

Sintesis Protein Selama Embriogenesis Somatik Anggrek Bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.)

Protein synthesis during somatic embryogenesis of moon orchid *Phalaenopsis amabilis* (L.) BI.

EDY SETITI WIDA UTAMI^{1,*}, ISSIREP SOEMARDI², TARYONO³, ENDANG SEMIARTI⁴

¹Laboratorium Biologi Reproduksi, Fakultas MIPA Universitas Airlangga, Surabaya 60286

²Laboratorium Anatomi Tumbuhan, Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta 55281

³Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan, Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta 55281

⁴Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan, Fakultas Biologi UGM Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta 55281

Diterima: 03 Januari 2007. Disetujui: 04 April 2007

ABSTRACT

Research to analyse protein synthesis during somatic embryogenesis of moon orchid *Phalaenopsis amabilis* (L.) BI has been carried out. One year old of plantlets were used as explants sources. Basal leaf of these explants were cultured in medium New Phalaenopsis (NP) added with 2mg/L NAA during 1 day (P₁), 2 days (P₂), 4 days (P₃), 6 days (P₄), 8 days (P₅). The explants were cultured in medium NP without NAA were used as control, during 1 day (K₁), 2 days (K₂), 4 days (K₃), 6 days (K₄), 8 days (K₅). Analysis of the protein synthesis was observed by electrophoresis using SDS-PAGE method according to Maniatis *et al.* (1982). The measuring of protein bands used the densitometer. To detect the specific protein which possible function in controlling embryogenesis by comparing profiles of leaf protein which cultured at NP media added NAA and without NAA. The analyses of protein profile were done at the culture of day 1, 2, 4, 6 and 8 after inoculating. Result of the research indicated that a protein of 14 kDa was detected in the explants were cultured in medium NP added NAA only, and it was not detected in explants were cultured in medium NP without NAA. This protein probably embryonic protein has a function to control embryogenic callus initiation. A protein of 16 kDa was detected in the explants were cultured in medium NP added NAA and without NAA. This protein is possibly siklin has a function to regulation of cells proliferation during embryogenesis.

© 2007 Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta

Key words: *Phalaenopsis amabilis* (L.) BI, protein synthesis, SDS-PAGE

PENDAHULUAN

Setiap tahap stadium perkembangan tumbuhan secara genetik dikontrol dan dikendalikan oleh gen (Lyndon, 1990; Fosket, 1994). Selama terjadinya pertumbuhan dan perkembangan, gen-gen terekspresi pada tempat dan waktu tertentu sehingga tumbuhan dapat melangsungkan metabolisme yang diperlukan dalam siklus hidupnya. Bentuk ekspresi gen adalah protein (baik protein fungsional, protein struktural maupun protein cadangan/protein simpanan), yang dibentuk melalui proses transkripsi dan translasi (Fosket, 1994). Protein hasil ekspresi gen tersebut menentukan karakter tumbuhan pada setiap tahap perkembangannya.

Beberapa gen dan protein yang bertanggung jawab pada tahap tertentu dari perkembangan tumbuhan telah berhasil diidentifikasi. Gen SAUR (Small Auxin-Up RNA) yang mengkode protein 9-10 kDa bertanggung jawab pada pembelahan dan pemanjangan sel pada organ yang baru tumbuh (Li *et al.*, 1994). Gen SAUR tersebut berperan sebagai promotor yang selanjutnya mengaktifkan gen-gen lain dalam mensintesis protein, seperti protein siklin dan

ekspanin. Protein siklin dengan berat molekul 16-25 kDa bertanggung jawab dalam pembelahan sel (Fukuda *et al.*, 1994; Ferreira *et al.*, 1994; Taiz & Zeiger., 1998). Menurut John *et al.*, (1993, dalam Taiz dan Zeiger, 1998), protein siklin mengatur transisi dari fase G1 ke S dan dari G2 ke mitosis selama terjadinya siklus sel. Pada tumbuhan, protein tersebut terekspresi pada sel yang dikultur secara *in vitro* (Fukuda *et al.*, 1994). Ekspanin adalah protein dengan berat molekul 25-26 kDa berperan dalam pemanjangan sel (Cosgrove, 1997; Zhang & Hanestain, 2000). Protein tersebut telah diidentifikasi pada akar dan hipokotil beberapa tanaman yang sedang tumbuh seperti pada *Arabidopsis*, *Oryza* dan *Triticum* (Schich & Cosgrove, 1998 dalam Zhang & Hanestain, 2000; Cosgrove, 1998).

Ekspresi suatu gen selain dipengaruhi oleh faktor internal juga dipengaruhi oleh lingkungan, seperti cahaya, nutrisi, air, pH, dan auksin eksogen. Ekspresi gen SAUR yang mengontrol pemanjangan hipokotil kedelai (Gee *et al.*, 1991) dan tropisme pada tembakau (Li *et al.*, 1991) dipengaruhi oleh auksin eksogen dan cahaya. Ekspresi gen yang mengontrol embriogenesis somatik dipengaruhi oleh beberapa faktor. Faktor-faktor dimaksud adalah pH, suhu, perlakuan mekanis, penambahan ion-ion tertentu, dan zat pengatur tumbuh (ZPT) auksin (Raghavan, 1997). Perubahan-perubahan berupa stress karena pemberian suhu tinggi dan rendah, pengirisan, dan pemberian auksin eksogen berlebihan diduga mampu membuat sel-sel menjadi kompeten untuk menginduksi signal pengaturan

▼ Alamat Korespondensi:

Jl. Airlangga no. 4-6 Surabaya
Telp.: +62-031.5342557. Faks. +62-031.5032557
Email : eddysetiti@unair.ac.id

kembali ekspresi gen baru atau dapat juga menggantinya dengan program embriogenik diikuti embriogenesis somatik (Lo *et al.*, 1989 dalam Arnold *et al.*, 2002).

Untuk mengidentifikasi produk gen yang secara selektif dihasilkan selama embriogenesis dapat dilakukan dengan membandingkan pita protein yang terbentuk melalui pemisahan elektroforesis. Metode elektroforesis protein dengan *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) merupakan salah satu metode untuk menganalisis protein dengan memisahkan pita-pita protein yang ada di dalam sampel berdasarkan berat molekulnya.

Dari penelitian-penelitian sebelumnya tentang embriogenesis somatik anggrek bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl sampai saat ini belum ada penelitian tentang sintesis protein selama embriogenesis somatik anggrek bulan spesies *P. amabilis* (L.) Bl. Pendekatan dengan elektroforesis SDS-PAGE dan analisis densitometer digunakan untuk melihat profil protein selama embriogenesis dari eksplan daun yang dikultur pada media New Phalaenopsis (NP) diberi perlakuan ZPT NAA dengan variasi lama waktu kultur.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini menggunakan tanaman anggrek bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl yang diperoleh dari Pusat Angrek Royal Orchid, Prigen, Jawa Timur. Eksplan yang dipakai adalah bagian pangkal helaian daun urutan ke 2 dari pucuk. Eksplan diperoleh dari *plantlet* hasil kultur *in vitro* biji umur 12 bulan. Bahan kimia penyusun media New Phalaenopsis (NP), zat pengatur tumbuh auksin yaitu α -Naphthalenacetic Acid (NAA).

Ekstraksi protein dilakukan dengan cara segmen pangkal daun yang telah dikultur pada media NP ditambah 2 mg/L NAA pada kultur umur 1 hari (P₁), 2 hari (P₂), 4 hari (P₃), 6 hari (P₄), 8 hari (P₅), dan pada media NP tanpa NAA (kontrol) pada kultur umur 1 hari (K₁), 2 hari (K₂), 4 hari (K₃), 6 hari (K₄), 8 hari (K₅) setelah inokulasi masing-masing ditambah 300 μ L *Phosphate Buffer Saline* (PBS) (Na Cl 8,55 g/L, Na₂ HPO₄.2H₂O 1,33 g/L, Na H₂ PO₄. H₂O 0,34 g/L) pH 7 sebagai bufer ekstraksi dan ditambah *inhibitor protease* kemudian digerus menggunakan mortar dan *pestle* sampai homogen. Sampel disentrifugasi 13.000 rpm selama 2 detik. Supernatan diambil dan disimpan pada suhu 20°C.

Setelah *crude protein* diperoleh, dilakukan pengukuran konsentrasi protein pada masing-masing sampel. Konsentrasi protein ditentukan dengan menggunakan metode Bio-rad (*Bio-rad assay*). *Bovine Serum Albumin* (BSA) digunakan sebagai standar untuk menghitung konsentrasi protein. Sebagai blangko digunakan 200 μ L *Bio-rad dye* dan 800 μ L akuades. Penentuan konsentrasi protein dilakukan dengan cara sebagai berikut. Sampel protein sebanyak 2 μ L ditambah 200 μ L *Bio-rad dye* dan 798 μ L akuades kemudian dicampur dengan cara diresuspensi, selanjutnya dimasukkan ke dalam spektrofotometer pada *optical density* (OD) 595 nm. Konsentrasi protein diketahui melalui persamaan fungsi kurva baku standar protein BSA.

Penentuan berat molekul (BM) protein dilakukan melalui metode SDS-PAGE menurut Maniatis *et al.* (1982). Urutan metode tersebut adalah sebagai berikut. *Resolving gel* 12% (akuades 3,3 mL, poliakrilamid 4 mL, 1,5 M Tris pH 8,8 2,5 mL, 10% SDS 100 μ L, *tetramethylen diamine* 10 μ L, 10% *ammonium persulphate* 90 μ L) dimasukkan ke

dalam pasangan plat kaca dan ditunggu beberapa saat sampai gel terpolarisasi. *Stacking gel* 6% (akuades 2,6 mL, poliakrilamid 1 mL, 0,5 M Tris pH 6,8 1,15 mL, 10% SDS 50 μ L, *tetramethylen diamine* 10 μ L, 10% *ammonium persulphate* 90 μ L) dimasukkan di atas *resolving gel* dan dipasang sisir untuk membuat sumuran tempat memasukkan sampel protein. Setelah *stacking gel* berpolarisasi, gel dilepas dari cetakkannya dan plat dirangkai dengan aparatus elektroforesis. *Running buffer* 0,1% (akuades 1L, Tris Base 15 g, glisin 72 g, SDS 5 g) dituang ke dalam bak dan sisir dilepas. Mengambil 10 μ g sampel protein dicampur dengan 2 μ L sampel buffer. Untuk marker, diambil 10 μ L marker protein (*Fermentas*) dicampur dengan 2 μ L sampel buffer. Semua larutan dipanaskan dalam air mendidih selama 2 menit dan secepatnya didinginkan dalam pecahan es. Selanjutnya larutan sampel protein dan marker protein dimasukkan ke dalam sumuran pada gel (gel akrilamid 12%). Elektroforesis pada 100 volt dilakukan selama 1,5 sampai 2,5 jam. Pita protein dengan berat molekul lebih besar akan terbentuk lebih dekat dengan tempat awal pemisahan. Pewarnaan (*staining*) pita protein dilakukan dengan jalan merendam gel hasil elektroforesis (setelah dilepas dari rangkaian plat) dalam larutan 0,10% *Coomasie brilliant blue* semalam. Setelah diwarnai, dilakukan *destaining* untuk menghilangkan kelebihan warna dengan jalan merendam gel dalam larutan *destaining* (50 mL akuades, 40 mL metanol, 10 mL asam asetat glasial) hingga gel menjadi jernih dengan pita terpisah jelas satu sama lainnya. Gel kemudian disimpan dalam 10 % asam asetat glasial selanjutnya dikeringkan. Pita protein yang terbentuk dalam gel setelah elektroforesis ditentukan berat molekulnya (kDa).

Pengukuran luas area pita protein menggunakan densitometer dengan panjang gelombang 560 nm. Deteksi protein spesifik yang mungkin berperan dalam mengontrol embriogenesis dilakukan dengan cara membandingkan profil protein daun yang dikultur pada media NP + NAA dan tanpa NAA. Analisis dilakukan pada kultur umur 1, 2, 4, 6 dan 8 hari setelah inokulasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dalam penelitian ini ditemukan bahwa zat pengatur tumbuh auksin α -Naphthalenacetic Acid (NAA) mempengaruhi sintesis protein daun anggrek bulan *P. amabilis* (L.) Bl. Hal ini diketahui dari hasil analisis profil protein menggunakan elektroforesis SDS-PAGE dan densitometer diketahui bahwa daun *P. amabilis* (L.) Bl yang dikultur pada media NP diberi NAA 2 mg/L pada kultur umur 1, 2, 4, 6 dan 8 setelah inokulasi berbeda dengan daun yang dikultur pada media NP tanpa NAA (Gambar 1. dan Gambar 2; Tabel 1. dan Tabel 2.).

Pada perlakuan dengan NAA tampak terbentuk pita protein yang lebih banyak dibanding dengan kontrol. Hasil elektroforesis pada gambar 1 dan hasil perhitungan dengan densitometer pada tabel 1 tampak bahwa daun yang dikultur pada media NP diberi NAA 2 mg/L terlihat terbentuknya pita protein baru pada hari ke-2 setelah inokulasi. Pita protein baru tersebut tidak dijumpai pada kontrol (Gambar. 2.; Tabel. 2.), dan setelah dibandingkan dengan protein standart (*marker*) diketahui BM protein tersebut sekitar 14 kDa. Sintesis protein berukuran 14 kDa ini kemunculannya menyerupai sintesis protein pada kultur daun *Chichorium* yang terbentuk setelah hari ke-2 kultur dan selama 5 hari periode induksi sel mesofil telah mendapatkan kompetensi embriogenik. Protein tersebut

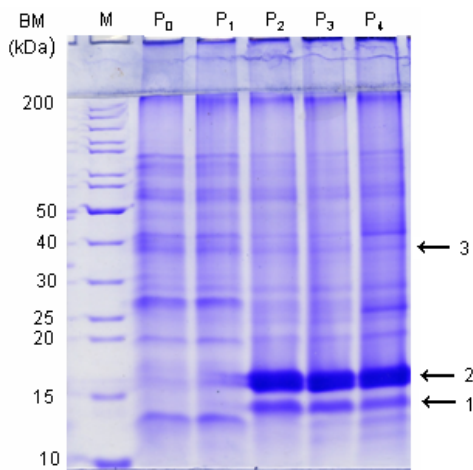
Tabel 1. Luas area pita (mv.mm) protein daun *Ph amabilis* (L.) BL pada perlakuan dengan variasi lama waktu kultur

Perlakuan	Luas area pita protein (mv.mm), dengan berat molekul (kDa)									
	79	59	44	39	27	19	16	14	13	11
P0	11.029	16.905	10.134	15.323	22.971	12.382	17.651	-	22.447	4.798
P1	5.879	8.073	10.253	17.539	18.251	10.657	22.331	5.376	21.196	4.048
P2	8.142	13.403	8.131	10.228	10.340	7.870	116.551	32.591	1.618	3.669
P3	3.667	5.348	8.032	10.082	14.569	12.382	125.391	24.532	5.941	2.108
P4	8.220	11.424	11.986	10.068	34.911	16.935	132.990	22.321	11.347	5.856

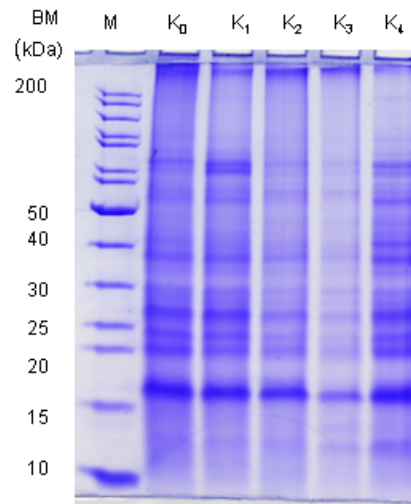
Tabel 2. Luas area pita (mv.mm) protein daun *Ph amabilis* (L.) BL pada kontrol dengan variasi lama waktu kultur

Kontrol	Luas area pita protein (mv.mm), dengan berat molekul (kDa)									
	79	59	44	39	27	19	16	14	13	11
K0	15.667	22.812	24.972	30.470	57.535	32.656	88.718	-	17.280	31.698
K1	18.442	13.725	15.147	35.103	41.154	24.281	71.923	-	16.050	31.698
K2	11.971	5.531	7.519	10.741	16.383	15.903	43.915	-	7.433	12.592
K3	3.736	5.915	5.012	12.716	5.216	15.512	21.567	-	6.487	9.283
K4	12.443	13.534	27.428	22.375	42.999	28.392	67.689	-	8.419	39.492

pada *Chichorium* sebagai protein embrionik (Boyer *et al.*, 1993 dalam Raghavan, 1997). Protein embrionik berukuran 40-44 kDa juga ditemukan pada kalus embriogenik padi (Chen dan Luthe, 1987 dalam Raghavan, 1997), sehingga protein berukuran 14 kDa yang ditemukan dalam penelitian ini diduga sebagai protein embrionik seperti yang dijumpai pada kultur daun *Chichorium* dan kalus embriogenik padi. Pernyataan Sung dan Okimoto, (1981, dalam Raghavan, 1997) bahwa sintesis protein embrionik sebagai penanda diinduksinya kalus embriogenik yang diikuti embriogenesis somatik dipicu oleh auksin memperkuat bahwa protein dengan BM 14 kDa adalah protein embrionik, karena pembentukan kalus embriogenik dan pembentukan embrio somatik hanya terjadi pada daun yang dikultur pada media NP diberi NAA. Hal inilah yang menyebabkan jumlah pita protein daun yang dikultur pada media NP diberi NAA lebih banyak dibanding pita protein daun yang dikultur pada media NP tanpa NAA, sedangkan pita protein yang terbentuk pada daun yang dikultur tanpa NAA sejak hari ke-1 setelah inokulasi sampai hari ke-8 setelah inokulasi tidak mengalami penambahan jumlah pita protein (Gambar 2.), karena pada daun tersebut selain tidak menunjukkan terbentuknya pita protein dengan ukuran 14 kDa, secara visual juga tidak terbentuk kalus embriogenik



Gambar 1. Profil protein daun *Phalaenopsis amabilis* (L.) BL pada perlakuan (P) dengan 0, 5, 10, 15 dan 20 hari kultur. M = Marker; P₀ = 0 hari; P₁ = 5 hari; P₂ = 10 hari; P₃ = 15 hari; P₄ = 20 hari. Tanda panah 1 = protein baru yang terbentuk karena perlakuan ZPT NAA (14 kDa); 2 = protein yang ketebalan dan luas areanya mengalami peningkatan (16 kDa); 3 = protein yang luas areanya mengalami penurunan (39 kDa).



Gambar 2. Profil protein daun *Phalaenopsis amabilis* (L.) BL pada kontrol (K) dengan 0, 5, 10, 15 dan 20 hari kultur. M = Marker; K₀ = 0 hari; K₁ = 5 hari; K₂ = 10 hari; K₃ = 15 hari; K₄ = 20 hari.

Dari hasil penelitian sebelumnya, pengamatan menggunakan disektng mikroskop menunjukkan bahwa tanda-tanda pembentukan kalus embriogenik baru tampak sekitar 22 hari setelah eksplan ditanam dalam media NP + NAA, ternyata berdasarkan hasil elektroforesis dan perhitungan densitometer pita protein berukuran 14 kDa yang merupakan protein penanda awal terjadinya embriogenesis tersebut telah muncul pada hari ke dua setelah inokulasi dengan luas area 5.376 mv.mm. Ini menunjukkan bahwa tanda-tanda terjadinya embriogenesis dapat terdeteksi lebih awal dengan menggunakan metode elektroforesis SDS-PAGE dibanding dengan cara pengamatan secara visual terhadap pembentukan kalus embriogenik. Berdasarkan hasil perhitungan dengan densitometer, protein yang terbentuk pada hari ke-2 setelah inokulasi tersebut mempunyai luas area 5.376 mv.mm. Sintesis protein tersebut mencapai puncak (32.591 mv.mm) pada kultur umur 4 hari setelah inokulasi, yang kemudian densitasnya menurun sejalan dengan lamanya waktu kultur *in vitro* yaitu menjadi 24.532 mv.mm pada hari ke-6 setelah inokulasi dan 22.321 mv.mm pada hari ke-8 setelah inokulasi. Hal ini kemungkinan protein tersebut diperlukan pada fase 2 - 4 hari kultur untuk pembentukan kalus embriogenik.

Pada Gambar 1. dan 2. serta Tabel 1. dapat dilihat bahwa daun anggrek bulan yang dikultur pada media NP + NAA 2 mg/L selain tersusun dari pita protein yang lebih banyak dibanding kontrol (tanpa NAA), ketebalan dan luas area pita proteinnya juga berubah seiring dengan lamanya waktu kultur. Semakin lama waktu kultur ketebalan dan luas area protein ada yang meningkat dan ada yang menurun. Sintesis protein berukuran 16 kDa meningkat terus. Pada hari ke-1 sebesar 17.651 mv.mm, berikutnya pada hari ke-2 setelah inokulasi sebesar 22.331 mv.mm kemudian pada hari ke-4 setelah inokulasi menjadi 116.551 mv.mm, selanjutnya pada hari ke-6 setelah inokulasi 125.391 mv.mm dan meningkat lagi menjadi 132.990 mv.mm pada hari ke-8 setelah inokulasi. Hal ini kemungkinan protein tersebut diperlukan terus untuk proliferasi. Sintesis protein berukuran sekitar 16 kDa ini kemunculannya menyerupai sintesis protein siklin berukuran 16-25 kDa yang bertanggung jawab dalam pembelahan sel. Hal ini didukung Fukuda *et al.*, 1994 yang menyatakan bahwa protein tersebut terekspresi pada sel yang dikultur secara *in vitro*. Dudits *et al.*, (1995) dalam Arnold *et al.*, (2002) menjelaskan bahwa faktor eksternal yaitu pemberian ZPT secara eksogen seperti auksin berperan penting dalam reaktivasi siklus sel. Auksin mampu mengaktifasi sinyal transduksi sehingga sel dapat mengadakan pemrograman kembali ekspresi gen dan menginduksi pembelahan sel.

Pada hari ke-2 setelah inokulasi muncul pita tebal protein berukuran 39 kDa yang semakin lama terlihat semakin menipis. Sintesis protein tersebut mencapai puncak dengan luas area (17.539 mv.mm) terjadi pada hari ke-2 setelah inokulasi, yang semakin lama terlihat semakin menipis. Pada hari ke-4 luas area pita protein tersebut turun menjadi 10.228 mv.mm, kemudian turun kembali menjadi 10.082 mv.mm pada hari ke-6 setelah inokulasi, dan selanjutnya pada hari ke-8 menjadi 10.068 mv.mm. Hal ini menunjukkan sintesis protein tersebut sangat diperlukan pada hari ke-2, kemudian terdegradasi dengan bertambahnya waktu kultur.

KESIMPULAN

Perlakuan α -Naphthalenacetic Acid (NAA) setelah dua hari kultur dapat menginduksi sintesis protein baru dengan berat molekul 14 kDa. Protein tersebut diduga merupakan protein embrionik yaitu sebagai protein penanda awal

terjadinya embriogenesis somatik. Sintesis protein berukuran 16 kDa meningkat terus, protein tersebut kemungkinan berperan dalam memacu terjadinya proliferasi sel selama embriogenesis. Protein berukuran 39 kDa, luas area dan tebalnya semakin menurun seiring dengan lamanya waktu kultur.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terima kasih disampaikan kepada Pimpinan Proyek DUE-Like Batch III Universitas Airlangga yang telah membiayai penelitian ini melalui kompetisi Riset Grant, dan semua pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian maupun penulisan ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Arnold, S.V., I. Sabala, P. Bozhlov, J. Dyachok, and L. Filonova. 2002. Developmental Pathway of Somatic Embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 69: 233-249.
- Chen, L.J., and D.S. Luthe. 1987. Analysis of proteins from embryogenic non-embryogenic rice (*Oryza sativa* L.) calli. *Plant Sci*. 48: 181-188.
- Cosgrove, D.J. 1997. Relaxation in a High-Stress Environment. The Molecular Bases of Extensible Cell Walls and Cell Enlargement. *Plant Cell*. 9: 1031- 1041
- Cosgrove, D.J. 1998. Cell Walls Lossening by Expansins. *Plant Physiol*. 118: 333-339
- Ferreira, P., A.S. Hemery, E.J. Almeida, M.M. Van, G. Engler, and D. Inze. 1994. Developmental Expression of the *Arabidopsis* Cyclin Gene *cycA*. *Plant Cell*. 6: 1763-1774.
- Fosket, D.E. 1994. *Plant Growth and Development a Molecular Approach*. Academic Press. New York, London, Sydney. p.298-331
- Fukuda, H., M. Ito, M. Sugiyama, and A. Komamine. 1994. Mechanism of The Proliferation & Differentiation of Plant Cells in Cell Culture System. *J. Dev Biology*. 38:287
- Gee, M.A., G. Hagen, and T.J. Guilfoyle. 1991. Tissue-Specific and Organ-Specific Expression of Soybean Auxin-Responsive Transcripts GH3 and SAURs. *The Plant Cell*. 3: 419-430.
- Li, Y., Z.B. Liu, X. Shi, G. Hagen, and T.J. Guilfoyle. 1994. An Auxin Inducible Element in Soybean SAUR Promoters. *Plant Physiol*. 106: 37-43.
- Lyndon, R.F. 1990. *Plant Development The Cellular Basis*. Unwin Hyman. London, Boston, Sydney. p. 190-200.
- Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. *Molecular Cloning*. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Printed in the United States of America. 173-175.
- Raghavan, V. 1997. *Molecular Embryology of Flowering Plants*. Cambridge University Press. p. 394-439
- Taiz, L., and E. Zeiger. 1998. *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Inc. Publishers
- Zhang, N., and K.H. Hanestain. 2000. Distribution of Expansins in Gravidresponding Maize Roots. *Plant Cell Physiol*. 41(12): 1305-1312