

**TRANSFORMASI GENETIK LIMA VARIETAS KEDELAI
MENGUNAKAN *AGROBACTERIUM***

Setyo Dwi Utomo

Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Lampung,
Jl. S. Brodjonegoro 1 Bandar Lampung 35145
Telp. 0721 781820, e-mail: sdutomo2002@yahoo.com

ABSTRACT

AGROBACTERIUM-MEDIATED TRANSFORMATION OF FIVE SOYBEAN CULTIVARS. *The objective of this study was to evaluate the efficiency of Agrobacterium-mediated transformation using explants of five soybean cultivars. The study was conducted in the Plant Transformation Core Research Facility, Center of Biotechnology, University of Nebraska, Lincoln, Nebraska, USA from July – December 2003. Experiments were arranged in randomized block designs with 5-10 replications, 4 explants within each experimental unit. Three strains of Agrobacterium tumefaciens were used, i.e., C58C1, EHA101, and NTL4-Cry5. Explants were cotyledonary nodes of cultivars Jaya Wijaya, Krakatau, Slamet, Tampomas, and Wilis. Cotyledonary-node explants, prepared from germinated seeds, were inoculated with Agrobacterium, incubated in co-cultivation media for 3 days, washed, cultured in media of shoot-initiation, shoot-elongation, and rooting for 4, 4-6, and 2 weeks respectively. The media of shoot initiation and elongation contained herbicide glufosinate as the selecting agent. At 31 days after inoculation, shoots were produced from explants of all five cultivars evaluated. The proportion of explants producing shoots ranged from 31% (cultivar Jaya Wijaya) to 76% (cultivar Slamet). Transgenic soybeans were produced from all five cultivars evaluated with efficiency ranged from 2.6% to 6.5%. Transgenic soybeans were only produced from explants inoculated with EHA101 and NTL4-Cry5, not with C58C1.*

Key words: *Agrobacterium, Glycine max, genetic engineering*

PENDAHULUAN

Rekayasa genetika atau transformasi genetik kedelai yang efisien dapat berkontribusi positif dalam proses perakitan varietas unggul kedelai. Varietas unggul kedelai yang telah dihasilkan melalui transformasi genetik antara lain memiliki sifat tahan terhadap hama ulat ordo *Lepidoptera* (Parrot *et al.*, 1994; Stewart Jr. *et al.*, 1996) dan mengandung lemak tidak jenuh yang tinggi (Mazur *et al.*, 1999).

Tanaman kedelai transgenik hasil rekayasa dapat diperoleh menggunakan biolistik dan *Agrobacterium*. Transformasi genetik kedelai menggunakan biolistik (*microprojectile bombardment*) berhasil dilakukan menggunakan eksplan embrio somatik dan pucuk tunas (*shoot apices*); sedangkan transformasi menggunakan *Agrobacterium* berhasil dilakukan terutama menggunakan eksplan buku kotiledon

Kedelai transgenik berhasil diperoleh dari transformasi menggunakan *Agrobacterium* setelah ditempuh jalur organogenesis untuk meregenerasikan tanaman transgenik dari eksplan buku kotiledon (Hinchee *et al.*, 1988). Buku

kotiledon diambil dari biji kedelai yang telah dikecambahkan selama 4 – 10 hari pada media agar. Eksplan diinokulasi dengan *Agrobacterium* strain nopalina yang mengandung Ti-plasmid yang membawa kaset gen *nptII* sebagai marka. Eksplan selanjutnya dikulturkan pada media B5 yang mengandung 5 µM BAP. Tunas transgenik diseleksi dengan cara dikulturkan pada media yang mengandung antibiotik kanamisin 200 – 300 mg/l. Pemanjangan tunas dicapai dengan cara mengkulturkan pada media mengandung BAP lebih rendah. Hinchee *et al.* (1988) melaporkan efisiensi transformasi berkisar 0,3 – 2,2%. Prosedur transformasi Hinchee *et al.* (1988) tersebut kemudian dimodifikasi oleh Di *et al.* (1996) dan Townsend dan Thomas (1996). Modifikasi meliputi penambahan 100 µM asetosiringon (Stachel *et al.*, 1985) untuk menginduksi virulensi *Agrobacterium* selama inokulasi dan ko-kultivasi, memperpendek periode perkecambahan, dan pelukaan sebelum inokulasi pada buku tempat tumbuh tunas aksilar yang berguna untuk mencegah munculnya tunas aksilar dan merangsang terbentuknya tunas adventif majemuk. Thomas Clemente (data tidak dipublikasi) memodifikasi persiapan eksplan, yaitu

memisahkan kotiledon dari kecambah dengan cara memotong hipokotil 5 mm di bawah kotiledon. Menggunakan silet skalpel, poros embrio dibuang dan pelukaan dilakukan dengan cara membuat 7-12 irisan paralel dengan poros. Zhang *et al.* (1999) dan Clemente *et al.* (2000) memodifikasi media seleksi, yaitu menggunakan herbisida sebagai pengganti antibiotik.

Dengan menggunakan prosedur Hinchee *et al.* (1988) beserta modifikasinya, Olhoft *et al.* (2002) melaporkan efisiensi transformasi yang paling tinggi yang pernah dilaporkan untuk kedelai yaitu 16,4%. Prosedur transformasi buku kotiledon tersebut paling banyak digunakan di laboratorium-laboratorium milik pemerintah di Amerika Serikat.

Transformasi genetik genotipe kedelai nasional menggunakan *Agrobacterium* dilaporkan oleh Triadiati (1994), Gustian (2002), dan Pardal (2000). Triadiati (1994) mengevaluasi 100 genotipe kedelai yang mencakup 11 varietas unggul nasional. Menggunakan strain *Agrobacterium* LBA4404 yang diinokulasikan pada kotiledon dan diseleksi pada media yang mengandung kanamisin, Triadiati (1994) mendapatkan kalus transgenik eksplan mutan M-24 yang mengekspresikan GUS. Walaupun tidak didukung data analisis molekuler (PCR atau hibridisasi Southern), Gustian (2002) melaporkan kecambah atau plantlet kedelai yang tahan kanamisin atau membawa gen *coat protein* (CP) dari eksplan embrio somatik yang diinokulasi *Agrobacterium* dan diseleksi pada media mengandung kanamisin. Terdapat kesulitan untuk mendapatkan tanaman transgenik dari embrio somatik transgenik. Penelitian ini bertujuan mengevaluasi efisiensi transformasi genetik lima varietas kedelai menggunakan *Agrobacterium* menggunakan prosedur Zhang *et al.* (1999) dan Clemente *et al.* (2000).

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Plant Transformation Core Research Facility, Center of Biotechnology, University of Nebraska, Lincoln, Nebraska, Amerika Serikat (PTCRF-UNL) pada bulan Juli – Desember 2003. Sumber eksplan yang digunakan adalah biji kedelai masak varietas Jaya Wijaya, Krakatau, Slamet, Tampomas, dan Wilis. Tiga strain *Agrobacterium* digunakan untuk inokulasi eksplan, yaitu C58C1, EHA101, dan NTL4-Cry5. Tiga strain tersebut membawa vektor transformasi pPTN289 yang mengandung gen toleransi terhadap herbisida glufosinat dan gen pelapor GUS (*beta-glucuronidase*). EHA101

membawa kromosom C58 (*nopaline*) dan Ti-Plasmid pEHA101 (*L.L.succinamopine*); NTL4-Cry5 membawa kromosom NTL (*nopaline*) dan Ti-plasmid *chrysoopine*; sedangkan C58C1 membawa kromosom C58 (*nopaline*) dan Ti-plasmid pMP90 (*nopaline*). Percobaan I dan III menggunakan strain NTL4 Cry5, sedangkan Percobaan II menggunakan strain C58C1. Percobaan menggunakan rancangan acak kelompok yang terdiri dari 5-10 ulangan. Setiap satuan percobaan terdiri dari 4 eksplan yang dikulturkan pada media dalam cawan petri 10 x 2 cm.

Prosedur transformasi meliputi tahap-tahap sterilisasi biji, pengecambahan biji, penyiapan eksplan dan inokulasi, kultur dalam media kokultivasi, pencucian eksplan, kultur dalam media inisiasi tunas, subkultur dalam media pemanjangan tunas, dan subkultur dalam media pengakaran (Zhang *et al.*, 1999; Clemente *et al.*, 2000). Sterilisasi eksplan dilakukan dengan cara menaruh satu lapis biji kedelai pada dasar cawan petri terbuka yang ditempatkan dalam desikator. Desikator ditempatkan di dalam lemari asam. Gas klorin diproduksi di dalam desikator dengan cara menambahkan tetes demi tetes 3,3 ml 12 N HCl ke permukaan dinding bagian dalam gelas piala berisi 100 ml chlorox atau sunklin. Desikator kemudian ditutup dan dibiarkan dalam lemari asam selama 48 jam.

Biji yang telah disterilisasi kemudian dikecambahkan dalam media pengecambahan berupa media B5 Gamborg (Gamborg *et al.*, 1968) dengan pH 5,8 yang mengandung 2% sukrosa dan dipadatkan dengan 0,8% agar. Media dituang dalam cawan petri 100 x 25 mm. Sebanyak 10 –15 biji dikecambahkan dalam satu cawan petri dan diinkubasi 5-6 hari pada suhu 24 C dan 18/6 jam terang/gelap. Setelah berkecambah, eksplan dipersiapkan untuk diinokulasi dengan *Agrobacterium*. Pertama, kecambah yang terkontaminasi dibuang dan dipilih kecambah yang hijau dan sehat. Kecambah dipisahkan dari akarnya dengan cara memotong horizontal hipokotil 3-4 mm di bawah buku kotiledon. Selanjutnya kecambah dibelah vertikal di antara dua kotiledon sehingga diperoleh dua eksplan buku kotiledon. Pucuk poros embrio di atas buku kotiledon dibuang. Terakhir, dibuat 7-12 goresan sepanjang 3-4 mm sejajar dengan poros embrio pada buku kotiledon menggunakan pisau skalpel no. 15.

Agrobacterium untuk inokulasi eksplan ditumbuhkan selama 12-14 jam dalam media cair yang mengandung antibiotik, kemudian dipeletkan dengan cara sentrifugasi 2500-3000 RPM selama 10

Utomo : Transformasi genetik kedelai menggunakan *Agrobacterium*

menit. Pelet disuspensikan dengan media ko-kultivasi cair agar diperoleh suspensi dengan kepadatan optik OD_{600} 0,7-1,0. Eksplan yang telah dipersiapkan diinokulasi dengan cara merendam dalam cawan petri berisi suspensi *Agrobacterium* selama 30 menit dan digoyang-goyang setiap 5-10 menit. Selanjutnya eksplan ditaruh pada kertas saring steril yang dibentangkan pada media ko-kultivasi padat, 4 eksplan per botol kultur dan diinkubasi selama 3 hari. Eksplan buku kotiledon ditempatkan telungkup (permukaan yang datar/adaksial menghadap ke bawah) pada kertas saring. Ruang inkubasi atau ruang tumbuh untuk seluruh percobaan bersuhu 24 C, 18/6 jam terang/gelap per hari. Sumber cahaya ruang tumbuh berupa lampu TL berintensitas 1000 lux. Eksplan kemudian dicuci dengan media pencuci dan disubkultur pada media inisiasi tunas yang mengandung antibiotika (*ticar*, *cefotaxime*, dan *vancomycin* untuk membunuh *Agrobacterium*) dan herbisida glufosinat (Zhang *et al.*, 1999). Media inisiasi tunas adalah media B₅ (Gamborg *et al.*, 1968) yang mengandung 1 mg/l BAP. Eksplan ditempatkan condong dengan sudut 120°, permukaan adaksial menghadap ke atas, dan bagian yang dicacah ditanam dalam media.

Setelah dua minggu pada media inisiasi, kalus pada permukaan bawah eksplan dipotong, dan bagian atas eksplan yang meliputi bakal tunas adventif dipindahkan ke media inisiasi segar. Dua minggu kemudian jaringan kotiledon (menguning) dibuang, bagian dasar eksplan yang bersinggungan dengan media dipotong, dan jaringan eksplan yang berdiferensiasi menghasilkan tunas atau bakal tunas adventif pada buku kotiledon dipindahkan ke media pemanjangan tunas. Komposisi media pemanjangan tunas hampir sama dengan media inisiasi tunas kecuali 1 mg/l BAP diganti dengan 1 mg/l IAA, 1 mg/l GA₃, dan 1 mg/l zeatin ribosida; serta tidak mengandung antibiotika *ticar*, *cefotaxime*, dan *vancomycin*. Tunas yang mempunyai lebih dari 3 daun dikulturkan ke media pengakaran. Tunas yang telah berakar fungsional diaklimatisasi ke media tanah.

Variabel yang diamati meliputi 1) proporsi eksplan yang menghasilkan tunas adventif pada 31 HSI; 2) Jumlah dan proporsi tunas yang tumbuh pada media mengandung glufosinat selama 10 minggu; 3) Jumlah dan proporsi tunas independen yang mengepskresikan GUS (Jefferson *et al.*, 1987); dan 4) Integrasi gen GUS ke dalam genom tanaman

jagung berdasarkan analisis hibridisasi Southern. Yang dimaksud tunas adalah bakal cabang yang telah membentuk ≥ 1 daun trifoliat. Tunas adventif dapat dibedakan dengan tunas aksilar. Tunas aksilar terbentuk secara langsung (tanpa melalui fase kalus) dari meristem aksilar. Karena tanpa melalui fase kalus, tunas aksilar sudah terbentuk 7 HSI berupa tunas tunggal yang tumbuh cepat. Sebaliknya, tunas adventif terbentuk dari kalus yang berasal dari meristem aksilar yang dicacah. Pencacahan bertujuan menghindari terbentuknya tunas aksilar dan merangsang terbentuknya tunas adventif. Tunas transgenik putatif adalah tunas yang menunjukkan reaksi positif dalam asai histokimia GUS pada potongan daun (Jefferson *et al.*, 1987). Jika dua tunas atau tanaman transgenik berasal dari eksplan yang berbeda, dapat dipastikan dua tunas atau tanaman transgenik tersebut independen (transforman independen) atau berasal dari dua kejadian transformasi yang berbeda.

Untuk mengetahui ekspresi stabil GUS, dilakukan asai GUS terhadap potongan daun tanaman transgenik putatif. Sampel sebanyak 1-3 potongan daun diinkubasi (selama 16 jam 37 C) dalam larutan 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-3-glucuronic acid (*X-Gluc*) (Jefferson *et al.*, 1987). Potongan daun dari tanaman nontransgenik digunakan sebagai kontrol negatif. Reaksi positif ditunjukkan oleh warna biru pada jaringan daun.

Analisis hibridisasi Southern (Southern, 1975) dilakukan terhadap 6 tanaman transgenik putatif R₀. DNA genomik total diekstrak dari 1,0-1,5 gram daun yang telah membuka penuh menggunakan prosedur Dellaporta *et al.* (1983). DNA (10 µg) dipotong dengan enzim restriksi. Hibridisasi menggunakan pelacak (*probe*) GUSplus. Pelacak radioaktif diperoleh melalui prosedur *random primed synthesis* (Prime IT II, Stratagene, cat #300385, La Jolla, California, USA) untuk menginkorporasikan dCTP yang mengandung ³²P radioaktif. Hibridisasi dilakukan dalam inkubator bersuhu 65 C dalam larutan 0.5 M Na₂HPO₄, pH 7.2, 7% (w/v) SDS selama 14 jam. Filter dicuci dua kali dalam larutan 40 mM Na₂HPO₄, 5% (w/v) SDS, pH 7.2 pada suhu 65 C selama 15 menit. Pencucian ketiga dilakukan dalam larutan 40 mM Na₂HPO₄, pH 7.2, 1% (w/v) SDS pada suhu 65 C selama 15 menit. Signal radioaktif dari pita DNA pada filter dideteksi dengan cara menginkubasi dengan film sinar X

HASIL DAN PEMBAHASAN

Salah satu indikator pendukung keberhasilan transformasi genetik adalah terbentuknya tunas adventif yang muncul dari eksplan yang dikulturkan pada media seleksi mengandung glufosinat (Tabel 1). Tunas adventif dihasilkan atau terbentuk dari eksplan buku kotiledon lima varietas kedelai yang dievaluasi. Proporsi eksplan yang membentuk tunas adventif (PEMT) berkisar dari 31% (pada varietas Jaya Wijaya) sampai dengan 76% (pada varietas Slamet). PEMT varietas Slamet dan Tampomas cenderung lebih tinggi daripada Jaya Wijaya dan Wilis. Pardal *et al.* (1997) melaporkan proporsi eksplan yang responsif dalam regenerasi *in vitro* via organogenesis menggunakan eksplan kotiledon tua dan muda varietas Wilis berturut-turut sebesar 41% dan 10%. Dapat disimpulkan bahwa media dan prosedur regenerasi yang digunakan dalam penelitian ini (Zhang *et al.*, 1999; Clemente *et al.*, 2000) relatif optimal atau sesuai untuk meregenerasikan tunas dari eksplan varietas Jaya Wijaya, Krakatau, Slamet, Tampomas, dan Wilis. Lima varietas tersebut termasuk kelompok kemasakan (*maturity group*) XII; sedangkan prosedur regenerasi tersebut dioptimasi untuk genotipe kedelai kelompok kemasakan IV – V.

Tunas adventif yang dilaporkan pada Tabel 1 sudah mengalami proses seleksi yaitu ditumbuhkan pada media yang mengandung glufosinat selama 4 minggu. Pada awal proses seleksi, jumlah tunas adventif yang terbentuk jauh lebih banyak daripada data Tabel 1 tersebut. Sebagian besar tunas adventif non-transgenik mati dalam media seleksi; sebaliknya tunas adventif transgenik tumbuh terus.

Tunas dan plantlet transgenik berhasil

diperoleh dari eksplan yang diinokulasi dengan strain EHA101 maupun NTL4-Cry5 (Tabel 2). Tunas tersebut tumbuh pada medium seleksi yang mengandung glufosinat dan bereaksi positif (menunjukkan warna biru pada jaringan daun) dalam asai histokimia GUS (Gambar 1 sebelah kiri). Proporsi eksplan yang menghasilkan tunas transgenik dari eksplan yang diinokulasi EHA101 berkisar antara 2,6 – 6,5% (Tabel 2). Proporsi eksplan yang menghasilkan tunas transgenik dari eksplan varietas Slamet yang diinokulasi NTL4-Cry5 sebesar 3,3%, lebih rendah daripada yang diinokulasi EHA101 (4,6%). Efisiensi tersebut lebih rendah daripada efisiensi sebesar 16,4% yang dilaporkan oleh Olhoft *et al.* (2002). Disimpulkan bahwa prosedur yang sering digunakan untuk transformasi genetik kedelai kelompok kemasakan (*maturity group*) IV-V ternyata cukup efisien untuk transformasi genetik lima varietas yang termasuk kelompok kemasakan XII. Prosedur yang digunakan dalam penelitian ini telah digunakan dalam transformasi genetik yang menghasilkan tanaman kedelai transgenik dari varietas A3237 (Zhang *et al.*, 1999; Clemente *et al.*, 2000).

Dari tiga percobaan yang dilakukan, diperoleh 27 tunas transgenik independen (Tabel 2). Tunas transgenik tersebut berhasil diakarkan. Konfirmasi integrasi gen GUS ditunjukkan oleh autoradiogram sebagai hasil dari analisis hibridisasi Southern (Gambar 1 sebelah kanan). Jumlah kopi gen GUS yang terintegrasi relatif rendah yaitu berkisar antara 1 sampai 4. Data Southern pada transformasi genetik kedelai menggunakan *Agrobacterium* pada kedelai (Zhang *et al.*, 1999) dan jagung (Frame *et al.*, 2002) juga menunjukkan jumlah kopi gen terintegrasi berkisar antara 1 sampai 4.

Tabel 1. Proporsi eksplan yang membentuk tunas adventif (PEMT) dari eksplan dari eksplan buku kotiledon enam varietas kedelai pada 31 hari setelah inokulasi (HSI). Pada 31 HSI, eksplan telah dikulturkan pada media yang mengandung 5 mg/l glufosinat selama 4 minggu

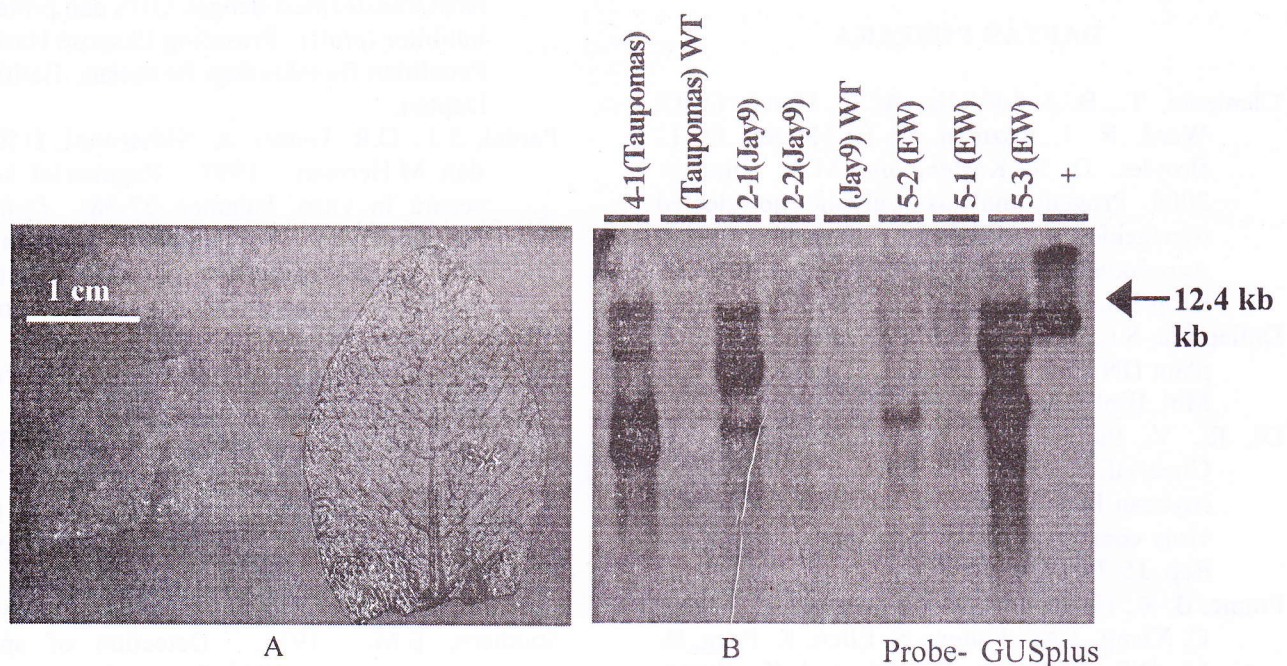
Varietas kedelai	Percobaan I (Strain NTL4 Cry5)	Percobaan II (Strain C58C1)	Percobaan III (Strain NTL4-Cry5)	Nilai tengah varietas
	----- % -----			
Jaya Wijaya	31 b ^{*)}	-	-	31
Krakatau	- ^{**)}	34 ab	71 a	53
Slamet	76 a	48 a	62 ab	62
Tampomas	-	30 ab	58 ab	44
Wilis	64 ab	26 b	44 b	45
BNT _{0,05}	34	21	23	

Ket. : *) Dua nilai tengah dalam satu kolom yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji LSD pada $\alpha = 0,05$

***) Varietas Krakatau tidak diikuti dalam Percobaan I

Tabel 2. Jumlah beserta proporsi tunas yang tumbuh pada media mengandung glufosinat selama 10 minggu; dan jumlah beserta proporsi tunas independen yang mengepskresikan GUS dan tumbuh pada media yang mengandung glufosinat. Data pada Tabel 2 ini merupakan hasil rangkuman tiga percobaan.

Varietas kedelai	Strain <i>Agrobacterium</i> / vektor transformasi	Jumlah eksplan yang diinokulasi	Jumlah dan proporsi tunas yang tumbuh pada media mengandung glufosinat selama 10 minggu	Jumlah dan proporsi tunas independen yang mengepskresikan GUS dan tumbuh pada media mengandung glufosinat
Jaya Wijaya	EHA101 / pPTN289	73	4 (5,5%)	4 (5,5%)
Krakatau	EHA101 / pPTN289	193	5 (2,6%)	5 (2,6%)
Slamet	EHA101 / pPTN289	174	17 (10,5%)	8 (4,6%)
Slamet	NTL4-Cry5 / pPTN289	60	2 (3,3%)	2 (3,3%)
Tampomas	EHA101 / pPTN289	193	5 (2,6%)	5 (2,6%)
Wilis	EHA101 / pPTN289	46	5 (10,9%)	3 (6,5%)



Gambar 1. A = potongan daun kedelai; GUS (*beta-glucuronidase*) terekspresi pada daun sebelah kanan (warna biru jika dicetak berwarna, sebaliknya GUS tidak terekspresi pada daun nontransgenik var. Krakatau (sebelah kiri).

B = autodiogram analisis Southern potongan daun yang diambil dari enam transforman independen. Lajur + adalah kontrol positif yaitu vektor pPTN289 yang dilinierkan. Lajur (Tampomas) WT dan (jay9) WT adalah non-transgenik (*wild types*), tidak menunjukkan pita DNA. Hibridisasi menggunakan pelacak (*probe*) GUSplus. Lajur 4-1 (Tampomas), 2-1 (Jay9), 2-2 (Jay9), berturut-turut adalah tanaman transgenik dari eksplan var. Tampomas dan Jaya Wijaya. Lajur 5-2 (EW), 5-1 (EW), dan 5-3 (EW) adalah tanaman transgenik dari eksplan var. Willis yang diinokulasi *Agrobacterium* strain EHA101.

KESIMPULAN

Proporsi eksplan buku kotiledon kedelai yang menghasilkan tunas berkisar dari 31% (varietas Jaya Wijaya) sampai 76% (varietas Slamet). Kedelai transgenik berhasil diperoleh dari lima varietas yang dievaluasi dengan efisiensi berkisar antara 2,6% sampai 6,5% (cukup efisien). Kedelai transgenik hanya diperoleh dari eksplan yang diinokulasi strain EHA101 dan NTL4-Cry5, bukan dari C58C1.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dilaksanakan ketika penulis sebagai peneliti tamu di *Plant Transformation Core Research Facility, University of Nebraska-Lincoln (PTCRF-UNL)*, Lincoln, Nebraska, Amerika Serikat. Ucapan terima kasih disampaikan kepada Dr. Thomas E. Clemente (Direktur PTCRF-UNL) dan Shirley Sato atas dukungan dana, bantuan teknis, dan fasilitas untuk penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Clemente, T., B. J. LaValle, A. R. Howe, D. C. Ward, R. J. Rozman, P. E. Hunter, D. L. Broyles, D. S. Kasten, and M.A. Hinchee. 2000. Progeny analysis of glyphosate selected transgenic soybeans derived from *Agrobacterium*-mediated transformation. *Crop Sci.* 40:797-803.
- Dellaporta, S.L., J. Wood, and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol. Biol. Repr.* 1:19-21.
- Di, R., V. Purchell, G. B. Collins, and S. A. Ghabrial. 1996. Production of transgenic soybean lines expressing the bean pod mottle virus coat protein precursor gene. *Plant Cell Rep.* 15:746-750.
- Frame, B. R., H. Shou, R. K. Chikwamba, Z. Zhang, C. Xiang, T.M. Fonger, S. Ellen, K. Pegg, B. Li, D.S. Nettleton, D. Pei, and K. Wang. 2002. *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation of Maize Embryos Using a Standard Binary Vector System. *Plant Physiol.* 129:13-22.
- Gamborg, O.L., R.A. Miller, and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell. Res.* 50:151-158.
- Gustian. 2002. Transformasi Genetik dengan Bantuan *Agrobacterium* dan Regenerasi Tanaman Transgenik pada Kedelai (*Glycine max* L. Merr). Disertasi. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. 110 halaman.
- Hinchee M.A.W., D.W. Connor-Ward, C.A. Newell, R.E. McDonnell, S.J. Sato, C.S. Gasser, D.A. Fischhoff, D.B. Re, R.T. Fraley, and R.B. Horsch. 1988. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Bio/Technol.* 6:915-922
- Jefferson R.A., T.A. Kavanagh., and M.V. Bevan. 1987. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.*6:3901-3907.
- Mazur, B, E. Krebbers, and S. Tingey. 1999. Gene discovery and product development for grain quality traits. *Science* 285:372-375.
- Olholf, P.M., L.E. Flagel, C.M. Donovan, and D.A. Somers. 2002. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary method.
- Pardal, S. J., A.Sisharmini, E. Listanto, dan M. Herman. 2000. Regenerasi tanaman kedelai hasil transformasi dengan GUS dan proteinase inhibitor (*pinII*). *Prosiding Ekspose Hasil Penelitian Bioteknologi Pertanian*. Balitbang, Deptan.
- Pardal, S.J., D.R. Untari, A. Sisharmini, D.Riyadi, dan M.Herman. 1997. Regenerasi kedelai secara in vitro, halaman 27-38. *Dalam S. Moeljopawiro, M. Herman, S. Saono, I. Mariska, B. Purwantara, dan H. Kasim (eds.)*. *Prosiding Seminar Bioteknologi Pertanian Indonesia, Surabaya 12-14 Maret 1997*. *Perhimpunan Bioteknologi Pertanian Indonesia, Bogor*.
- Parrott, W.A., J.N All, M.J. Adang, M.A. Bailey, H.R. Boerma, and C.N. Stewart. 1994. Recovery and evaluation of soybean plants transgenic for a *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki insecticidal gene. *In Vitro Plant* 30P:144-149.
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*98:503-517.
- Stachel, S.E., E. Messns, M. Van Montagu, and P. Zambryski. 1985. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 318:624-629.
- Stewart, Jr., C.N., M.J. Adang, J.N. All, H.R. Boerma, G. Cardineau, D. Tucker, and W.A. Parrott. 1996. Genetic transformation, recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for synthetic *Bacillus*

Utomo : Transformasi genetik kedelai menggunakan *Agrobacterium*

- thuringiensis CryA c gene. Plant Physiol. 112:121-129.
- Townsend, J.A. and L. A. Thomas. 1996. Method of *Agrobacterium*-mediated transformation of cultured soybean cells. U. S. Patent 5 563 055. Date issued: 8 October 1996.
- Tridiati. 1994. Transformasi Beberapa Varietas dan Galur Kedelai dengan Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*. Tesis Master. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. 38 hal.
- Zhang, Z., A. Xing, P. Staswick, T. Clemente. 1999. The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean. Plant Cell Tissue Organ Cult. 56:37-46.