

ISOLASI cDNA SUCROSE TRANSPORTER (SUT) DARI BATANG TANAMAN TEBU (*Saccharum officinarum* L.)

Slameto¹⁾, Bambang Sugiharto²⁾

¹⁾ Fakultas Pertanian UNEJ, ²⁾ Fakultas MIPA UNEJ

ABSTRACT

Sucrose Transporter (SUT) is kind of protein transporter that control in sucrose translocation. Sucrose Transporter is intermediate in translocation of sucrose from apoplasmic to simplasmic. SUT facilitates sucrose transportation from vascular tissues to parenchyma cells toward in node sugarcane stem. This research was purposed to isolate cDNA SUT from sugarcane stem, and cloned in *Escherichia coli* strain DH5 α . Total RNA of sugarcane stem was isolated by single step method, then add with oligo dT in order to obtain the first strand of SUT cDNA then used as template for PCR. The primer used for PCR is 5' -ggg ctg att gtg gcc atg tc- '3 (SUT-F) and 5' -tgc cct ttg tct ccg gaa cc- '3 (SUT-R). PCR was programmed as follow denaturation at 94°C for 2 minutes and 30 second, annealing at 54°C for 30 s, extension at 72°C 2 min and 7 min, and storage at 4°C for unlimited, It was for 30 cycles. Complementary DNA SUT from PCR ligalized to pTOPO bunt-end, then it cloned in to *E. coli* strain DH5 α . The cloning resulted then be sequenced in order to observe the homologues with other nucleotides sequences of some plant using BLASTn program in GENE BANK NCBI and the level of homology determined by Genetyx program. The concentrated of total RNA isolated was 5,024 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, with purity of 1,85. Complementary DNA SUT fragment from PCR with size 2037 bp appropriated to the both of primer was used. Complementary DNA SUT fragment showed by analyzed some of restriction enzyme e.g. EcoRI, PstI and BamHI. Homologues of this cDNA SUT fragment was 100% to SoSUT 2A of sugarcane stem and 84% to OsSUT of rice plant (Casu *et al.* , 2003).

Key words : cDNA, *Escherichia coli*, PCR, Sucrose Transporter, sugarcane

ABSTRAK

Sucrose Transporter (SUT) merupakan protein transporter yang mengontrol translokasi sukrosa. Sukrosa transporter adalah perantara dalam translokasi sukrosa dari apoplasmic ke simplasmic. SUT memfasilitasi transport sukrosa dari jaringan pembuluh ke sel-sel parenkim nodus batang tebu. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi cDNA SUT dari batang tebu, dan melakukan kloning ke dalam *E. coli* strain DH5 α . RNA total batang tebu diisolasi dengan metode *single step*, kemudian ditambahkan oligo dT untuk memperoleh untai pertama cDNA SUT yang akan digunakan sebagai template untuk PCR. Primer untuk PCR adalah 'att GTG CTG-GGG tc-3 (SUT-F) dan 5 gcc ATG' 5 CCT-TGC TCT ttg CCG GAA cc-3 (SUT-R). PCR diprogram sebagai berikut: denaturasi pada suhu 94 ° C selama 2 menit 30 detik, annealing pada 54 ° C selama 30 detik, ekstensi pada suhu 72 ° C 2 menit dan 7 menit, dan penyimpanan pada 4 ° C selama waktu yang tak terbatas, program tersebut dilakukan untuk 30 siklus. Komplemen SUT DNA dari PCR diligasi dengan pTOPO-end bunt, kemudian dikloningkan dengan *E. coli* strain DH5 α . Kloning yang dihasilkan kemudian dihomologikan dengan pasangan nukleotida beberapa tanaman menggunakan program BLASTn di BANK GEN NCBI dan diukur tingkat homologinya dengan program Genetyx. Isolasi RNA total diperoleh konsentrasi 5.024 mg / μl , dengan kemurnian 1,85. Komplemen SUT fragmen DNA dari PCR dengan ukuran 2037 bp sesuai dengan kedua primer yang digunakan. Komplemen fragmen DNA SUT ditunjukkan oleh hasil analisis beberapa enzim restriksi misalnya EcoRI, PstI dan BamHI. Fragmen cDNA SUT hasil isolasi dari batang tebu memiliki homologi 100% dengan SoSUT 2a (AY165599.1) dan 84% dengan OsSUT (NM001052894.1) (Casu *et al.*, 2003).

Kata kunci: cDNA, *Escherichia coli*, PCR, transporter Sukrosa, tebu.

PENDAHULUAN

Tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.) merupakan tanaman yang tumbuh baik di daerah tropis, yang berperan sebagai penghasil gula. Tanaman ini mampu memproduksi biomasa dalam jumlah yang sangat besar dengan kandungan sukrosa yang cukup besar. Batang tanaman tebu dapat mengakumulasi sukrosa 12-16% dari berat basah dan 50% dari berat kering merupakan sukrosa (Casu *et al.*, 2002). Akumulasi sukrosa dalam batang tebu merupakan metabolisme yang kompleks (Whittaker and Botha, 1997), walaupun sampai sekarang telah banyak kajian tentang enzim yang terlibat dalam metabolisme gula pada tanaman tebu tetapi belum diperoleh hasil yang memuaskan untuk menjelaskan fungsi enzimatik yang membatasi akumulasi sukrosa (Grof dan Campbell, 2001; Rohwer dan Botha, 2001). Sampai sekarang telah banyak kajian tentang enzim yang terlibat dalam metabolisme gula pada tanaman tebu seperti SPS dan Invertase, tetapi belum banyak diketahui bagaimana mekanisme transport sukrosa dari source (daun) ke sink (batang) (Grof dan Campbell, 2001; Rohwer dan Botha, 2001). Protein SUT berfungsi dalam translokasi sukrosa melalui floem terutama dalam kapasitas pengambilan sukrosa yang tinggi. Berdasarkan analisis filogenetik, sucrose transporter dan sucrose transporter like protein terbagi dalam tiga famili, yaitu SUT1, SUT2, dan SUT4 (Barker *et al.*, 2000). Dalam setiap tanaman bisa teridentifikasi lebih dari satu jenis SUT, seperti pada jeruk teridentifikasi dua jenis SUT yaitu CitSUT1 dan CitSUT2 (Li *et al.*, 2003). Menurut Kuhn *et al.* (2003), klasifikasi SUT ke dalam tiga famili ini berdasarkan homologi sekuennya, afinitas substrat, dan fungsi masing-masing SUT. SUT1 mempunyai afinitas yang tinggi tetapi kapasitas transportnya rendah, sebaliknya SUT4 mempunyai afinitas yang rendah dengan kapasitas transport yang tinggi. SUT2 terbagi dalam dua subgroup, yang terdapat pada tanaman monokotil maupun dikotil. SUT2 ini mempunyai afinitas dan kapasitas transport yang sangat rendah, bahkan hampir tidak terdeteksi adanya aktivitas transport. Sementara SUT3 hanya terdapat dalam tembakau, dan menurut sekuen homologinya termasuk dalam famili SUT1 (Kuhn *et al.*, 1999). Biosintesis sukrosa melalui transport gen sucrose transporter

(SUT) yang bertanggung jawab dalam pengangkutan utama dari sukrosa untuk pembentukan karbohidrat melalui proses fotosintesis (Lemoine *et al.*, 1999). Protein SUT sebagai perantara dalam translokasi sukrosa, keberadaannya diregulasi oleh DNA SUT. Isolasi cDNA SUT *full size* memungkinkan dilakukan analisis ekspresi gen tersebut yang selanjutnya diharapkan dapat digunakan untuk manipulasi transport sukrosa pada tanaman tebu. Mengingat fungsinya yang sangat besar dalam transport sukrosa maka gen SUT dapat dijadikan target penting untuk penelitian. Untuk mendapatkan cDNA SUT *full size* diperlukan isolasi fragment cDNA yang selanjutnya akan digunakan sebagai kajian lebih lanjut dalam isolasi DNA SUT *full size*.

BAHAN DAN METODE

Total RNA diisolasi dari 5 gram batang tanaman tebu varietas R579, dengan menggunakan metode *single step* (Chomczynski and Sacchi, 1987). Primer untuk PCR didesain berdasarkan daerah konservatif dari SoSUT (*Saccharum officinarum* Sucrose Transporter) dengan nomor aksesori AY165599.1 dan OsSUT (*Oryza sativa* Sucrose Transporter) dengan nomor aksesori NM00105294.1; dari GENE BANK. Kedua susunan basa nukleotida tersebut dihomologikan dengan program Genetyx versi 3.0, sehingga diperoleh sekuensi primer forward 5'gggctgattggccatgctc'3 (SUT 10F) dan primer reverse 5'tgccctttgtctccggaacc'3 (SUT 7R). Primer sequencing untuk memperoleh sekuensi sepanjang 2000bp dibutuhkan empat buah primer yaitu primer forward 5'gggctgattggccatgctc'3 (SUT 10F) dan 5'gatggctgtcagcaagggc'3 (SUT6F) untuk primer reverse 5'aaatttgacagtatgatcag'3 (SUT 5R) dan 5'tgccctttgtctccggaacc'3 (SUT 7R).

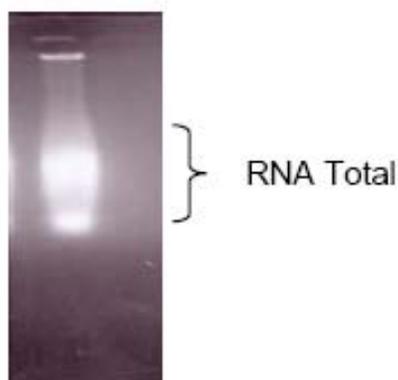
Total RNA diisolasi dari 5 gram batang tanaman tebu varietas R579, dengan menggunakan metode *single step* (Chomczynski and Sacchi, 1987). Primer untuk PCR didesain berdasarkan daerah konservatif dari SoSUT (*Saccharum officinarum* Sucrose Transporter) dengan nomor aksesori AY165599.1 dan OsSUT (*Oryza sativa* Sucrose Transporter) dengan nomor aksesori NM00105294.1; dari GENE BANK. Kedua susunan basa nukleotida tersebut dihomologikan

dengan program Genetyx versi 3.0, sehingga diperoleh sekuensi primer forward 5'gggctgattgtggccatgc'3 (SUT 10F) dan primer reverse 5' tgcctttgtctccggaacc '3 (SUT 7R). Primer sequencing untuk memperoleh sekuensi sepanjang 2000bp dibutuhkan empat buah primer yaitu primer forward 5'gggctgattgtggccatgc'3 (SUT 10F) dan 5'gatggctgtcagcaaaggc'3 (SUT6F) untuk primer reverse 5'aaattgacagtagatcag'3 (SUT 5R) dan 5'tgccctttgtctccggaacc'3 (SUT 7R). Proses PCR menggunakan cetakan firts strand cDNA yang diperoleh dari penambahan oligo dT pada total RNA. Isolasi DNA dari gel dilakukan dengan menggunakan metode ekstraksi phenol (Sambrook *et al.*,1989). Kompeten sel dibuat dengan metode CaCl₂ (Sambrook *et al.*, 1989). Koloni tunggal DH5a ditumbuhkan dalam 2 ml LB cair dengan penggojokan pada suhu 37°C selama 16 jam. Starter bakteri diambil 1 ml dan dibiakkan dalam 50 ml LB cair dengan penggojokan sampai OD600 = 0,6-0,9. Ligasi cDNA dengan Vektor pTOPO blunt-end dilakukan dengan menggunakan satu kali reaksi ligasi yang mempunyai total volume 20 µl, dengan komposisi 1 µl vektor pTOPO blund-end, 3µl cetakan DNA (hasil PCR), 10 µl 2X rapid buffer, 4 µl aquadest steril, 2 µl T4 DNA ligase. Reaksi tersebut diinkubasi pada suhu 16°C selama 12-16 jam. Selanjutnya hasil ligasi ditransformasi dengan menggunakan sel kompeten *E. coli* DH5a. DNA plasmid hasil transformasi kemudian diisolasi (minipreparasi) dari beberapa koloni

rekombinan (yang disisipi fragmen cDNA SUT), dipilih secara acak berdasarkan blue white selection (Sambrook *et al.*, 1989). Keberhasilan ligasi dianalisis dengan memotong plasmid DNA dengan beberapa enzim restriksi yaitu EcoRI, PstI, BamHI, SacI, HindIII, dan Xho. Dengan komposisi reaksi terdiri atas 3 µl DNA pTOPO blunt-end SUT, 1 µl 10X buffer H, 4 µl H₂O, 1 µl enzim restriksi, 1 µl RNase. Penentuan sekuensi kode genetik fragmen cDNA SUT hasil isolasi dilakukan dengan DNA sequenser ABI PRISM Mode 310 version 3.0 Big Day Terminator di lembaga Eijkman Jakarta. Sekuensi yang diperoleh, dibandingkan dengan data yang ada di database NCBI dengan menggunakan program BLASTn, selanjutnya data sekuensi dari NCBI tersebut dihomologikan dengan tanaman lain menggunakan program Genetyx versi 3.0.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Konsentrasi total RNA dari batang tebu yang diisolasi melalui metode single step dengan menggunakan guanidium tiosianat-phenol-chloroform (Chomczynski and Sacchi, 1987) adalah sebesar 5,024 µg/µl dengan kemurnian 1,85. Kemurnian RNA dihitung melalui perbandingan nilai absorbansi sampel RNA pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Kualitas total RNA diuji dengan cara mengelektroforesisnya pada 1% gel agarose (Gambar 1).



Gambar 1. Hasil elektroforesis 5µl sampel total RNA batang tebu pada 1% gel Agarose

Isolasi total RNA dengan menggunakan buffer homogenisasi guanidium tiosianat merupakan suatu metode yang secara efisien dilakukan untuk jaringan yang tidak mudah difraksinasi atau dari sel yang kaya dengan RNase. Metode isolasi total RNA ini menggunakan agen-agen khaotropik yang akan menunjukkan hasil dan kualitas RNA yang secara konsisten tinggi (Sambrook *et al.*, 1989). Hasil isolasi total RNA yang diperoleh tergantung pada keadaan jaringan dan adanya kontaminasi selama berlangsungnya isolasi RNA. Faktor lain yang sangat berpengaruh terhadap tingkat keberhasilan isolasi RNA adalah kesesuaian antara metode dengan sampel tanaman yang diisolasi.

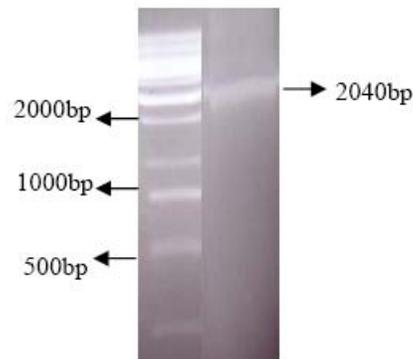
Hasil beberapa penelitian diantaranya yang dilakukan oleh Mary *et al.*, (1997) dengan mengisolasi RNA dari buah blackcurrent (*Ribes nigrum* L.) dengan metode phenol tidak dapat dideteksi dalam elektroforesis gel agarose. Tesneire and Vayda (1991) juga melaporkan bahwa isolasi RNA pada daun dengan metode perendaman jaringan dan homogenisasi buffer dapat menghasilkan kualitas RNA yang baik sedangkan pada buahnya kualitas RNA yang diperoleh sangat rendah. Kemurnian RNA hasil isolasi dapat ditingkatkan dengan beberapa cara, diantaranya dengan menambahkan senyawa atau larutan tertentu selama proses isolasi. Penambahan 0,5% sarkosil pada buffer ekstraksi dapat meminimalkan terjadinya kontaminasi oleh RNase (David *et al.*, 1998). Penambahan 2-mercaptoethanol dapat menghilangkan polifenol (Mehtar *et al.*, 2001). Venugopalan dan Kapoor (1997) menyatakan bahwa presipitasi dengan menggunakan sec-butanol dapat menghasilkan kemurnian RNA lebih tinggi 7-21% dibanding dengan isopropanol. Pencucian dengan 75% ethanol sebanyak 2 kali pada metode ini dapat membantu menghilangkan kontaminasi. Lucotte and Baneyx (1993) menyatakan bahwa sample RNA yang murni memiliki rasio absorbansi (A260/A280) sebesar 1,8. Menurut Mehtar *et al.* (2000) rasio absorbansi RNA yang memiliki kemurnian tinggi berkisar antara 1,8-2,0.

Kemurnian RNA merupakan indikator kualitas RNA yang diperoleh. Perlakuan dalam isolasi RNA perlu memperhatikan tingginya sensitifitas terhadap ribonuklease (RNase), yang secara endogenous RNase terdapat dalam

organisme atau mungkin terkontaminasi dari luar. Penggunaan bahan-bahan isolasi RNA yang mengandung detergen, seperti sarkosil atau penyimpanan dalam keadaan presipitasi ethanol pada suhu -200C diharapkan dapat meminimalkan aktifitas RNase dan mendenaturasi RNase. Kontaminasi oleh DNA dihilangkan dengan mengulang presipitasi atau pemberian DNase sehingga kemurnian RNA meningkat. Pemberian DNase pada sampel total RNA dapat mendenaturasi kontaminan berupa DNA genomik (Baelde *et al.*, 2001). Primer adalah sekuensi basa dengan panjang tertentu yang diperlukan untuk mengawali amplifikasi pada proses PCR. Pada penelitian ini, primer forward dan reverse didesain dari daerah konservatif pada SoSUT 2A (nomor aksesori AY165599.1), OsSUT (nomor aksesori NM001052894.1). Homologi ketiga jenis sekuensi SUT tersebut dapat diketahui daerah konservatif yang memungkinkan untuk mendesain primer dengan tanda bintang, sehingga sekuensi basa di antara kedua primer dapat teramplifikasi. Urutan asam amino yang digunakan untuk mendesain primer adalah GLIVAMS untuk forward (10F); RWLVSKGR untuk forward (6F) dan QILQQFAG untuk reverse (5R); MGKTEPV untuk reverse (7R). Keempat urutan asam amino tersebut dapat diturunkan menjadi urutan basa nukleotida 5'GGGCTGATTGTGGCCATGTC'3 untuk primer forward (SUT 10F) pada posisi 232 dan 5'GATGGCTTGTCAGCAAAGGGC'3 untuk primer forward (SUT 6F) pada posisi 665 serta 5'AAATTTGACAGTATGATCAG'3 untuk primer reverse (SUT 5R) pada posisi 1078 dan 5'TGCCCTTTGTCTCCGGAACC'3 untuk primer reverse (SUT 7R) pada posisi 2269, berdasarkan posisinya pada SoSUT 2A batang (AY165599) (Casu *et al.*, 2003). Masing-masing primer, forward dan reverse mempunyai GC sebesar 50% dan 60%. Bustin (2000) menyatakan bahwa ukuran optimal untuk primer adalah 15-20 basa nukleotida, dengan kandungan GC antara 20% dan 70%. Desain primer mengandung basa nukleotida secara acak untuk menghindari sekuensi AT dan GC yang berulang. Hal tersebut untuk menghindari adanya struktur sekunder yang mengakibatkan amplifikasi band tidak spesifik. Titik cair primer perlu diperhitungkan dalam desain primer, karena berkaitan dengan suhu annealing dalam proses

PCR. Primer SUT-10F mempunyai titik cair 64°C dan SUT-7R mempunyai titik cair 64°C. Menurut Bustin (2000), titik cair primer spesifik adalah antara 55°C dan 75°C, berdasarkan kandungan AT dan GC. Cetakan yang digunakan untuk PCR pada penelitian ini adalah first strand cDNA, yang diperoleh dari proses reverse transkripsi dengan penambahan enzim yang diisolasi dari avian myeloblastosis virus (AMV). Enzim ini memiliki kemampuan dalam mensintesis DNA (yang diketahui sebagai complementary DNA atau cDNA) dari cetakan mRNA. Molekul yang biasanya dipakai sebagai awal sintesis cDNA adalah oligo dT, karena molekul ini dapat

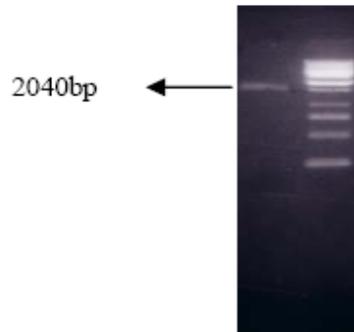
membentuk hybrid dengan poli A dari ujung 3' dari cetakan RNA (Lucotte and Baneyx, 1993). Inkubasi dilakukan pada suhu 42 °C selama 60 menit pada penelitian ini untuk pembuatan first strand cDNA. Hasil penelitian Brook *et al.* (1995) menyatakan bahwa temperatur tidak boleh melebihi 60°C karena dapat menonaktifkan avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (AMV-RT). Reaksi PCR menggunakan cetakan first strand cDNA sebanyak 5 µl. Hasil PCR dielektroforesis pada 1% gel agarose. Satu pita DNA terlihat pada hasil elektroforesis yang diperkirakan mempunyai ukuran 2000 bp sesuai dengan jarak kedua primer (10F dan 7R).



Gambar 2. A. Hasil elektroforesis PCR yang dicat dengan Ethidium Bromide, menggunakan primer SUT-F dan SUT-R, pada 1 % gel agarose. PCR diprogram pada suhu 94 °C (2 menit dan 30 detik), 54 °C (30 detik), 72 °C (2 menit dan 7 menit), 4 °C (tak terhingga), sebanyak 30 siklus. M adalah Marker 1 KB Plus DNA Ladder ; A adalah cDNA SUT batang tebu B. Hasil elektroforesis Isolasi DNA dengan metode Ekstraksi Pheno pada 1% gel agarose yang dicat dengan Ethidium Bromide

Fragmen cDNA batang tebu dari hasil PCR diisolasi dengan cara memotong gel yang terlihat pita DNA, selanjutnya DNA diekstraksi dengan phenol (Sambrook *et al.*, 1989). Hasil isolasi DNA dielektroforesis pada 1% gel agarose.

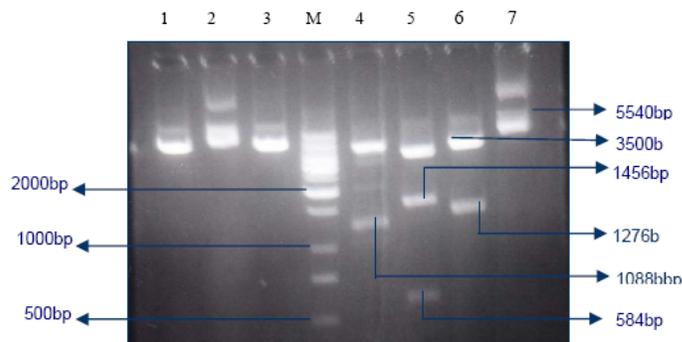
Fragmen cDNA batang tebu dengan penambahan T4 DNA ligase, kemudian diligasi ke plasmid vektor pTOPO blunt-end. Reaksi ligasi tidak semuanya berupa molekul rekombinan, juga molekul vektor yang tidak terligasi.



Gambar 3. Hasil elektroforesis Isolasi DNA dengan metode Ekstraksi Phenol pada 1% gel agarose yang dicat dengan Ethidium Bromide.

Penggunaan enzim restriksi dalam analisis DNA rekombinan diharapkan dapat membuktikan keberhasilan kloning cDNA SUT. Plasmid DNA yang mengandung DNA target dipotong dengan beberapa enzim restriksi untuk membuktikan

apakah kloning cDNA SUT batang tebu ke pTOPO blunt end berhasil dan dielektroforesis pada 1% gel agarose, hasilnya dapat disajikan pada Gambar 4.



Gambar 4. Hasil elektroforesis analisis enzim restriksi pada 1% gel agarose; 1. Adalah SacI, 2. adalah HindIII, 3. adalah Xho, 4. adalah PstI, 5. adalah EcoRI, 6. adalah BamHI, 7. adalah kontrol (cDNA SUT – pTOPO blunt-end tidak dipotong dengan enzim restriksi)

Hasil sekuensi menunjukkan bahwa cDNA SUT yang diperoleh dari proses kloning mempunyai ukuran 2040 bp. Ukuran cDNA SUT ini sesuai dengan jarak antara primer SUT 10F dan SUT 7R yang digunakan dalam proses PCR. Hasil sekuensi selanjutnya dihomologikan dengan SUT tanaman lain melalui program BLASTn NCBI dan tingkat homologinya ditentukan melalui program Genetyx versi 3.0. Berdasarkan hasil homologi tersebut dapat diketahui bahwa cDNA SUT batang tebu memiliki homologi 100% dengan SoSUT 2a (AY165599.1) dan 84% dengan OsSUT (NM001052894.1). Fragmen cDNA SUT yang diperoleh dari hasil sekuensi menunjukkan mempunyai ukuran 2040 bp dan mempunyai urutan basa-basa nukleotida sesuai

dengan cDNA SUT yang diharapkan. Berdasarkan prosentase homologi melalui program BLASTn NCBI dapat diketahui bahwa fragmen cDNA SUT batang tebu terdapat dalam SoSUT 2a (AY165599.1) dan OsSUT (NM001052894.1) asal padi. Sekuensi fragmen cDNA SUT dihomologikan dengan SoSUT 2a (AY165599.1) pada posisi sekuensi 232-2272. Penyisipan fragmen cDNA SUT batang tebu yang berukuran 2040 bp pada vektor pTOPO blunt end dengan ukuran 3500 bp, menghasilkan sekuensi berukuran 5540 bp. Posisi enzim-enzim restriksi dalam vektor pTOPO blunt end dan fragmen cDNA SUT batang tebu dapat ditentukan berdasarkan basa nukleotida pengenalnya. Fragmen cDNA SUT batang tebu mempunyai titik

potong EcoRI, PstI dan BamHI masing-masing pada pada posisi 1456 bp, 952 bp, 764 bp.

KESIMPULAN

1. Kloning fragmen cDNA SUT dari batang tebu dalam vektor kloning pTOPO blunt-end dan sel inang *E.coli* strain DH5 α menghasilkan fragmen cDNA SUT dengan ukuran 2040 bp sesuai jarak dua primer yang dipakai dalam PCR.
2. Fragmen cDNA SUT hasil isolasi dari batang tebu memiliki homologi 100% dengan SoSUT 2a (AY165599.1) dan 84% dengan OsSUT (NM001052894.1).

PUSTAKA

- Baelde, HJ, A-M Cleton-Jansen, H van Beerendonk, M Namba, JVMG Bovee and PCW Hogendoorn. 2001. High Quality RNA Isolation from tumours With Low Cellularity and High Extracellular matrix Component for cDNA Microarrays: Application to Chondrosarcoma. *J. Clin. Pathol.* 54:778-782.
- Barker, L., C. Kuhn, A. Weise, A. Schulz, C. Gebhardt, B. Himer, H. Helimann, W. Schulze, J.M. Ward, and W.B. Frommer. 2000. SUT2, a Putative Sucrose Sensor in Sieve Elements. *J. The Plant Cell* 12. 1153-1164.
- Brook, E. M., L. G. Sheflin and S.W. Spaulding. 1995. Secondary Structure in the 3' UTR of EGF and the Choice of Reverse Transcriptase Affect the Detection of Message Diversity by RT-PCR. *Biotechniques.* 19: 737-742.
- Bustin, S. A. 2000. Absolute Quantification of mRNA Using Real-Time Revers Transcription Polymerase Chain Reaction Assays. *Molecular Endocrinology.* 25: 169-193.
- Casu, R.E., Grof, C.P.L., Rae, A.L., McIntyre, C.L., Dimmock, C.M., and Manners, J.M. 2003. Identification of a novel sugar transporter homologue strongly expressed in maturing stem vascular tissues of sugarcane by expressed sequence tag and microarray analysis. *Plant Mol. Biol.* 10:1-16.
- Casu, R.E, C.P.L. Grof, A.L. Rae, C.L. McIntyre, C.M. Dimmock, and J.M. Manners. 2003. Identification of a Novel Sugar Transporter Homologue Strongly Expressed in Maturing Stem Vascular Tissues of Sugarcane by Expressed Sequence Tag and Microarray Analysis. *Plant Molecular Biology* 0:1-16. Kluwer Academic Publishers.
- Chomczynski, P and Sacchi, N. 1987. Single Step Methode of RNA Isolation by Acid Guanidium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal Biochem.* 162: 156-159.
- Grof CPL., and Campbell JA., 2001, Sugarcane sucrose metabolism;scope for molecular manipulation . *Aust J Plant Physiol.* 28:1-12.
- Koch, K. 2004. Sucrose Metabolism: Regulatory Mechanism and Pivotal Roles in Sugar Sensing and Plant Development. *Plant Biology.* 7:235-246.
- Kuhn, C, L. Barker, L. Burkle, and W.B. Frommer. 1999. Update on Sucrose Transport in Higher Plants. *Journal of Experimental Botany,* Vol. 50:935-953. Oxford University Press.
- Kuhn, C. 2003. A Comparison of the Sucrose Transporter System of Different Plant Species. *Plant Biology.* 5: 215-232.
- Lemoine, R, L. Burkle, L. Barker, Soulaïman S, C. Kuhn, Matthieu R, Cecile G, Serge D, and W.B. Frommer. 1999. Identification of a Pollen-Specific Transporter-Like Protein NtSUT3 from Tobacco. *FEBS Letters* 454:325-330.
- Li CH, JX Shi, D. Weiss, and EE. Goldschmidt. 2003. Sugars Regulate Sucrose Transporter Gene Expression in Citrus. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 306:402-407.
- Lucotte, B, and Baneyx, F. 1993. Introduction to Molecular Cloning Techniques. VCH Publishers, Inc.
- Mary, W., T. A. Mark, and D. V. Howard. 1997. Isolation of RNA from Blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) Fruit. *Molecular Biology.* 13: 56-60.
- Mehar, H. A., P. Dhawan and P. Nath. 2000. A Simple Procedure for the Isolation of High

Quality RNA from Ripening Banana Fruit. *Plant Molecular Biology Reporter*. 18: 109-115. Rohwer, J.M. and Botha, F.C. 2001, Analysis of sucrose accumulation in the sugarcane culm on the basis of in vitro kinetic data. *Biochem. J.* 358:437-445.

Whittaker A. and F.C. Botha (1999) Pyrophosphate:D-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase activity patterns in relation to sucrose storage across sugarcane varieties. *Physiol Plant*. 107:379-386.