi telah dilakukan analisis kesamaan majemuk (*multiple alignment*) terhadap sekuen asam amino polipeptida target dengan program komputer Clustal-W 18.1 (Higgins *et al.*,

1994). Hasil analisis perbandingan dengan lima spesies atau klon yang paling mirip, ditampilkan pada Gambar 1. Uji kesamaan ini menunjukkan bahwa setelah asam amino ke 30 dari polipeptida 21-kDa memiliki tingkat kesamaan yang tinggi dengan proteinase inhibitor beberapa klon spesies tanaman.

Dua daerah sekuen asam amino terkonservasi yang digunakan sebagai dasar untuk membuat primer adalah VLDTDG untuk primer ke depan (*forward*) dan SDDLNG serta CSDIGR untuk dua primer ke balik (*reverse*). Ketiga daerah ini masing-masing terletak pada posisi asam amino nomor 31-36, 78-83, dan 180-185 dari protein 21 kDa tersebut. Sekuen ini

21kDa	MKTATAVLLLF AFTSKSYFFGVANAANS PVLDTDGDELQ TGVQYYV LSSISGAGGGGLA	60
TcIT	-----VLDTDGDELQ TGVQYYV LSSISGAGGGGLA	30
TaIT	-----VLDTDGDELRTGVQYYV VSTIWAGGGGLD	30
TsIT	-----VLDTDGDELRTGVQYYV VSSIWGAGGGGLA	30
HmIT	-----VLDTDGDELRTGVQYYI VSSIWGAGGGGVA	30
	*****:*****:*: * *****:	
21kDa	LGRATGQSCPEI VVQRRS DLDNGT PVI FSNADSKDDVVRVST DVNIEFVPIRDLRCSTST	120
TcIT	LGRATGQSCPEI VVQRRS DLDNGT PVI FSNADSKDDVVRVST DVNIEFVPIRDLRCSTST	90
TaIT	LGRATNQKCP EI VVQRRS DLDNGT PVI FSNADSEDDVVRVST DINIEFVPIRDLRCSTST	90
TsIT	LGRATDQKCP EI VVQRRS DLDNGT PVI FSNADSEDDVVRVST DINIEFVPIRDLRCSTST	90
HmIT	LGRTSGQSCPEI VVQRRS DLDNGT PVI FSNADSEDDVVRVST DLNIEFVPIRDLRCSTST	90
	***.:.*.*****:*****:*.*****:*****:***	
21kDa	VWRLDNYDNSAGKWWVTTDGVKGE PGPNTLCSWFKIEKAGVLGYKFRFCPSVCDSCCTTLC	180
TcIT	VWRLDNYDNSAGKWWVTTDGVKGE PGPNTLCSWFKIEKAGVLGYKFRFCPSVCDSCCTTLC	150
TaIT	VWKLDDYDNSAGKWWVTTDGVKGE PGPNTLSNWFKIEEAGGTLYKFRFCPSVCDSCATLC	150
TsIT	VWKLDDYDNSAGKWWVTTDGVKGE PGPNTLSWFKIEEAGGTVYKFRFCPSVCDSCATLC	150
HmIT	VWKLDDYDNSAGKWWVTTDGVKGE PGPNTLSWFKIEHAGAIGHTLKFCPSVCDSCCTTLC	150
	**:**:**:*****:*.**.:* .*****.** :.:*****:***	
21kDa	SDIGRHSDDDGQIRLALS DNEWAMF K KASKTIKQVVNAKH	221
TcIT	SDIG-----	154
TaIT	SDIG-----	154
TsIT	SDIG-----	154
HmIT	SDIG-----	154
	***_	

Gambar 1. Peta homologi asam amino polipeptida biji kakao 21-kDa dan beberapa inhibitor protease (IT) dari spesies tanaman yang diperoleh dari *database* menggunakan BLASTP 2.2.6 (Altschul *et al.*, 1997) dengan program Clustal-W (Higgins *et al.*, 1994).

Figure 1. Homology amino acid polypeptide map from 21-kDa cocoa seed and several protease inhibitor (IT) of species plant from BLAST 2.2.6(Altschul *et al.*, 1997) with Clustal-W programme (Higgins *et al.*, 1994).

*Pengembangan pelacak DNA spesifik gen melalui bioinformatika...*

didegenerasi menjadi sekuen nukleotida dan akan menghasilkan berbagai kombinasi pasangan primer degenerasi. Untuk mengefisienkan pemilihan pasangan primer yang terbaik, atau yang akan dapat memberikan amplifikasi yang kuat dan konsisten, berbagai kemungkinan pasangan primer tersebut dicocokkan dengan sekuen nukleotida dari gen referensi (*entry*) penyandi protein 21 kDa (Tai *et al.*, 1991). Selain itu, langkah ini ditempuh karena gen target berasal dari spesies yang sama dengan gen referensi. Dengan demikian pasangan primer yang digunakan adalah memiliki sukuen sebagaimana pada Tabel 1 dengan kandungan GC 50% dan Tm yang hampir sama.

*Asam nukleat jaringan kakao*

Data DNA dan RNA hasil isolasi dengan prosedur sebagaimana diuraikan dalam bahan dan metoda disajikan pada Gambar 2. Hasil pengujian spektrofotometri (data tidak ditampilkan) maupun elektroforesis menunjukkan bahwa baik DNA maupun RNA yang dihasilkan memiliki kualitas yang baik, tidak terdegradasi dan kemurniannya cukup tinggi. Dengan demikian gangguan pemurnian asam nukleat oleh metabolit sekunder yang terdapat pada jaringan tanaman kakao, seperti *mucilage*

dan senyawa polifenolik, dapat diatasi dengan prosedur preparasi tersebut. Prosedur ini memiliki reproduibilitas yang tinggi, percobaan ulangan hampir selalu memberikan hasil yang konsisten.

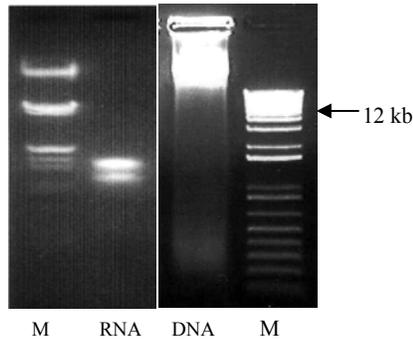
*Deteksi gen pada DNA genomik dengan PCR menggunakan pelacak spesifik*

Adanya gen pada genom suatu organisme dapat dideteksi menggunakan pelacak spesifik. Dalam penelitian ini gen target adalah gen penyandi protein 21 kDa yang diekspresikan pada biji kakao (Tai *et al.*, 1991). Memeriksa adanya DNA genomik yang diisolasi dari daun kakao menggunakan PCR dengan pelacak yang diharapkan spesifik untuk gen tersebut, yaitu berupa pasangan primer DNA. Pengujian dengan prosedur deteksi ini memberikan hasil positif yang meyakinkan. Dengan pasangan primer FR1, PCR menghasilkan amplicon yang intensitasnya sangat kuat (Gambar 3). Keyakinan bahwa amplicon merupakan hasil amplifikasi spesifik diperkuat dengan hasil dari pemakaian primer balik kedua (*nested*) atau pasangan primer FR2. PCR dengan pasangan primer balik kedua lebih rendah Amplicon memiliki ukuran yang sama dengan ukuran yang diprediksi dari sekuen cDNA. Ini meng-

Tabel 1. Sekuen dan posisi asam amino dan nukleotida daerah terkonservasi dari peptida 21-kDa

*Table 1. Sequen and position of amino acid nucleotide and conserved from 21-kDa peptide*

Asam amino <i>Amino acid</i>	Primer Nukleotida <i>Nucleotide primer</i>	Tm, °C
VLDTDG	Forward 120: 5' -GTGCTTGACACTGATGGT-3'	56,0
SDLNNG	Reverse 279: 5' -ACCATTGTCAAGGTCGGA-3'	55,5
CSDIGR	Reverse 586: 5' -GTCTTCCAATATCGCTGC-3'	57,0



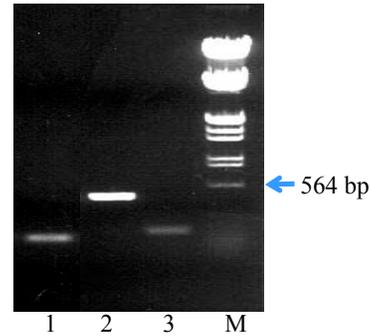
Gambar 2. Profil elektroforesis DNA genomik dari jaringan daun (kanan) dan RNA total dari biji (kiri) kakao

Figure 2. Genomic DNA electrophoresis profile from leaf culture (right), and total RNA from seed cacao (left)

mengindikasikan bahwa daerah DNA yang diapit oleh pasangan primer tidak memiliki intron atau intron yang relatif sangat kecil.

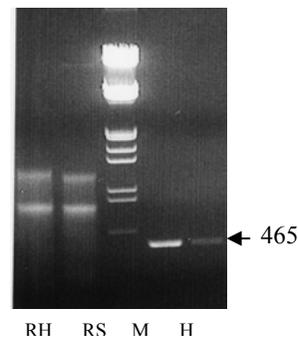
*Pengujian ekspresi gen dengan RT-PCR menggunakan primer spesifik*

RNA total biji kakao diisolasi dari dua klon yang satu (klon H) diharapkan mengekspresikan protein 21-kDa lebih tinggi dari yang lainnya (klon S). RNA total yang kualitasnya baik digunakan dalam uji coba metoda RT-PCR menggunakan primer spesifik 21-kDa. Gambar 4. profil elektroforesis hasil RT-PCR menunjukkan adanya amplifikasi diferensial antara kedua klon kakao tersebut. Klon H menghasilkan ampikon yang pada gel elektroforesis memberikan intensitas yang kuat daripada klon S. Ini mengindikasikan bahwa klon H mengekspresikan gen 21-kDa lebih banyak daripada klon S. Data ekspresi diferensial, khususnya transkripsi ini sejalan dengan yang diperkirakan. Implikasinya, pelacak spesifik gen 21-kDa dapat digunakan untuk menentukan tingkat ekspresi gen tersebut



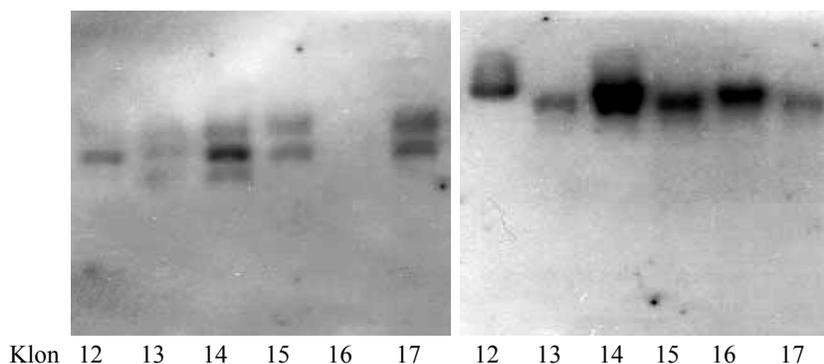
Gambar 3. PCR DNA dengan dua pasangan primer FRI dan *nested* FR2. Lini 1-M adalah PCR dengan primer *nested*, primer spesifik, kontrol positif, dan Marker  $\lambda$ -HindIII + EcoRI

Figure 3. PCR DNA with two pairs of FRI primer and FR2 nested. Line 1-M is a PCR with nested primer, specific primer, positive control and  $\lambda$ -HindIII + EcoRI Marker



Gambar 4. PCR RNA (RT-PCR) dua klon kakao yang berbeda. RH, RS, M, H, dan S adalah RNA total klon H, klon S, Marker  $\lambda$ -HindIII + EcoRI, RT-PCR klon H, dan klon S

Figure 4. PCR RNA (RT-PCR) is a different clones RH, RS, M, H, and S is total RNA H clone, S clone,  $\lambda$ -HindIII + EcoRI Marker, RT-PCR H clone, and S clone



Gambar 5. *Southern blot* DNA kakao menggunakan pelacak 21-kDa berlabel non-radio-isotop. (panel kiri). DNA genomik didigesti dengan *EcoRI* dan *HindIII* (panel kanan).

Figure 5. Southern blot cacao DNA probe 21-kDa with non-radioisotope label (left panel). Digested genomic DNA with *EcoRI* and *HindIII* (right panel)

#### *Pelacakan gen dengan Southern blotting*

Deteksi gen dengan pelacak spesifik dapat dilakukan melalui hibridisasi spesifik. Pendekatan yang disebut *Southern blot* ini memerlukan adanya pelacak berlabel. Untuk pelacak berlabel non-radioaktif, fragmen DNA hasil PCR spesifik ditempel dengan label dengan prosedur sebagaimana diuraikan dalam Manual Pengguna. Hibridisasi antara DNA template yang terfiksasi pada membran nilon dengan pelacak berlabel dilakukan pada suhu 58 – 60°C selama semalam. Hasil autoradiografi membran setelah hibridisasi ditampilkan pada Gambar 5. Radiogram tersebut menunjukkan beberapa hal. Pertama, pendeteksian gen pada DNA genomik beberapa klon kakao dapat dilakukan dengan baik menggunakan pendekatan *Southern blot* dengan pelacak yang berlabel non-radioisotop. Selain ini, empat klon kakao yang diuji menunjukkan pola pita yang variatif. Variasi ini kemungkinan karena klon kakao secara genetik memang bervariasi. Sebagaimana

diketahui bahwa bahan tanam kakao yang ditanam pada perkebunan di Indonesia umumnya berasal dari biji. Konsekuensinya, terjadi variasi genetik yang tinggi.

#### **Kesimpulan**

Pelacak DNA spesifik gen dapat dibuat dengan memanfaatkan kemajuan bioinformatika yang diikuti dengan pengujian PCR terhadap primer pelacak hasil rancangan. Uji coba gen penyandi salah satu protein biji ukuran 21 kDa pada asam nukleat tanaman kakao memberikan hasil yang positif.

#### **Ucapan Terima Kasih**

Penelitian ini dibiayai oleh pemerintah Indonesia melalui proyek riset kompetitif *Indonesian International Joint Research Grand Program* atau Riset Unggulan Terpadu International (RUTI) II.

## Daftar Pustaka

- Altschul, Stephen F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, & D. J. Lipman (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3389-3402.
- Asif, M.H., P. Dhawan & P. Nath (2000). A Simple procedure for the isolation of high quality RNA from ripening banana fruit. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **18**, 109-115.
- Coen, E.S., J.M. Romero, R. Elliot, G. Murphy & R. Carpenter (1990). *FLORICAULA*: a homeotic gene required for lower development in *Antirrhinum*. *Cell*, **63**, 1311-1322.
- Couch, J.A. & P.J. Fritz (1990). Isolation of DNA from plant high in polyphenolics. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **8(1)**, 8-12.
- Heuvel, J.V. (2001). Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and Other PCR Procedures. <http://www.crcpress.com/catalog/3344.htm>.
- Higgins D., Thompson J., Gibson T., Thompson J.D., Higgins D.G. & Gibson T.J (1994) CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4673-4680.
- Khanuja, S.P.S., A.K. Shasany, M.P. Darokar & S. Kumar (1999). Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **17**, 1-7.
- Minarsih, H., D. Santoso, & N. Fitrianti (2001). Identification of *P5CS* gene in sugarcane using PCR with heterologous marker. *Menara Perkebunan*, 69(1) (in press)
- Santoso, D. (1995). 5-Fluoroorotic acid-selected cell lines and regulation of UMP synthase gene expression in tobacco cells. PhD dissertation, Ames, Iowa. Iowa State University.
- Southerton, S.G., S.H. Strauss, M.R. Olive, R.L. Harcourt, V. Decroocq, X. Zhu, D.J. Llewellyn, W.J. Peacock & E.S. Dennis (1998). Eucalyptus has a functional equivalent of the Arabidopsis floral meristem identity gene *LEAFY*. *Plant Mol. Biol.*, **37**, 897-910.
- Tai, H., I. McHenry, P.J. Fritz & D.B. Furtak (1991). Nucleic acid sequence of a 21 kDa cocoa seed protein with homology to the soybean trypsin inhibitor (Kunitz) family of protease inhibitors. *Plant Mol. Biol.*, **16**, 913-915.
- Watzinger, F. E. Horth & T. Lion (2001). Quantification of mRNA expression by competitive PCR using non-homologous competitors containing a shifted restriction site. *Nucl Acids Res.*, **29**, 1-10.
- Weigel, D., J. Alvarez, D.R. Smyth & M.F. Yanofsky (1992). *LEAFY* controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell* **69**, 843-859.