

TRANSFORMASI GEN *ARABIDOPSIS ASYMETRIC LEAVES2 (AS2)* PADA ANGGREK *PHALAENOPSIS AMABILIS* (L.) Blume DENGAN MEDIATOR *AGROBAKTERIUM TUMEFACIENS*

Vincentia Esti Windiastri^{*)} dan Endang Semiarti^{**)}

^{*)} Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI
Jl. Raya Bogor Km 46, Cibinong 16911
email: vewindiastri@biotek.lipi.go.id
^{**)} Fakultas Biologi UGM

ABSTRACT

The Asymmetric leaves2 (*AS2*) gene is an important gene of a model plant, *Arabidopsis thaliana*, that involved in leaf development. To understand the molecular mechanism of leaf development in orchid, we transformed the *AS2* gene into the *Phalaenopsis amabilis* orchid protocorms (developing orchid embryos). *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 that contained T-DNA with 35S::AS2 construct and pGreen vector were used for transformation. The 21-day-old protocorms that co-cultivated with *Agrobacterium* culture containing pG35S::AS2/LBA 4404 and pG35S/LBA4404 were maintained on 100 mg/l kanamycin containing medium. The growing plants were selected as candidate of transformants. The putative transformants were analysed by PCR with a pair of *AS2* gene specific primers (ORF15 F2 and ORF15 R2), that amplifying 600 bp fragment of *AS2* gene. The result showed that 79 plants out of 7966 protocorms transformant p35S::AS2 and 64 plants out of 4622 protocorms transformant pG35S were kanamycin resistant, the efficiency of transformations were 0.99% and 1.38%, respectively. Phenotype characterization of the transformation showed that they produced various abnormal leaves shapes: oval (34.18%), wildtype-like (30.38%), rectangular (26.58%), lobed (3.80%), fused (2.53%) and trumpet (2.53%). These data indicate that abnormal shape of leaves might be due to the expressions of *AS2* transgene in *P. amabilis*.

Keywords: *Arabidopsis ASYMMETRIC LEAVES2*, gene transformation, *Agrobacterium tumefaciens*, *Phalaenopsis amabilis*, leaf shapes

PENDAHULUAN

Penelitian mengenai proses fisiologis dan molekuler dari pembentukan dan perkembangan meristem ujung batang telah banyak dilakukan dengan menggunakan tanaman model *Arabidopsis thaliana*. Hal ini disebabkan karena sekuen DNA genom *Arabidopsis* secara lengkap telah dipublikasikan pada tahun 2000, sehingga karakterisasi gen-gen kunci pertumbuhan tanaman telah dilakukan.

Gen *asymmetric leaves2 (AS2)* merupakan salah satu gen yang berperan dalam penentuan arsitektur tanaman terlebih organ daun pada *A. thaliana*. Gen *AS2* mempunyai peranan dalam pembentukan pola venasi, simetri, bentuk, dan

kerataan daun¹, serta merupakan represor gen *KNOX* pada daun. Ekspresi berlebih dari gen *AS2* mengakibatkan gangguan asimetri adaksial – abaksial pada organ lateral, sehingga menghasilkan pergantian tempat (*replacement*) tipe sel abaksial dengan tipe sel adaksial². Pernyataan tersebut didukung oleh penelitian Xu *et al.*² yang mengemukakan bahwa *AS2* bersama dengan *ASI* turut berperan dalam penentuan nasib sel adaksial daun (*adaxial leaf cell fate*). Keduanya bisa membentuk kompleks yang mengatur penentuan polaritas daun.

Pada tanaman anggrek informasi mengenai biologi molekuler tentang pembentukan meristem ujung batang yang merupakan cikal bakal dari daun masih terbatas. Oleh karena itu perlu

dilakukan studi homologi pada tanaman anggrek dengan menggunakan gen-gen Arabidopsis. Penggunaan gen-gen Arabidopsis dinilai akan membantu dalam identifikasi gen penentu sifat unggul yang berperan di dalam proses pertumbuhan dan fisiologi tanaman anggrek³ dengan asumsi bahwa gen-gen yang berperan di dalam proses pertumbuhan dan perkembangan tanaman Arabidopsis memiliki kesamaan dengan tanaman anggrek⁴.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek dari transformasi gen Arabidopsis *AS2* pada angrek *P. amabilis* dengan mediator *Agrobacterium tumefaciens* sebagai dasar untuk mempelajari mekanisme pembentukan tunas ujung daun *P. amabilis*.

BAHAN DAN METODE

Tanaman dan kondisi pertumbuhan

Protokorm anggrek *P. amabilis*, ekotipe Jawa koleksi Royal Orchids (Prigen, Jawa Timur), berumur 18 hari yang dikulturkan pada medium modifikasi New Phalaenopsis (NP)⁵ yang mengandung ekstrak tomat 10% (w/v) dengan suhu 25 °C.

Vektor Plasmid dan Bakteri

Agrobacterium tumefaciens strain LBA 4404⁶ yang mengkonstruksi vektor pG35S::AS2 (pGreen BAR) didapatkan dari Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan Fakultas Biologi, UGM (Yogyakarta). Vektor pG35S::AS2 terdiri atas promoter 35S RNA dari *cauliflower mosaic*

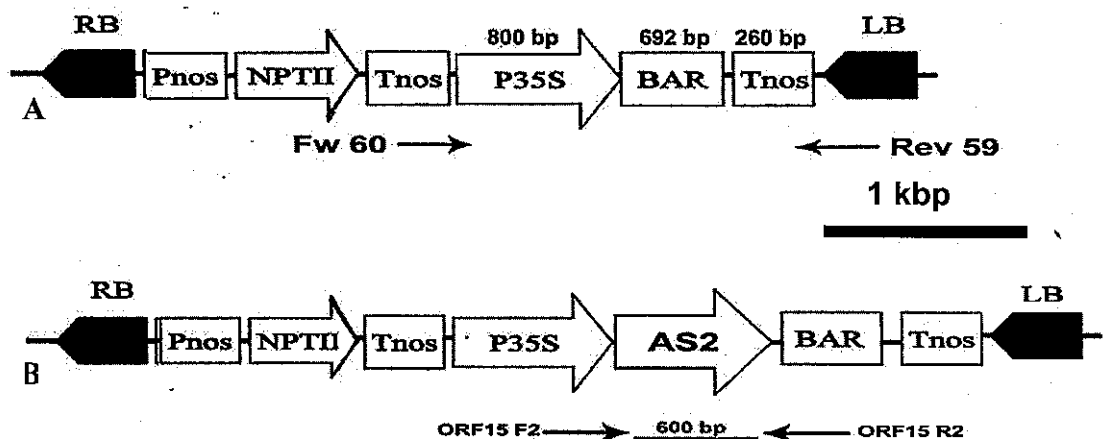
virus dan gen *nopaline synthase* sebagai *terminator*. Ada dua *marker* yang digunakan, yakni gen *NPTII*, gen resisten kanamisin, dan gen *BAR*, gen resisten bialaphos⁷ (Gambar 1).

Transformasi

Protokorm yang berumur 18 hari disubkulturkan pada media induksi kalus NP (NP+2 ppm 2,4 D). Setelah 3 hari, protokorm direndam selama 30 menit dalam kultur cair *Agrobacterium* yang telah dikulturkan selama semalam dan diencerkan (1:6) dengan media ½ NP cair dan diberi *tween* sebagai surfaktan. Protokorm kemudian ditiriskan pada kertas saring steril dan dikulturkan pada media induksi kalus NP variasi yang mengandung 15% (v/v) air kelapa muda. Sebagai kontrol *wild type* ditumbuhkan protokorm yang usianya sama namun tidak ditransformasi dan dikulturkan pada medium induksi variasi NP tanpa antibiotik. Kontrol positif (protokorm yang ditransformasi dengan pG35S) dan kontrol negatif (protokorm non transforman) ditumbuhkan pada medium induksi kalus NP.

Seleksi tanaman transforman

Seleksi tanaman hasil transformasi dilaksanakan dengan membilas protokorm yang telah ditransformasi dan tanaman kontrol dengan medium NP cair yang mengandung 100 mg/l kanamisin + 200 mg/l karbenisilin seminggu setelah transformasi. Setelah dikeringkan protokorm disubkulturkan ke medium induksi tunas (5 mg/l 2-iP+0,15 mg/l NAA) NP variasi



Gambar 1. Konstruksi plasmid. A. p35S dan B. P35SAS2, yang mengkonstruksi gen *NPTII* (869 bp), gen *AS2* (600 bp) dan gen *BAR* (615 bp)

dengan penambahan kanamisin 100 mg/l dan karbenisilin 200 mg/l. Subkultur selanjutnya dilakukan tiap sebulan sekali.

Penghitungan efisiensi transformasi

Efisiensi transformasi dihitung berdasarkan perbandingan persen antara jumlah tanaman transformasi yang mampu beregenerasi pada minggu ke delapan setelah transformasi dan jumlah protokorm yang ditransformasi dalam persen.

Pengamatan Fenotip Tanaman Transforman

Fenotip tanaman transforman yang diamati meliputi perbandingan perkembangan panjang dan lebar daun pertama dan variasi bentuk daun nontransforman, tranforman 35S dan transforman 35S*AS2*.

Analisis Polymerase Chain Reaction (PCR)

DNA genom anggrek yang diisolasi dengan metode Semiarti *et al.*¹ dianalisis dengan PCR (Thermal Cycler Personal Eppendorf, Jerman) untuk mengamplifikasi lokus *AS2* dengan primer yang spesifik untuk gen *AS2*, yakni: ORF15 F2 (5'-ATGGCATCTTCTTCAACAAACTCACC-3') dan ORF15 R2 (5'-TCAAGACGATCAAGTACGCG-3'). PCR dilaksanakan selama 30 siklus dengan detail: 94 °C selama 45 detik, 55 °C selama 1 menit, dan 72 °C selama 1,5 menit. Hasil PCR kemudiah dianalisis dengan gel elektroforesis (Mupid, Jepang).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Efisiensi Transformasi

Pada penelitian ini digunakan protokorm berumur 3 minggu (21 hari) sebagai bahan transformasi karena pada usia tersebut protokorm

mempunyai kandungan alkohol koniferil yang dapat menginduksi gen *vir* (*virulence*) dalam jumlah yang cukup tinggi⁸, sehingga tidak diperlukan asetosiringon tambahan⁹ seperti pada metode transformasi yang lain. Produk protein dari gen *vir* membantu pemotongan T-DNA dan memindahkannya ke dalam genom tanaman, dalam hal ini genom *P. amabilis*¹⁰. Penghitungan efisiensi transformasi dilakukan delapan minggu setelah transformasi dan dihasilkan data pada Tabel 1. Protokorm *wild type* yang ditumbuhkan pada media NP tanpa antibiotik dapat tumbuh sebanyak 98%. Walaupun tanpa seleksi antibiotik, protokorm sudah mengalami seleksi dengan sendirinya sehingga hanya 98% dari semua protokorm yang dapat terus berkembang. Protokorm nontransforman kontrol negatif yang ditumbuhkan pada medium selektif, tidak ada yang dapat terus berkembang sampai 8 minggu. Bahan antibiotik yang ditambahkan pada medium bersifat toksik bagi tanaman *P. amabilis*, karena menghambat replikasi DNA sehingga menghambat regenerasi. Sifat toksik pada kanamisin tersebut dijadikan bahan untuk seleksi protokorm hasil transformasi. Namun pada protokorm yang telah ditransformasi, tetap ditemukan beberapa protokorm yang dapat terus tumbuh dan berkembang dengan jumlah efisiensi transformasi masing-masing. Hal tersebut dikarenakan adanya gen resistan kanamisin (*NPTII*) yang telah terinsersi ke dalam DNA protokorm. Sehingga protokorm transforman yang telah terinsersi gen tersebut dapat terus beregenerasi dan dapat terus tumbuh dan berkembang walaupun tumbuh di media yang mengandung antibiotik¹⁰.

Efisiensi transformasi dihitung dengan membandingkan jumlah protokorm yang mampu bertahan dibandingkan dengan jumlah keseluruhan protokorm yang ditransformasi dalam satuan

Tabel 1. Efisiensi Transformasi Gen *AS2* pada Anggrek *P. amabilis* pada Medium Seleksi NP+Kanamisin 100 mg/ 18 Bulan Setelah Transformasi

Genotip	Σ protokorm yg ditransformasi	Σ protokorm yg bertunas	efisiensi transformasi (%)
Wild Type	100	98*	-
Non transforman (kontrol negatif)	620	-	-
p35S (kontrol positif)	4622	64	1,38
p35S:: <i>AS2</i>	7966	79	0,99

*) ditumbuhkan pada medium NP tanpa kanamisin

persen. Efisiensi transformasi p35S::AS2 ternyata lebih kecil daripada efisiensi p35S. Sifat gen AS2 yang merepresi ekspresi gen KNOX diperkirakan menyebabkan keberhasilan transformasi lebih sedikit. Karena terganggunya kerja gen KNOX, maka proses pertunasan pun terganggu sehingga banyak protokorm yang telah terinsersi dengan gen resisten kanamisin tetap tidak dapat beregenerasi.

Pada penelitian terdahulu oleh Handayani¹¹, efisiensi transformasi gen 35S::AS2 pada genom *P. amabilis* dengan vektor pSK1¹² adalah sebesar 0,099%. Hal ini berarti transformasi gen 35S::AS2 dengan vektor pGreen bisa disebut lebih efektif daripada dengan menggunakan vektor pSK1, karena p35S (pGreen) mempunyai ukuran dan jumlah kopi (*copy number*) yang dapat meningkatkan efisiensi pada prosedur rekombinasi *in vitro*¹⁰. Kemampuan untuk meningkatkan efisiensi rekombinasi inilah yang kemungkinan menyebabkan transformasi dengan menggunakan pGreen sebagai vektor bisa menghasilkan tingkat keberhasilan transformasi yang lebih tinggi daripada saat menggunakan pSK1 sebagai vektor. Brown¹³ menegaskan bahwa masing-masing vektor mempunyai nilai

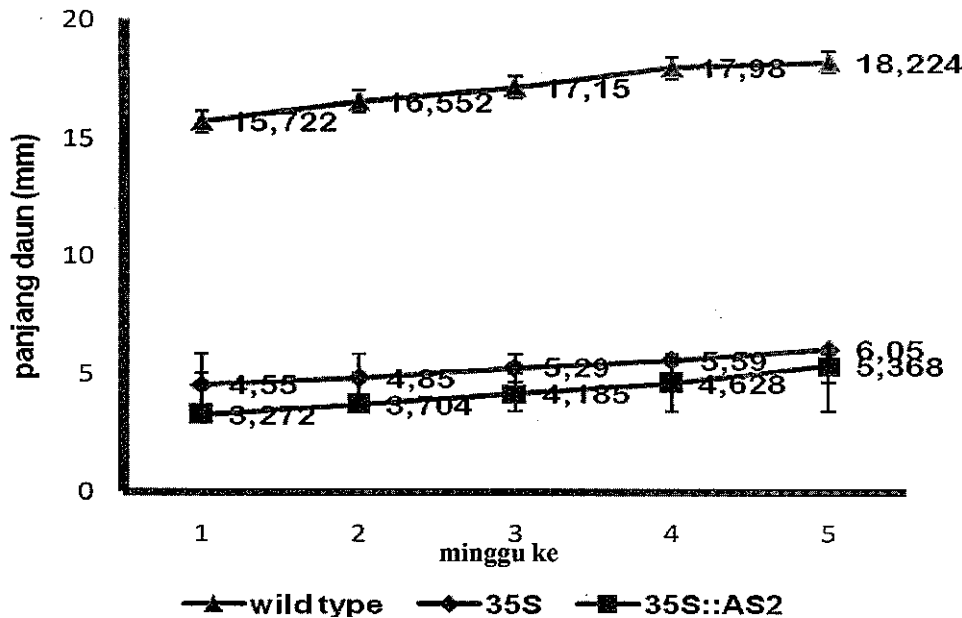
efisiensi transformasi tertentu pada spesies tertentu.

Perbedaan Fenotip Tanaman Transforman dan NonTransforman

Protokorm yang berhasil tumbuh pada medium seleksi akan tumbuh menjadi tanaman transforman. Tanaman transforman mempunyai fenotip yang berbeda dengan tanaman non-transforman. Perbedaan itu tampak jelas pada organ daun, khususnya pada bentuk dan ukuran daun dari kedua tanaman. Setelah pada tanaman transforman muncul sepasang daun, yaitu kira-kira setelah tanaman berumur 7 bulan, dilakukan pengukuran panjang daun selama 5 minggu yang hasilnya tersaji pada Gambar 2. Pengukuran lebar tetap dilakukan, namun tidak terdapat perbedaan yang signifikan.

Ada beberapa hal yang menyebabkan terjadinya perbedaan fenotip antara tanaman transforman 35S::AS2 dengan tanaman non-transforman. Rekombinasi DNA yang baru dengan adanya insersi dari gen yang ditransfer pada genom tanaman target merupakan salah satu faktor yang memicu perubahan fenotip pada tanaman transforman¹⁰. Ohba *et al.*¹⁴

Rerata panjang daun tanaman *P. amabilis* non transforman, transforman 35S dan 35S::AS2, 7 bulan setelah transformasi



Gambar 2. Rerata panjang daun tanaman *P. amabilis* non transforman, transforman 35S dan 35S::AS2, 7 bulan setelah transformasi

menyebutkan bahwa gen yang diinsersikan pada saat transformasi akan menempel pada sisi yang mempunyai urutan basa mirip dengan urutan nukleotida gen tersebut, bahkan terkadang insersi DNA pada genom tanaman akan disertai dengan terjadinya delesi. Genom tanaman anggrek kemungkinan mempunyai beberapa posisi target (*target sites*) yang dapat diinsersi oleh gen *AS2* sehingga menghasilkan banyak rekombinasi DNA pula. Kemungkinan lain, timbulnya banyak rekombinasi disebabkan karena perbedaan jumlah fragmen gen yang masuk. Perbedaan jumlah gen tersebut akan memengaruhi kekuatan pengekspresian gen pada masing-masing tanaman sehingga diperoleh tanaman transforman yang mempunyai variasi fenotip, dalam hal ini variasi bentuk daun.

Daun, kotiledon dan organ-organ bunga merupakan organ lateral tanaman yang berkembang dari meristem ujung batang. Pertumbuhan daun ditentukan pada saat primordial daun menghasilkan struktur menyerupai tunas, gangguan pada saat itu akan menyebabkan pertumbuhan daun berubah¹⁵. Leyser dan Day¹⁶ menyatakan bahwa ukuran dan bentuk daun saat tanaman dewasa tergantung pada posisi daun pada batang dan kondisi lingkungan, namun agar primordial daun dapat tumbuh berukuran normal, besar atau kecil dibutuhkan mekanisme intrinsik untuk mengontrol proporsi relatif dari daun tersebut. Tanaman inokulum yang ditransformasi mengalami kejutan (*shock*) pada saat dikulturkan bersama bakteri selama beberapa hari. Kejutan lingkungan tersebut diiringi dengan insersi gen pada genom tanaman inokulum yang dapat disebut sebagai kejutan pada tingkat molekuler. Kejutan yang beruntun dan rekombinasi gen yang baru kemungkinan dapat memacu perubahan fenotip pada tanaman transforman, dalam hal ini

fenotip anggrek *P. amabilis* transforman 35S::*AS2*.

Ukuran panjang daun dari tanaman transforman 35S::*AS2* hanya sepertiga dari panjang daun tanaman nontransforman. Hal itu kemungkinan merupakan awal dari proses rudimentalisasi tanaman transforman. Lin *et al.*¹⁷ menjelaskan bahwa ekspresi gen *AS2* menyebabkan penekanan ekspresi gen *KNOX*, seperti *Brevipedicellus (BP)/KNAT1*, *KNAT2* dan *KNAT6*. Gen *KNOX* merupakan gen yang berfungsi untuk mengatur pembentukan, perkembangan dan pemeliharaan meristem ujung batang agar sel-selnya tetap meristematis. Penekanan ekspresi dari gen tersebut menyebabkan sel-sel tidak bersifat meristematis kembali. Pada tanaman transforman 35S::*AS2*, ekspresi dari gen *AS2* menyebabkan penekanan (*repression*) ekspresi ektopik gen *KNOX*, sehingga kemungkinan daun tanaman transforman mengalami penghambatan perkembangan atau malah perkembangannya terhenti dengan cepat dan menyebabkan ukuran daun menjadi lebih kecil.

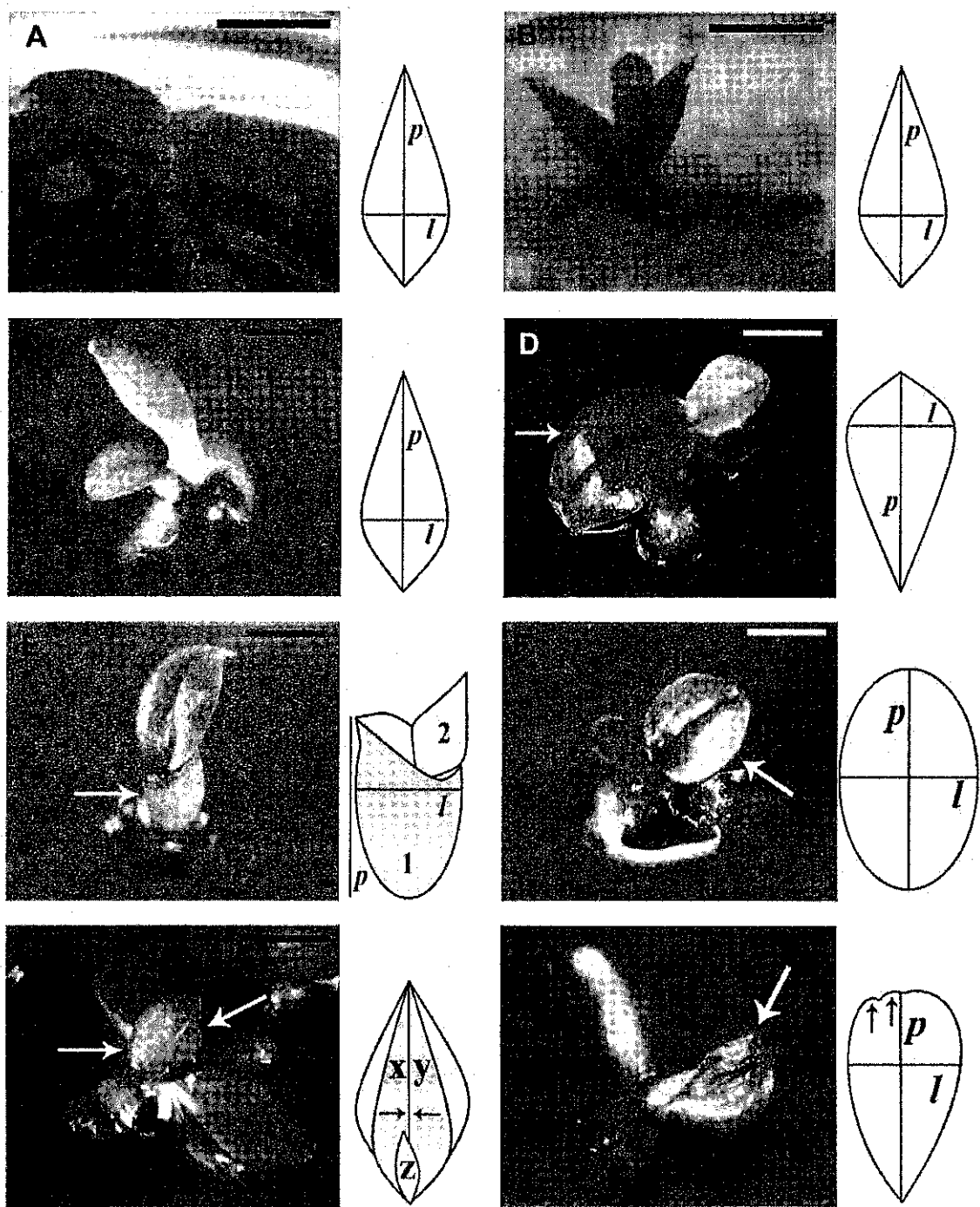
Perbedaan ukuran tersebut merupakan salah satu indikasi berhasilnya insersi gen *AS2* ke dalam genom tanaman anggrek *P. amabilis*. Akibat lain yang dapat diamati adalah perbedaan bentuk daun pada tanaman transforman 35S::*AS2* apabila dibandingkan dengan tanaman non-transforman. Pada 79 tanaman transforman 35S::*AS2*, terdapat variasi bentuk daun yang dapat dikelompokkan menjadi 6 macam bentuk daun dengan ciri khas masing-masing (Tabel 3 dan Gambar 3).

Tanaman hasil transformasi mempunyai variasi bentuk daun antara lain tipe daun normal, daun rektangular, daun terompet, daun oval, daun berfusi, dan daun berlobi (Gambar 3). Adanya

Tabel 3. Pembagian Klaster Tanaman *P. Amabilis* Transforman 35S::*AS2* Berdasarkan Variasi Bentuk Daun

Genotip	Σ tanam-an	Macam Klaster (Fenotip)					
		W	R	T	F	L	O
Non Transforman	100	100 (100%)	-	-	-	-	-
p35S	64	64 (100%)	-	-	-	-	-
p35S:: <i>AS2</i>	79	24 (30,38%)	21 (26,58%)	2 (2,53%)	2 (2,53%)	3 (3,80%)	27 (34,18%)

W: *wildtype-like*, R: rektangular, T: terompet, F: fusi, L: lobi, O: oval



Gambar 3. Fenotip daun anggrek *P. amabilis* tanaman transforman 35S::AS2 A (Tanaman nontransforman) B (Tanaman transforman 35S), C – H Variasi bentuk daun tanaman transforman 35S::AS2, C (*Wildtype-like*), D (daun rectangular), E (daun terompet), F (daun oval), G (daun berfusi), H (daun berlobi). Anak panah warna putih pada D menunjukkan daun rectangular, pada E menunjukkan daun terompet, pada F menunjukkan daun oval, pada G menunjukkan daun berfusi, dan pada H menunjukkan lobus daun. Sketsa di sebelah kanan gambar A & B menunjukkan sketsa daun tipe normal (*wildtype*); C, sketsa *wildtype-like*; D, sketsa tipe rectangular; E, sketsa tipe terompet; F, sketsa tipe oval; G, sketsa tipe berfusi; dan H, sketsa tipe berlobi. Huruf pada sketsa: *p*: panjang daun, *l*: lebar daun; *x*, *y* dan *z* pada sketsa G menunjukkan daun yang berbeda. Angka (1 & 2) pada E menunjukkan urutan daun, warna pada sketsa menunjukkan bagian permukaan daun: putih adaksial, abu-abu: abaksial. Tanda panah warna biru menunjukkan tempat dua daun berfusi, panah warna hitam menunjukkan lobus. Semua foto diambil 7 bulan setelah transformasi. Bar pada A dan B: 1 cm, pada C – H: 0,5 cm

perubahan bentuk daun pada tanaman transforman 35S::AS2 mengindikasikan adanya suatu perubahan proses fisiologi molekuler pada perkembangan daun. Kemungkinan hal tersebut dikarenakan adanya gen yang mempunyai fungsi yang sama dengan AS2 pada *P. amabilis* (heterologus). Aktivasi gen AS2 dan heterologusnya pada tanaman *P. amabilis* dapat menyebabkan penekanan ekspresi gen *KNOX* tanaman *P. amabilis*¹⁸, yang diekspresikan dengan abnormalitas bentuk daun, seperti yang terjadi pada tanaman *Arabidopsis* yang mengalami mutasi gen AS2.

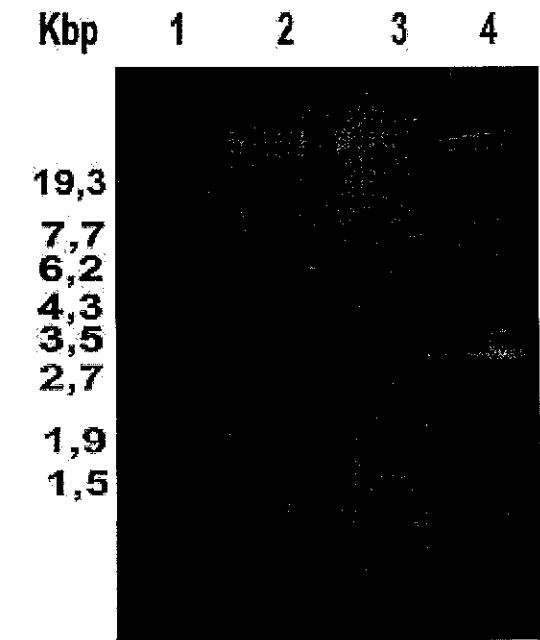
Hasil Analisis PCR

Tingkat keberhasilan teknik transformasi dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti struktur plasmid vektor dan plasmid rekombinan. Transformasi 35S::AS2 pada genom anggrek *P. amabilis* ini menggunakan pGreen sebagai vektor dan p35S::AS2 sebagai plasmid rekombinan.

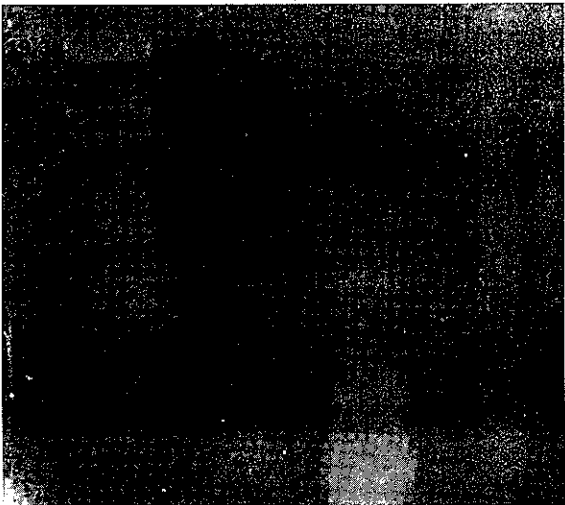
Tanaman transforman yang mampu bertahan pada medium NP yang mengandung antibiotik diduga telah berhasil membawa konstruksi p35S::AS2.

Hasil isolasi DNA genom tanaman non transforman, transforman 35S dan 35S::AS2 pada Gambar 4 menunjukkan bahwa genom yang terisolasi ukurannya lebih besar dari 19,3 kb. Pada hasil elektroforegram isolasi DNA genom terdapat bayangan (*smear*) di bawah genom yang mengindikasikan masih adanya kontaminan yang tertinggal pada DNA. Selain senyawa fenol, protein dan polisakarida, kemungkinan terdapat juga RNA yang tervisualisasi sebagai bayangan tersebut.

Hasil amplifikasi gen AS2 pada DNA genom tanaman pada Gambar 5 menunjukkan bahwa DNA genom tanaman nontransforman tidak dapat diamplifikasi dengan primer spesifik untuk gen AS2. Hal ini dikarenakan tidak terdapatnya urutan nukleotida yang dapat dikenali oleh primer



Gambar 4. Elektroforegram hasil isolasi DNA genom tanaman anggrek *P. amabilis*. Lajur 1 DNA marka ϕ /StyI yang dipotong dengan enzim restriksi StyI, Lajur 2. DNA genom tanaman non transforman *P. amabilis*, Lajur 3. DNA genom tanaman transforman 35S, Lajur 4. DNA genom tanaman transforman 35S::AS2



Gambar 5. Struktur DNA dan hasil amplifikasi transgen AS2 pada genom anggrek transforman *P. amabilis* dengan metode PCR menggunakan primer universal dan primer spesifik terhadap gen AS2. Lajur 1. DNA marka ϕ /StyI yang dipotong dengan enzim restriksi StyI; Lajur 2 amplifikasi genom tanaman non transforman dengan primer spesifik AS2; Lajur 3. amplifikasi genom tanaman transforman 35S (pGreen) dengan primer universal Fw 60 Rev 59 menghasilkan fragmen sepanjang 1,75 kbp; Lajur 4. amplifikasi genom tanaman transforman 35S::AS2 dengan primer spesifik AS2 ORF15 F2 dan ORF15 R2 menghasilkan fragmen sepanjang 0,6 kbp

spesifik *AS2* karena tanaman nontransforman tidak ditransformasi dengan gen *AS2*. Fragmen DNA hasil amplifikasi 35S::*AS2* menggunakan primer spesifik *AS2* menghasilkan fragmen DNA sepanjang 600 bp. Hal tersebut membuktikan bahwa gen *AS2* telah terinsersi ke dalam kromosom tanaman anggrek *P. amabilis*.

KESIMPULAN

Transformasi gen *Arabidopsis AS2* pada protokorm anggrek *P. amabilis* yang dilakukan dengan mediator *A. tumefaciens strain* LBA4404 berhasil mendapatkan 79 tanaman transforman *AS2* dengan efisiensi 0,99%. Sedangkan transformasi vektor p35S (pGreen) menghasilkan efisiensi 1,38%. Keberhasilan transformasi ditandai dengan perubahan fenotip, khususnya bentuk daun tanaman transforman dan berhasil teramplifikasinya fragmen transgen *Arabidopsis AS2* yang berukuran 0,6 kbp. Oleh karena itu, dapat disimpulkan pula bahwa dalam tanaman anggrek *P. amabilis* terdapat gen yang mempunyai fungsi yang sama dengan gen *Arabidopsis AS2*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini merupakan bagian dari rangkaian proyek penelitian yang didukung oleh Kementerian Pendidikan, Ilmu dan Kebudayaan dan Olahraga Jepang melalui bantuan untuk *Scientific Research on Priority Areas* (No. 14036216 untuk Yashunori Machida dan No. 16027250 untuk Chiyoko Machida) oleh *Core Research for Evolutional Science and Technology* (CREST) dari Japan Science and Technology Corporation, serta oleh "*Academic Frontier*". Penulis secara khusus mengucapkan terima kasih atas bantuan dan dukungan tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- ¹Semiarti, E., Y. Ueno, H. Tsukaya, C. Machida and Y. Machida. 2001. "The *ASYMMETRIC LEAVES2* GENE of *Arabidopsis thaliana* regulates formation of asymmetric lamina, establishment of venation and repression of meristem-related homeobox genes in leaves". *Plant Development*, 128: 1771–1783
- ²Xu, L., Y. Xu, A. Dong, Y. Sun, L. Pi, Y. Xu and H. Huang. 2003. "Novel *as1* and *as2* defects in leaf adaxial-abaxial polarity reveal the requirement for *ASYMMETRIC LEAVES1* and 2 and *ERECTA* functions in specifying leaf adaxial identity". *Development*, 130: 4097–4107
- ³Nadeau, J.A., X.S. Zhang, J. Li and S.D. O'Neill. 1996. "Ovule development: identification of stage-specific and tissue specific cDNAs". *Plant Cell*, 8: 213–239
- ⁴Yu, H and J. Goh. 2001. "Molecular Genetics of Reproductive Biology in Orchids". *Plant Physiology*, 127: 1390–1393
- ⁵Islam, M.O., S. Ichihashi and S. Matsui. 1998. "Control of growth and development of *Protocorm Like Body* derived from callus by carbon source in *Phalaenopsis*". *Plant Biotechnology*, 15: 183–187
- ⁶Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJJ, and Schilperoort RA. 1983. "A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid". *Nature*, 303: 179–180
- ⁷Hellens, R.P., E.A. Edwards, N.R. Leyland, S.Bean and P.M. Mullineaux. 2000. "pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation". *Plant Molecular Biology* 42: 819–832
- ⁸Nan, G.L., Tang C.S., Kuehnle A.R., and Kado C.I. 1997. "Dendrobium orchids contain an inducer of *Agrobacterium* virulence genes". *Physiol Mol Plant Pathol*, 51: 391–399
- ⁹Mishiba, K., D.P. Chin, and M. Mii. 2005. "Agrobacterium-mediated transformation of *Phalaenopsis* by targeting protocorms at early stages after germination". *Plant Cell Reports* 24: 297–303
- ¹⁰Galun, E. dan A. Breiman. 1998. *Transgenic Plants*. London: Imperial College Press.
- ¹¹Handayani, E. 2004. Transformasi gen *AS2* (*ASYMMETRIC LEAVES2*) *Arabidopsis thaliana* pada anggrek bulan *Phalaenopsis amabilis* (l.). BI. Thesis. Program Studi Bioteknologi. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.
- ¹²Kojima, S., H. Banno, Y. Yoshioka, A. Oka, C. Machida dan Y. Machida. 1999. "A binary vector plasmid for gene expression in plant cells that is stably maintained in agrobacterium cells". *DNA Research*, 6: 407–410
- ¹³Brown, T.A. 1991. "Pengantar Kloning Gena". Dalam Muhammad, S.A. dan Praseno (penerjemah).

Cloning Gene, an Introduction. Yogyakarta: Yayasan Essentia Medica.

- ¹⁴Ohba, T., Y. Yoshioka, C. Machida dan Y. Machida. 1995. "DNA rearrangement associated with the integration of T-DNA in tobacco; and examples for multiple duplications of DNA around the integration target". *Plant Journal*, 7(1): 157–164
- ¹⁵Howel, S.H. 1998. *Molecular Genetics of Plants Development*. United Kingdom: Cambridge University Press.
- ¹⁶Leyser, O. and S. Day. 2003. *Mechanism in Plant Development*. New York: Blackwell Publishing.

- ¹⁷Lin, Wc., B. Shuai, and P.S. Springer. 2003. "The Arabidopsis *LATERAL ORGAN BOUNDARIES*-domain gene *ASYMMETRIC LEAVES2* functions in the repression of *KNOX* gene expression and in adaxial-abaxial patterning". *The Plant Cell*, 15: 2241–2252
- ¹⁸Semiarti, E., N. Suseno, M. Raharjo, V.E. Windiastri, S. Isminingsih, C. Machida and Y. Machida. 2006. "Shoot Development Programs in Transgenic Orchid Plants". *Proceeding of International Chemistry, Mathematics and Natural Science Seminar*, Institut Teknologi Bandung, Bandung. 28–29 November 2006.