

## Transformasi Plasmid pTRLI ke dalam Protoplas *Aspergillus terreus* dengan Penambahan Polietilenglikol

### (Plasmid of pTRLI Transformation into *Aspergillus terreus* Protoplast with Polyethylenglycol)

DUDI HARDIANTO<sup>1,2\*</sup>, MARLIA SINGGIH<sup>2</sup>, AMIR MUSADAD<sup>2</sup>,  
WAHONO SUMARYONO<sup>1</sup>, TUTUS GUSDINAR<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Balai Pengkajian Bioteknologi, BPPT, G.360 Building, Kawasan Puspiptek, Tangerang

<sup>2</sup>Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung, Labtek VII Building, Ganesha 10, Bandung

Diterima 29 Agustus 2011, Disetujui 24 November 2011

**Abstrak:** Transformasi plasmid merupakan proses masuknya plasmid ke dalam protoplas atau sel inang yang mengakibatkan perubahan materi genetika. Tujuan dari penelitian untuk mentransformasi plasmid pTRLI ke dalam protoplas *Aspergillus terreus* dan menentukan stabilitas transforman. Penelitian diawali dengan isolasi plasmid pTRLI, penentuan kemurnian dan konsentrasi plasmid pTRLI dengan menggunakan serapan pada panjang gelombang 260 dan 280 nm dari alat *nanodrop*. Kemudian, protoplas *A. terreus* diisolasi secara enzimatis dengan enzim kitinase, selulase, dan maserosim. pTRLI ditransformasi ke dalam protoplas *A. terreus* dengan penambahan kalsium klorida dan polietilenglikol. Transforman ditumbuhkan dalam media *Czapek-Dox agar* yang mengandung pirithiamin 1 mg/L. Jumlah transforman yang dapat tumbuh antara 12 sampai 19 transforman/ $\mu$ g plasmid pTRLI. Transforman dideteksi dengan mengamplifikasi gen *ptrA* yang berukuran 801 pb. Dari penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa PEG dapat digunakan untuk mentransformasi plasmid pTRLI ke dalam protoplas *A. terreus* dan transforman stabil sampai generasi ke-5.

**Kata kunci:** transformasi plasmid, plasmid pTRLI, protoplas, *Aspergillus terreus*.

**Abstract:** Plasmid transformation is the introduction and incorporation of exogenous plasmid into cells or protoplast. The purpose of this research is transformation of pTRLI plasmid into protoplasts of *Aspergillus terreus* and obtain stable transformants. The research was initiated by isolation of pTRLI plasmid and determining its purity and concentration by *nanodrop* machine. Furthermore, protoplasts of *A. terreus* were isolated enzymatically by addition of chitinase, cellulase, and maserozyme enzymes. pTRLI plasmid was transformed into protoplasts of *A. terreus* by addition of calcium chloride and polyethyleneglycol (PEG) solutions. These transformants were grown in *Czapek-Dox* agar medium containing pyriithiamine 1 mg/L and the number of transformants/ $\mu$ g of pTRLI plasmid was calculated. The number of transformants were produced ranging from 12 to 19 transformants/ $\mu$ g of pTRLI plasmid. The success of the transformation was indicated by *ptrA* gene in transformants that could be amplified by PCR of 801 base pairs in size. It was concluded that PEG solution could be used to transform pTRLI plasmid into protoplasts of *A. terreus* and transformants are stable up to five generations by growing the transformants in *Czapek-Dox* agar medium containing pyriithiamine 1 mg/L.

**Keywords:** transformation plasmid, pTRLI plasmid, protoplast, *Aspergillus terreus*.

#### PENDAHULUAN

*ASPERGILLUS terreus* merupakan kapang yang tumbuh di tanah, kompos, dan dapat juga sebagai

kontaminan pada produk jagung dan kacang. Kapang ini menghasilkan beberapa metabolit sekunder seperti lovastatin yang digunakan sebagai obat antikolesterol dan asam itakonat (*itaconic acid*) yang dapat digunakan sebagai bahan polimer<sup>(1,2)</sup>.

Transformasi plasmid adalah proses masuknya plasmid ke dalam protoplas atau sel inang yang

\* Penulis korespondensi, Hp. 081514166610  
e-mail: dudihd@gmail.com

mengakibatkan perubahan materi genetika. Transformasi plasmid pada kapang dapat dilakukan menggunakan protoplas dengan penambahan polietilenglikol (PEG), elektroporasi, transformasi dengan bantuan *Agrobacterium tumefaciens*, dan particle bombardment. Transformasi protoplas dengan penambahan PEG digunakan pada penelitian ini untuk mentransformasikan plasmid pTRLI ke dalam protoplas *A. terreus*. Beberapa kapang yang telah berhasil ditransformasi menggunakan transformasi protoplas dengan penambahan PEG adalah *Penicillium chrysogenum*<sup>(3)</sup>, *Laccaria laccata*<sup>(4)</sup>, *Monascus purpureus*<sup>(5)</sup>, *Neurospora crassa*, *Aspergillus oryzae*<sup>(6)</sup>, *Aspergillus nidulans*<sup>(7,8)</sup>, *Trichoderma reesei*<sup>(9)</sup>, *Penicillium griseoreum*<sup>(10)</sup>, *Aspergillus paraticus*<sup>(11)</sup>, dan *Aspergillus flavus*<sup>(12)</sup>.

Untuk membedakan sel yang mengalami transformasi dan yang tidak mengalami transformasi digunakan penanda seleksi (disandi oleh suatu gen dan dibawa oleh vektor atau plasmid). Ada dua cara mendeteksi keberhasilan transformasi yang digunakan untuk kapang, yaitu<sup>(12,13)</sup>: dengan penanda resistensi dan penanda konversi mutan auktotrof menjadi prototrof. Penanda resistensi yang digunakan adalah resistensi terhadap benomil (gen *benA*), pleomisin (gen *ble*), higromisin (gen *hph*), dan piritamin (gen *ptrA*). Sedangkan penanda konversi mutan auktotrof menjadi prototrof antara lain meliputi kemampuan mengubah nitrat menjadi nitrit (gen *niaD*), kemampuan untuk mensintesis pirimidin (gen *pyr4*), dan kemampuan untuk mensintesis arginin (gen *argB*). Pada penelitian ini digunakan penanda resistensi terhadap piritamin. Transforman akan tumbuh dalam medium seleksi *Czapex-Dox agar* yang mengandung piritamin karena plasmid pTRLI mengandung gen *ptrA* yang mampu menggunakan piritamin sebagai pengganti tiamin.

Tujuan dari penelitian ini adalah mentransformasi plasmid pTRLI, yaitu plasmid pTRI yang mempunyai sisipan gen *lovE* (gen yang berperan sebagai regulator dalam biosintesis lovastatin) ke dalam protoplas *A. terreus* dan mendapatkan transforman yang stabil.

#### BAHAN DAN METODE

**BAHAN.** Mikroorganisme yang digunakan adalah *Aspergillus terreus* dan *Echericia coli DH5a* yang mengandung plasmid pTRLI koleksi dari Balai Pengkajian Bioteknologi, BPPT, ekstrak ragi (Difco), ekstrak malt (Oxoid), pepton (Oxoid), glukosa (Difco), agar bakteriologikal (Oxoid), piritamin (Sigma), air bebas DNase dan RNase (MPBio), PDA (Oxoid), *Czapex-Dox* (Oxoid), ampicilin (Sigma), *HindIII* (Fermentas), ladder 1 kb (Fermentas), agarosa (Fermentas), sybersafe (Invitrogen), kalium klorida (Merck), asam klorida (Merck), natrium klorida

(Merck), baktotripton (Difco), kitinase (Sigma Chemical), selulase (Yakult Biochemical), maserozim (Yakult Biochemical), Kalsium klorida (Merck), primer (Alpha DNA), Polietilenglikol 6000 (Merck), asam asetat glacial (Merck), medium YMP (ekstrak ragi 0,3%, ekstrak malt 0,3%, pepton 0,6%, glukosa 2,0%), medium YMP padat (ekstrak ragi 0,3%, ekstrak malt 0,3%, pepton 0,6%, glukosa 2,0%, agar 2,0%), medium LB (tripton 1%, NaCl 1%, ekstrak ragi 0,5%), medium LB padat (tripton 1%, NaCl 1%, ekstrak ragi 0,5%, agar bakteriologikal 2%), larutan enzim (kitinase 0,1%, selulase 1%, dan maserozim 1%), larutan PEG (60% PEG 6000; Dapar tris-HCl 10 mM pH 7,5; CaCl<sub>2</sub> 50 mM), kit PrimeSTAR HS DNA polymerase (Takara), kit isolasi plasmid (BioBasic), dapar TAE 50X (10 mL = 24,2 g Tris, 5,71 mL asam asetat glacial, 10 ml 0,5 M EDTA pH 8,0), *Loading Buffer* (Fermentas), dan etanol absolut (Merck).

**Alat.** Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca elektrik (Sartorius), mikropipet (Gilson), autoklaf (Tommy), mesin PCR (Takara), alat elektroforesis (Mupid), *UV transilluminator* (UVP), microwave (Sharp), pemutar orbital (Stuart), nanodrop (ND 1000), sentrifuse (Tommy), *Laminar air flow*, *hot plate* (Stuart), kamera digital (Canon), vortex (Stuart), alat gelas dan peralatan lain yang biasa dipakai di laboratorium Bioteknologi.

**METODE. Isolasi DNA Plasmid pTRLI.** Isolasi DNA plasmid dilakukan menggunakan *kit EZ-10 column* (BioBasic). Satu koloni *E.coli* yang mengandung plasmid diinkubasi dalam medium LB cair yang mengandung ampicilin 100 ug/mL selama 20 jam. Suspensi tersebut kemudian dimasukkan dalam tabung *Eppendorf* 1,5 mL dan disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 g selama 2 menit. Supernatan dibuang dan pelet diresuspensi dalam 0,100 mL Larutan I dari kit *EZ*. Suspensi tersebut diinkubasi selama 1 menit kemudian ditambahkan 0,200 mL Larutan II dari kit *EZ* dan tabung *Eppendorf* dibolak balik sebanyak 4 sampai 6 kali. Suspensi diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit. Larutan III dari kit *EZ* ditambahkan ke dalam suspensi sebanyak 0,350 mL. Suspensi dalam tabung *Eppendorf* dibolak balik sebanyak 4 sampai 6 kali dan diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit. Selanjutnya suspensi disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 g selama 5 menit. Supernatan dipindahkan dalam kolom yang berada tabung 2 mL dan disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 g selama 2 menit. Larutan dalam tabung 2 mL dibuang dan kolom dipasang kembali dalam tabung 2 mL. Kolom ditambahkan larutan pencuci dari kit *EZ* sebanyak 0,500 mL dan disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 g selama 2 menit. Larutan dalam tabung 2 mL dibuang dan kolom dipasang kembali dalam tabung 2 mL. Kolom disentrifugasi dengan kecepatan 15.000

g selama 1 menit untuk menghilangkan sisa larutan pencuci. Kemudian kolom dipindahkan ke dalam tabung 1,5 mL dan ditambah 50  $\mu$ L larutan elusi. Larutan diinkubasi selama 2 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 g selama 2 menit. Larutan elusi yang diperoleh sebanyak 50  $\mu$ L merupakan larutan DNA plasmid.

**Visualisasi DNA plasmid.** Visualisasi DNA plasmid dilakukan menggunakan elektroforesis gel agarosa. Larutan DNA plasmid yang diperoleh diambil sebanyak 5  $\mu$ L dan ditambahkan 1  $\mu$ L *loading buffer*, dicampur merata dan dimasukkan dalam sumur pada 1% gel agarosa yang mengandung *sybersafe* (sebagai pengganti etidiumbromida). Sampel dielektroforesis selama 20 menit pada 100 volt dan hasil elektroforesis dilihat dengan *UV transluminator* dan didokumentasi.

**Penentuan kemurnian dan konsentrasi DNA plasmid.** Sebanyak 3  $\mu$ L DNA plasmid yang diperoleh diukur kemurnian dan konsentrasinya dengan menggunakan nanodrop pada panjang gelombang  $\lambda$  260 nm dan  $\lambda$  280 nm.

**Restriksi plasmid pTRI dan pTRLI.** Sebanyak 5  $\mu$ L plasmid pTRI dan pTRLI dalam tabung 0,2 uL masing-masing ditambahkan 2 uL *HindIII*, 11  $\mu$ L air bebas nuklease, dan 2  $\mu$ L buffer R *HindIII*, kemudian dicampur dan diinkubasi selama 2 jam pada suhu 37°C. Kemudian Hasil restriksi dielektroforesis selama 20 menit pada 100 volt dan hasil elektroforesis dilihat dengan *UV transluminator* dan didokumentasi.

**Preparasi dan transformasi protoplas.** Protoplas *A. terreus* ditransformasi dengan menggunakan modifikasi prosedur dari Herzog dkk<sup>(7)</sup>. Satu koloni *A. terreus* yang berumur 7 hari dalam cawan petri diambil, ditambahkan air steril, dihomogenisasi sampai halus menggunakan *potter*, dan disaring. Filtrat dimasukkan dalam erlenmeyer yang mengandung 50 mL medium YMP cair dan diinkubasi pada pemutar orbital selama 20 jam dengan kecepatan putaran 200 rpm. Setelah itu hifa disentrifugasi selama 5 menit pada 6000 g. Endapan hifa dicuci air steril setelah itu disuspensikan dalam 20 mL larutan enzim. Suspensi diinkubasi selama 3 jam pada suhu kamar pada pemutar orbital dengan kecepatan putaran 100 ppm. Suspensi yang mengandung protoplas disaring untuk menghilangkan debris dan filtrat disentrifugasi pada 3000 g selama 20 menit kemudian endapan dicuci dengan larutan kalsium klorida 50 mM-KCl 0,6 M. Endapan protoplas disuspensi dalam larutan KCl 0,6 M-Tris-Cl 10 mM pH 7,5 ditentukan jumlah protoplas dengan menggunakan hemositometer. Sebanyak 107/100 uL protoplas *A. terreus* dalam larutan kalsium klorida 50 mM-KCl 0,6M dalam tabung *Eppendorf* ditambahkan 10  $\mu$ g plasmid dan 50  $\mu$ L larutan polietilenglikol. Kemudian tabung *Eppendorf* direndam dalam es selama 20 menit, ditambahkan 1

mL larutan polietilenglikol, dan diinkubasi pada suhu kamar selama 15 menit. Hasil transformasi ditumbuhkan dalam medium *Czapex-Dox agar* yang mengandung 1 mg/L piritiamin pada suhu kamar. Transforman diamati pertumbuhannya pada hari ke-3 sampai hari ke-10. Setelah 5 hari ditentukan jumlah transformannya. Sebagai kontrol negatif plasmid diganti dengan air steril.

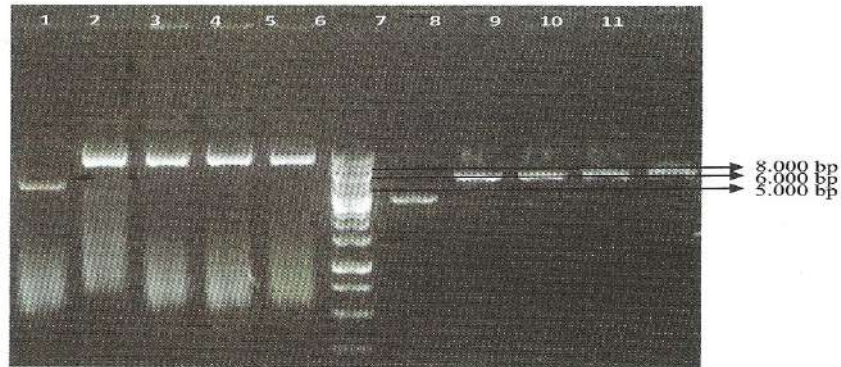
**Uji stabilitas transforman.** Transforman diuji stabilitasnya dengan cara ditumbuhkan dalam medium YMP padat yang mengandung 1 mg/L piritiamin sampai generasi ke-5.

**Amplifikasi fragmen gen *ptrA* dengan PCR.** Amplifikasi gen *ptrA* dengan menggunakan pTRLI (kontrol positif) dan genom transforman sebagai *template*. Pada tabung PCR 1 dan 2 masing-masing ditambahkan 30,5  $\mu$ L air bides, 10  $\mu$ L dapar 5X, 4  $\mu$ L dNTP (2,5 mM), 1  $\mu$ L *primer forward* 10 pm, 1  $\mu$ L *primer reverse* 10 pm, 0,5  $\mu$ L Taq DNA polimerase. Selanjutnya pada tabung PCR 1 ditambahkan 1  $\mu$ L plasmid pTRI (kontrol positif) dan tabung PCR 2 ditambahkan 1  $\mu$ L sampel genom DNA (transforman berumur 20 jam). PCR dilakukan sebanyak 30 siklus (satu siklus terdiri dari: Denaturasi 98°C selama 10 detik, Hibridisasi (*Annealing*) 58°C selama 10 detik, dan pemanjangan (polimerasi) fragmen DNA 72°C selama 1 menit) dan pascaPCR 72°C selama 10 menit. Produk PCR Sebanyak 5  $\mu$ L dicampur dengan 1  $\mu$ L *loading buffer* dan dimasukkan dalam sumuran pada 1% gel agarosa yang mengandung *sybersafe*. Sampel dielektroforesis selama 20 menit pada 100 volt dan hasil elektroforesis dilihat dengan *UV transluminator* dan didokumentasi.

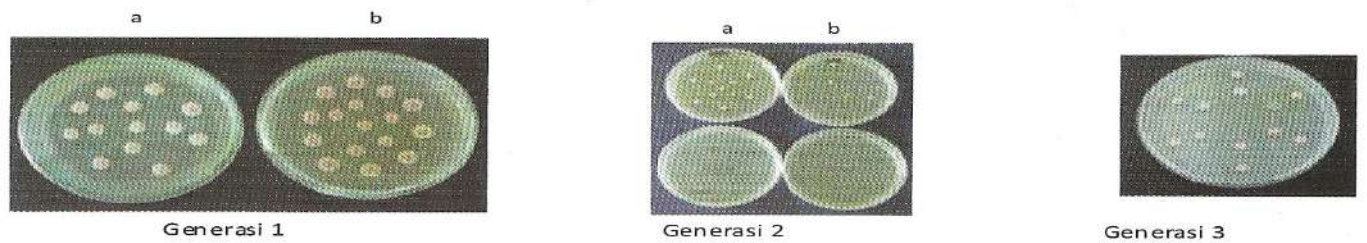
## HASIL DAN PEMBAHASAN

Plasmid pTRLI berhasil diisolasi dan dapat dilihat dari elektroforegram. Sebagai pembanding digunakan plasmid pTRI (tanpa sisipan) yang mempunyai ukuran lebih kecil (Gambar 1). Hasil penentuan kemurnian plasmid pTRLI dengan menggunakan nanodrop pada perbandingan absorban 260 nm/280 nm adalah 1,87. Ini menunjukkan bahwa plamid pTRLI mempunyai derajat kemurnian yang tinggi dan memenuhi persyaratan kemurnian DNA antara 1,8 sampai 2,0. Sedangkan konsentrasi plasmid pTRLI 98,8 ng/uL. Konsentrasi plasmid pTRLI ini mencukupi untuk transformasi protoplas *A. terreus* yang memerlukan 10 ug plasmid<sup>(8)</sup>. Plasmid pTRI dan pTRLI direstriksi dengan enzim *HindIII*. Hasil restriksi plasmid pTRI menghasilkan satu pita berukuran 4.782 bp dan plasmid pTRLI menghasilkan satu pita yang berukuran 7.617 bp (Gambar 1).

Isolasi protoplas, dapat dilakukan secara enzimatik dan mekanik. Cara mekanik menghasilkan jumlah



Gambar 1. Elektroforegram: sumuran 1 plasmid pTRI, sumuran 2 sampai 5 plasmid pTRLI, sumuran 6 ladder 1 kb, sumuran 7 plasmid pTRI yang direstriksi dengan *HindIII*, dan sumuran 8 sampai 11 plasmid pTRLI yang direstriksi dengan *HindIII*.



a. Transforman dalam Cz apex-Dox piritiamin agar  
 b. Transforman dalam Cz apex-Dox piritiamin agar  
 a. dan b. Transforman dalam Cz apex-Dox piritiamin agar  
 c. dan d. Induk *A. terreus* dalam Cz apex-Dox piritiamin agar  
 Transforman dalam Cz apex-Dox piritiamin agar

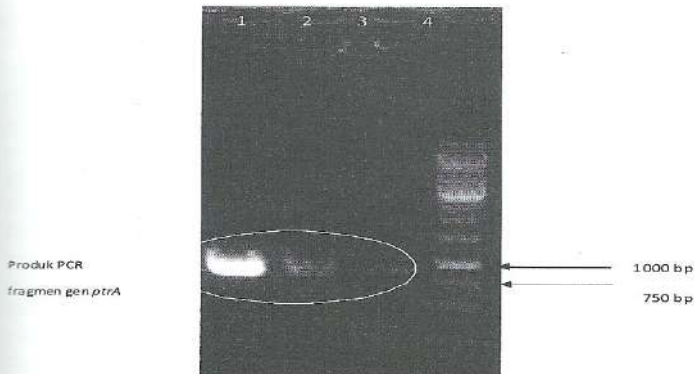


a. Transforman dalam Cz apex-Dox piritiamin agar  
 b. Induk *A. terreus* dalam Cz apex-Dox piritiamin agar  
 a. Transforman dalam Cz apex-Dox piritiamin agar  
 b. Induk *A. terreus* dalam Cz apex-Dox agar  
 c. Induk *A. terreus* dalam Cz apex-Dox piritiamin agar

Gambar 2. Transforman Generasi 1, 2, 3, 4, dan 5 dalam Media *Czapek-Dox Agar* yang Mengandung Piritiamin 1 mg/L pada hari ke-10.

protoplas yang sedikit karena banyak protoplas yang pecah saat isolasi protoplas sehingga tidak digunakan pada penelitian ini. Isolasi protoplas secara enzimatik menggunakan enzim yang dapat mendegradasi dinding sel kapang yang tersusun dari selulosa dan

kitin. Pada penelitian ini digunakan campuran kitinase, selulase, dan maserozim. Setelah diinkubasi selama 4 jam diperoleh protoplas sebanyak  $1,6 \times 10^7$  protoplas/mL dan jumlah ini mencukupi untuk transformasi karena untuk sekali transformasi diperlukan  $5 \times 10^6$



**Gambar 4. Elektroforegram Produk Amplifikasi Gen *ptrA*.**  
Keterangan: 1. Produk PCR fragmen gen *ptrA* pada plasmid; 2. Produk PCR fragmen gen *ptrA* pada *A. terreus*; 3. Produk PCR fragmen gen *ptrA* pada *A. terreus*; dan 4. Ladder 1 kb

protoplas/mL<sup>(13)</sup>.

Transformasi plasmid pTRLI ke dalam protoplas *A. terreus* dengan penambahan polietilenglikol dan kalsium klorida. Penambahan polietilenglikol berfungsi untuk membantu masuknya DNA plasmid dalam protoplas dengan cara menurunkan tegangan permukaan. Adanya ion kalsium berfungsi mempercepat masuknya DNA plasmid dengan cara membentuk ikatan dengan muatan negatif pada membran. Setelah hari ke-5 diperoleh transforman antara 12 sampai 19 transforman per/DNA plasmid.

Transforman diuji stabilitasnya dengan cara menumbuhkannya dalam medium *agar Czapek-dox* yang mengandung piritamin 1 mg/L sampai generasi ke-5 dan transforman dapat tumbuh dari generasi ke-1 sampai ke-5. Dari hasil pengamatan diketahui bentuk, warna, dan diameter koloni antara 0,5 sampai 1,4 cm relatif sama<sup>(12)</sup>. Hal ini menunjukkan bahwa transforman bersifat stabil sampai generasi ke-5. Hasil uji stabilitas transforman dapat dilihat pada Gambar 2.

Gen *ptrA* diamplifikasi dengan PCR untuk mendeteksi transforman secara genetik. Setelah proses PCR dilakukan karakterisasi produk PCR dengan elektroforesis gel agarosa dengan menggunakan marker. Fragmen gen *ptrA* yang akan teramplifikasi berukuran 801 bp. Hal ini menunjukkan bahwa transformasi dan amplifikasi gen *ptrA* berhasil dilakukan. Hasil karakterisasi produk PCR dengan elektroforesis gel agarosa dapat dilihat pada Gambar 3.

### SIMPULAN

Transformasi plasmid pTRLI ke dalam protoplas *A. terreus* berhasil dilakukan dengan jumlah transforman yang dihasilkan 12 sampai 19 koloni/ $\mu$ g plasmid dan

transforman *A. terreus* dapat tumbuh stabil dalam medium seleksi sampai generasi ke-5.

### DAFTAR PUSTAKA

- Balajee MS. *Aspergillus terreus* complex, Medical Mycology. 2009.47:S42-S46.
- Lai LT, Chih-Sheng Hung, and Chi-Chu Lo. Effect of Lactose and Glucose on Production of Itaconic Acid and Lovastatin by *Aspergillus terreus* ATCC 20542. J. Bioscience and Bioengineering. 2007. 104(1):9-13.
- Banuclos O, Leopoldo N, Javier C, Santiago G, and Juan F. Co- transformation with autotomous replicating and integrative plasmids in *Penicillium chrysogenum* in highly efficient and leads in some cases to of the intact integrative plasmid. Fungal Genetics and Biology. 2003. 40:83-92.
- Barret V, Robert KD., and Paul AL. Genetic transformation of *mycorrhiza* fungus. Appl Microbiol Biotechnol. 1990. 33: 313-16.
- Campoy S, Perez F, Martin JF, Gutierrez S, and Liras P. Stable Transformants of the Azaphilone Pigment-Producing *Monascus purpureus* Obtained by Protoplast Transformation and Agrobacterium-mediated DNA Transfer Curr Genet. 2003. 43:447-52.
- Mayer V. Genetic engineering of filamentous fungi—progress, obstacles, and future trends. Biotechnol Adv. 2008. 26:177-85.
- Herzog RW., Daniell H, Sigh NK, and PA Lemke. A Comparative Study on the Transformation of *Aspergillus nidulans* by Microprojectile Bombardment of Conidia and a More Conventional Procedure Using Protoplast Treated with Polyethylenglycol. Appl Microbiol. Biotechnol. 1996. 45:333-7.
- Prabha VL. and NS Punekar. Genetic transformation in *Aspergilli*: tools of the trade. Indian J Biochem. Biophysics. 2004. 41:205-15.
- Kubodera T., Nobuo Y, Akira N. Transformation of *Aspergillus sp.* and *Trichoderma reesei* using the pyrithiamine resistance gene (*ptrA*) of *Aspergillus oryzae*. Biosci Biotechnol Biochem. 2002. 66(2):404-6.
- Lopez FJF, Elza F de Araujo, and Marisa V de Queiroz. Easy detection of green fluorescent protein multicopy transformants in *Penicillium griseoreum*. Gen and Molec Research. 2004. 3(4):449-55.
- Skory CD, Perng-Kuang C, Jeff C, and John EL. Isolation and characterization of a gene from *Aspergillus paraticus* associated with the conversion of versicolorin A to sterigmatocystin in aflatoxin biosynthesis. App and Environ Microbiol. 1992. 3527-57.
- Woloshuk CP, Seip ER, Payne GA, and Adkins CR. Genetic Transformation System for the Aflatoxin-Producing Fungus *Aspergillus flavus*. Applied and Environmental Microbiology. 1989. 55:86-90.
- Gillian BT, Bradford C, Jinyuan L, and Ning Z. Protoplast Transformation of Filamentous Fungi. In: Amir Sharon, editors. Molecular and Cell Biology Method for Fungi. London: Humana Press. 2010. 3-19.