

STUDI PERBANDINGAN METODE TRANSFORMASI DNA MENGGUNAKAN VEKTOR *Agrobacterium tumefaciens* PADA TANAMAN TEBU (*Sacharum hybrid*)

Sri Setyati*, Purnama Oktaviandari*, Muhammad Hazmi**, dan Bambang Sugiharto***

* Pusat Penelitian Biologi Molekul dan *** Fakultas Matematika dan Pengetahuan Alam Universitas Jember

** Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Jember.

ABSTRACT

In order to compare transient expression of gus gene driven by CaMV 35S and rice ubiquitin RUBQ2 promoters, a DNA transformation was conducted using embryogenic callus and suspension cultures of sugarcane. The transient gus expression was observed by histochemical staining method. The histochemical observation of GUS activity after co-cultivation showed that RUBQ2 promoter produced high level of clear blue spots both in embryogenic callus and suspension cultures, while the CaMV35S promoter was not detected. The suspension cultures slightly increased transient gus gene expression compared to embryogenic callus. However, the histochemical analysis of regenerated putative transformant plants after 5 successive cycles on the selection medium showed no blue spots of gus gene expression. PCR amplification of DNA for CaMV35 or nptII in putative transformant plants confirmed that there was no integration of the transformed gene in the genome DNA. The results suggested a possibility of somaclonal variation with callus propagation, thus did not produce transformed plants. To avoid the somaclonal variation, the transformation was conducted using in vitro plants and multiple shoots without intervening callus phase. Histochemical observation of infected materials after co-cultivation showed that almost all of the infected materials partially exhibited blue color in the basal region. In case of in vitro plants, they rapidly grow and multiplied in the selection medium, thus the method provided an excellent system for the transformation in sugarcane. The results suggest that in vitro plants as well as multiple shoots need further investigation to be used as target tissues for Agrobacterium-mediated transformation in sugarcane.

Key words: DNA transformation, *Agrobacterium tumefaciens*, rice ubiquitin promoter, CaMV35S promoter, sugarcane

PENGANTAR

Teknik pemuliaan tanaman telah banyak digunakan dalam perbaikan sifat-sifat tanaman yang mempunyai nilai ekonomis penting. Akan tetapi teknik tersebut memerlukan tenaga dan waktu banyak, seperti yang ada pada tanaman tebu. Perkembangan bioteknologi menawarkan teknik transformasi DNA untuk memasukkan gen penting dalam perbaikan sifat tanaman, di mana hal semacam itu tidak dapat dilakukan menggunakan teknik pemuliaan tanaman.

Perkembangan bioteknologi tanaman saat ini menunjukkan bahwa transformasi DNA menggunakan *Agrobacterium* telah berhasil dilakukan pada tanaman monokotil seperti padi (Rainieri *et al.*, 1990; Park *et al.*, 1996), jagung (Ishida *et al.*, 1996), dan pisang (May *et al.*, 1995). Metode ini memberikan beberapa keuntungan seperti, tekniknya sederhana, tidak banyak mengubah genom tanaman transforman, dan mampu mentransfer DNA lebih besar. Walaupun metode menggunakan *Agrobacterium* telah dicobakan pada tanaman tebu (Arencibia *et al.*, 1998; Enriquez-Obregon *et al.*, 1998), tetapi rendahnya akurasi hasil untuk dapat diulang kembali, menyebabkan teknik ini

masih perlu diperbaiki untuk dapat dimanfaatkan secara rutin.

Promoter DNA merupakan elemen regulator atau pengendali yang secara langsung mengendalikan ekspresi gen baik secara konstitutif maupun spesifik. Ada beberapa tipe promoter yang dapat mengendalikan ekspresi gen secara kuat, konstitutif atau secara spesifik. Sebagai contoh, promoter Cauliflower Mosaic Virus 35S (CaMV 35S) biasanya digunakan pada transformasi beberapa tanaman dikotil maupun monokotil. Namun aktivitas promoter CaMV 35S ini rendah pada tanaman tebu (Chowdhury *et al.*, 1992). Promoter *actin* padi 1 dan elemen *emu* menunjukkan aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan CaMV 35S pada jaringan tebu (Gallo-Meager dan Ervine, 1996), dan saat ini dilaporkan bahwa promoter *ubiquitin* padi RUBQ2 mempunyai ekspresi lebih tinggi pada tanaman transgenik tebu (Liu *et al.*, 2003). Oleh karena itu, studi perbandingan beberapa tipe promoter pada transformasi tebu penting untuk melihat efisiensinya.

Pertimbangan utama dalam transformasi DNA adalah munculnya sifat yang dikehendaki pada tanaman

transgenik. Selain sifat dari DNA yang ditransformasikan tidak dikehendaki munculnya sifat lain yang berbeda dengan tanaman asalnya. Akan tetapi metode regenerasi tanaman menggunakan kultur kalus sering memunculkan terjadinya risiko variasi somaklonal, khususnya pada tebu (Lee, 1987). Variasi somaklonal telah dilaporkan pada tanaman transgenik tebu resisten terhadap insekta yang diperoleh dari elektroforasi embriogenik tebu (Arencibia *et al.*, 1999). Regenerasi secara langsung dari tanaman tanpa pembentukan kalus terlebih dahulu dilaporkan memerlukan waktu lebih pendek, efisiensi transformasi lebih tinggi sekitar 50%, dan dapat menekan terjadinya variasi somaklonal (Manickavasagam *et al.*, 2004).

Pada tulisan ini dilaporkan hasil penelitian transformasi gen *gus* yang dikendalikan oleh CaMV 35S dan *ubiquitin* padi RUBQ2 (Liu *et al.*, 2003) dengan target jaringan (eksplan) tebu yang berbeda.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan Tanaman

Kalus tebu dari cultivar Ni9 dan NiF4 didapat dari Laboratorium Crops Breeding, Japan International Research Center for Agricultural Sciences. Kalus dipropagasi menggunakan medium *Murashige-Skoog* (MS) ditambah 3 mg l⁻¹ 2,4 D (MS1) dalam kondisi gelap dengan suhu 26 °C dan setiap tiga minggu sekali disubkultur pada medium yang baru.

Tunas samping (*axillary buds*) diisolasi dari batang tebu (cultivar BL) yang diambil dari lapangan secara aseptik dan disterilkan menggunakan etanol 70%, selanjutnya ditumbuhkan pada media MS ditambah 0,1 Mgl⁻¹*6-benzyladenin* (BA) pada ruangan bercahaya bersuhu 26 °C selama 3 minggu untuk menghasilkan tanaman *in vitro*.

Persiapan Eksplan

Kalus disubkultur pada media MS1 baru dan diinkubasi dengan kondisi yang sama dengan interval 3 minggu. Kalus embriogenik (EC) diperoleh dengan menyeleksi kalus dengan ciri-ciri nodular, kompak, dan menunjukkan warna kekuningan (Matsuoka *et al.*, 2002). Kultur EC ditransfer pada MS1 cair untuk membuat kultur sel (SC) dengan cara seperti yang dilaporkan oleh Arencibia *et al.* (1998).

Tanaman pertama yang diperoleh dari tunas samping disubkultur pada media yang sama untuk memperoleh tunas dan diinkubasi pada kondisi yang sama. Tunas-tunas yang hijau dan sehat (\pm 3 cm) dipisahkan dan dikultur dalam MS tanpa hormon untuk memacu pertumbuhan akar pada tanaman *in-vitro* selama 2 minggu. Bagian basal (pangkal)

tunas tanaman ini (0,5 cm) dipisahkan dan digunakan sebagai eksplan untuk transformasi.

Plasmid Vektor dan Kultur *Agrobacterium*

Transformasi dilakukan dengan menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 yang mengandung plasmid pB1121 atau pCL4. Plasmid pB1121 (Toyobo, Inc) dan pCL4 berisi gen *gus* masing-masing dengan promotor CaMV35S dan *ubiquitin* padi (RUBQ2) (Liu *et al.*, 2003). Koloni tunggal *Agrobacterium* yang berisi masing-masing plasmid diinokulasi dalam 3 ml media YEP cair yang mengandung 50 mg l⁻¹ kanamisin dan 50 mg l⁻¹ rimfamicin dan diinkubasi pada *shaker inkubator* dengan suhu 28 °C selama 2 hari. Satu ml dari kultur *Agrobacterium* tersebut disubkultur pada 50 ml media YEP cair dan diinkubasi pada kondisi yang sama sampai mencapai OD₆₀₀ 0,8–1,0. Kemudian kultur *disentrifuga* pada 4000×*g* selama 10 menit dan sel bakteri disuspensi pada media 2 ml LB medium.

Infeksi *Agrobacterium* dan Ko-kultivasi

Kurang-lebih 2 gram EC atau SC dikumpulkan dan diberi perlakuan pengeringan di atas kertas saring steril di dalam *laminar air flow* selama 30 menit. EC dan SC ditempatkan dalam Erlemeyer yang berisi 50 ml media LB dan disonifikasi selama 5 menit. Infeksi *Agrobacterium* dilakukan dengan cara merendam EC dan SC dalam suspensi *Agrobacterium* (OD₆₀₀ akhir disetarkan 0,8) yang mengandung *acetosyringone* (100 mg l⁻¹), yang selanjutnya diinkubasi pada suhu 28 °C selama 30 menit. Sebelum ko-kultivasi, material yang telah terinfeksi dicuci satu kali dengan air steril kemudian dikeringkan dalam *laminar air flow*. Ko-kultivasi dilakukan dengan menginokulasi kalus yang diinfeksi pada media MSI padat berisi *acetosyringone* pada kondisi gelap dengan suhu 28 °C selama 3 hari.

Untuk infeksi tanaman *in-vitro*, bagian basal tanaman *in-vitro* ditusuk 4–5 kali menggunakan jarum steril dan tanaman yang telah dilukai direndam dalam suspensi *Agrobacterium* (OD₆₀₀ 1,0) yang mengandung *acetosyringone* (100 mg l⁻¹), selanjutnya diinkubasi pada *shaker* (150 rpm) pada suhu 28 °C selama 30 menit. Eksplan terinfeksi dikeringkan menggunakan kertas filter steril dan diinokulasi pada media MS padat yang menandung *acetosyringone*. Ko-kultivasi dilakukan selama 3 hari pada kondisi gelap dengan suhu 28 °C.

Seleksi dan Regenerasi Transforman

Bahan yang telah diko-kultivasi dicuci tiga kali dengan 500 mg l⁻¹ *cefotaxime* dan kemudian dikeringkan di atas kertas filter steril dalam *laminar air flow*. Materi yang

terinfeksi diinokulasi pada media MS yang berisi *cefotaxime* (500 mg l⁻¹) dan diinkubasi pada kondisi gelap (EC dan SC) dan ada sinar (tanaman *in-vitro*) pada suhu 26 °C selama satu minggu. Kemudian kultur ditransfer pada media seleksi yang mengandung antibiotik *geneticin* (50 mg l⁻¹) dan *cefotaxime* (500 mg l⁻¹), serta diinkubasi pada kondisi yang sama selama 2–3 minggu.

Kalus resisten (tahan) antibiotik yang tumbuh dari EC dan SC disubkultur pada media seleksi untuk regenerasi yang mengandung *cefotaxime* dan *geneticin* selama 3 minggu. Tunas yang tumbuh kemudian disubkultur pada media seleksi yang sama dan setelah 3 siklus subkultur, tanaman kemudian dipindahkan ke media seleksi untuk pembentukan akar selama 3 minggu. Tunas yang diperoleh dari kalus tunggal ditetapkan sebagai satu klon *putative transforman*.

Pengujian Ekspresi Gen *Gus*

Materi yang terinfeksi diuji ekspresi gen *gus* dengan prosedur histokimia sesuai metode yang ditunjukkan oleh Jefferson *et al.*, (1987) dengan beberapa modifikasi. Uji histokimia dilakukan terhadap eksplan terinfeksi EC, SC, dan tanaman *in-vitro* satu minggu setelah ko-kultivasi. Sampel dicuci satu kali dengan larutan 0,1 M bufer *potassium phosphate* (pH 7,0), dan kemudian diinkubasi dengan larutan yang mengandung 2% metanol, 0,3% Triton X-100, 0,5 mM *potassium ferricyanide*, 0,5 mM *potassium ferrocyanide* dan 0,5 mg ml⁻¹ 5-bromo-4-chloro-indolyl-β-D-glucoronide pada suhu 37 °C semalam. Pengamatan spot atau bercak berwarna biru karena adanya ekspresi gen *gus* dilakukan menggunakan mikroskop.

Analisis PCR

Total genomik DNA diisolasi dari daun yang masih muda tanaman *putative transforman* menggunakan Kit Dneasy Plant Mini Kit (Qiagen). Analisis PCR dilakukan

dengan DNA genom yang telah diisolasi menggunakan TaKaRa Ex Taq polymerase (Takara Bio Inc) dan satu set primer yang didesain dari sekuen DNA CaMV, *nptII* atau *gus*. Kondisi reaksi PCR yang digunakan untuk denaturasi, annealing, dan extention berturut-turut adalah pada 98 °C selama 10 detik, 55 °C selama 30 detik, 72 °C selama 1 menit dengan 30 siklus. DNA yang teramplifikasi kemudian dianalisis dengan elektroforesis pada 1% gel agarosa dan difoto.

HASIL

Transformasi Menggunakan Kalus Embriogenik (EC) dan Kultur Sel (SC)

Untuk membandingkan ekspresi sementara gen *gus* yang dikendalikan oleh promoter CaMV dan RUBQ2 dilakukan analisis histokimia. Pengamatan histokimia ekspresi gen *gus* setelah ko-kultivasi menunjukkan bahwa promoter ubiquitin padi RUBQ2 menghasilkan lebih banyak noda biru pada EC maupun SC, sementara promoter CaMV35S tidak terdeteksi (Gambar 1). Pengamatan dilakukan dengan menghitung sekurangnya satu noda biru yang mengekspresikan gen *gus* pada setiap gerombol kalus diberi nilai satu. Tabel 1 menunjukkan perbandingan ekspresi gen *gus* antara SC dan EC (Tabel 1). Hasilnya menyatakan bahwa promoter RUBQ2 merupakan elemen (DNA) regulator yang dapat memberikan ekspresi lebih tinggi dibandingkan CaMV35S pada transgen tebu.

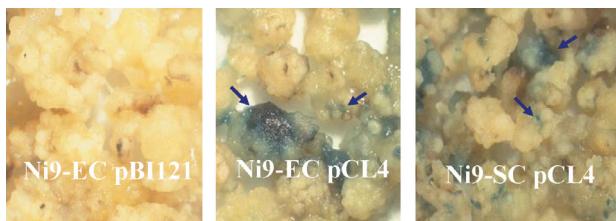
Untuk perbanyakan sel transforman, kalus yang telah diinfeksi dari EC mupun SC dikulturkan satu minggu setelah ko-kultivasi tanpa seleksi, kemudian ditransfer pada media seleksi induksi kalus. Kalus resisten terhadap antibiotik yang terbentuk selanjutnya disubkultur pada media seleksi untuk regenerasi. Kalus yang tidak transforman tidak menunjukkan pertumbuhan lebih lanjut dan berubah menjadi

Tabel 1. Perbandingan efektivitas transformasi menggunakan *Agrobacterium* LBA4404 dengan perbedaan kultivars, eksplan, dan plasmid vektor

Kultivar	Eksplan	Plasmid	Aktivitas GUS (%)*	Jumlah plantlet (%)	Jumlah Putative transformants	Aktivitas GUS (%)**
NiF4	EC	pBI121	ND	3,1	0	0
		pCL4	54	1,5	0	0
	SC	pBI121	ND	17,8	0	0
		pCL4	61,5	17,5	0	0
NiF9	EC	pBI121	ND	29,4	6	0
		pCL4	73	25,1	2	0
	SC	pBI121	ND	69,6	2	0
		pCL4	85,5	71,4	5	0

Data merupakan rerata dari dua eksperimen terpisah.

* Sesudah ko-kultivasi, ** pada daun *putative transformants*



Gambar 1. Perbedaan level ekspresi gen *gus* yang dikendalikan oleh promoter CaMV35S (pBI121) dan RUBQ2 (pCL4) pada EC dan SC. Noda biru menunjukkan ekspresi gen *gus* (tanda panah). Noda biru yang jelas terlihat pada setiap gerombol kalus dihitung dan datanya ditunjukkan pada Tabel 1. Gambar ini dihasilkan dengan menggunakan *stereoscopic microscopy*.



Gambar 2. Pertumbuhan *putative transformant* dari kultivar Ni9 pada media seleksi untuk pengakaran (kiri) dan sesudah subkultur pada media yang sama sesudah 3 minggu (kanan).

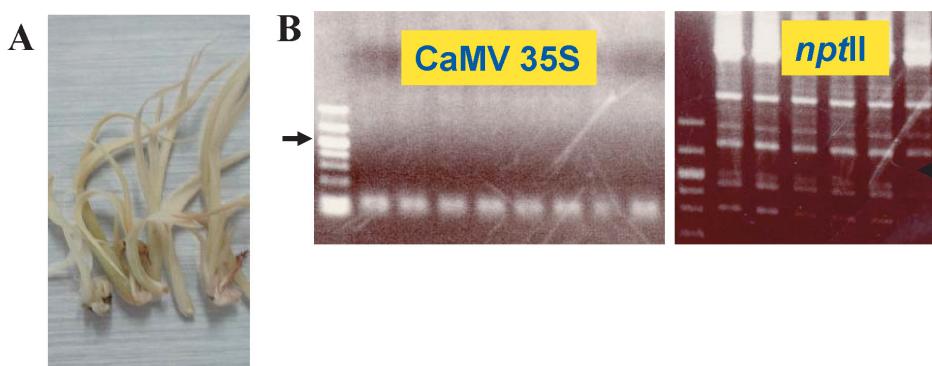
coklat, tetapi kalus yang transforman tumbuh menjadi tanaman. Di antara eksplan yang diuji, SC menunjukkan persentase regenerasi eksplan lebih tinggi dibandingkan EC (Tabel 1). Hal ini menyatakan bahwa pergantian media setiap 2 hari sekali pada SC memberikan tersedianya nutrisi lebih baik dan populasi sel yang meristematis lebih tinggi.

Pada SC dari cultivar Ni9 menghasilkan lebih banyak pertumbuhan planlet dibandingkan dari NiF4. Beberapa planlet Ni9 dapat membentuk akar dan tumbuh pada media seleksi dan dinamakan *putative transforman* (Gambar 2), tapi semua planlet dari NiF4 akarnya tidak tumbuh dan secara perlahan mati.

Putative transforman yang dibentuk dengan menginfeksi EC dan SC dari kultivar Ni9 diuji secara histokimia untuk ekspresi gen *gus* (Gambar 3a). Tampak bahwa semua daun yang diuji tidak menunjukkan adanya noda biru pada daun *putative transforman*. Untuk mengkonfirmasi hasil ini, genomik DNA diisolasi dari *putative transforman* dan digunakan untuk amplifikasi PCR dengan primer CaMV 35S dan nptII. Adanya band DNA yang sesuai dari CaMV (0,45 kb) dan nptII (0,5 kb) tidak terdeteksi dalam analisis PCR (Gambar 3b). Hasil ini menunjukkan bahwa gen yang ditransformasikan tidak dapat berintegrasi dengan genom *putative transforman* sehingga tidak menghasilkan tanaman transgenik.

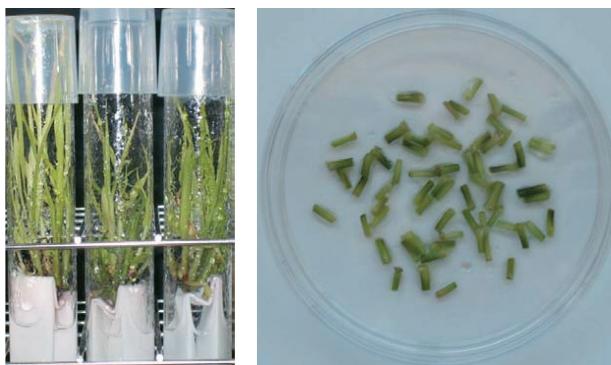
Transformasi Menggunakan Eksplan Tanaman *In-vitro*

Untuk menghindari terjadinya variasi somaklonal, transformasi dilakukan menggunakan tanaman *in-vitro* dan *multiple shoot*. Tunas samping diisolasi dari batang kultivar BL secara aseptis dan diinokulasikan pada medium untuk menghasilkan *multiple shoot* dan tanaman *in-vitro* (Gambar 4a). Bagian basal dari tanaman *in-vitro* dipotong dan dipisahkan dari tanaman, dan digunakan sebagai jaringan target untuk transformasi (Gambar 4b). Sesudah infeksi dan ko-kultivasi dilakukan analisis ekspresi gen *gus* dengan histokimia pada baik *multiple shoot* maupun tanaman *in-vitro*. Pengamatan histokimia menunjukkan hampir semua tanaman terinfeksi terlihat warna biru yang



Gambar 3. Analisis histokimia ekspresi gen *gus* pada tanaman *putative transformant* Ni9 (A) dan analisis elektroforesis gel agrose (1%) hasil amplifikasi PCR menggunakan primer CaMV 35S dan nptII (B).

Tidak ada spot biru menunjukkan bahwa ekspresi gen *gus* tidak ditemukan pada analisis histokimia. Demikian pula pita DNA untuk DNA CaMV (0,4 kb) dan nptII (0,5 kb) tidak diketemukan pada analisis elektroforesis.



Gambar 4. Perbanyakan tanaman *in-vitro* pada media MS padat (kiri) dan bagian basal dari tanaman *in-vitro* yang digunakan untuk transformasi.

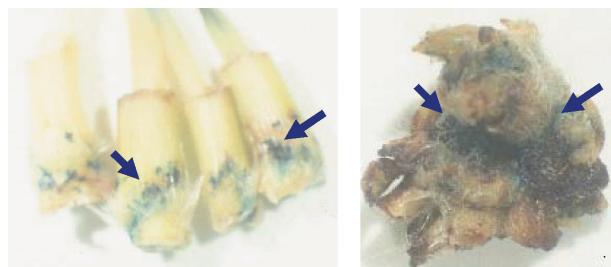
merupakan ekspresi gen GUS pada bagian basal tanaman *in-vitro* maupun *multiple shoot*.

Dalam hal tanaman *in-vitro* mereka dapat tumbuh dan berkembang dengan cepat dalam medium seleksi tetapi kontrol eksplan yang tidak terinfeksi mati (data tidak dipublikasikan). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penggunaan eksplan tanaman *in-vitro* maupun *multiple shoot* untuk transformasi memberikan harapan dan memerlukan penelitian lanjutan.

PEMBAHASAN

Tingginya ekspresi gen *gus* yang dikendalikan oleh promoter RUBQ2 pada kalus yang terinfeksi sama dengan hasil yang dilaporkan sebelumnya oleh Liu *et al.* (2003). Akan tetapi berdasarkan uji histokimia, ekspresi gen *gus* tidak ditemukan pada tanaman *putative transforman* yang berasal dari kalus embrionik dan suspensi sel. Tidak adanya transgen pada genom tanaman tersebut telah dikonfirmasi dengan analisis PCR yang menggunakan primer gen CaMV dan nptII (Gambar 3b).

Regenerasi secara langsung dari eksplan tanpa melalui fase pengkalusan dapat mengurangi atau meminimalkan perubahan genetik karena adanya variasi somaklonal. Oleh karena itu, penggunaan tanaman *in-vitro* sebagai eksplan untuk transformasi dimaksudkan untuk mengurangi terjadinya variasi somaklonal (Tailor dan Dukie 1993; Manichavasagam *et al.*, 2004), sehingga tulisan ini memunculkan suatu ide transformasi menggunakan *multiple shoot* dan tanaman *in-vitro* pada tebu. Pengamatan histokimia pada *multiple shoot* dan tanaman *in-vitro* yang terinfeksi menunjukkan adanya warna biru yang jelas pada bagian basal tanaman tersebut. Spot warna biru tersebut menunjukkan adanya ekspresi gen *gus* dan keberhasilan transformasi. Walaupun ekspresi gen *gus* belum dapat



Gambar 5. Analisis histokimia ekspresi gen *gus* pada tanaman *in-vitro* dan *multiple shoots*. Bercak (spot) warna biru pada bagian pangkal eksplan menunjukkan adanya ekspresi gen *gus* (tanda panah).

dikonfirmasi keberadaannya pada tanaman *in-vitro* yang tumbuh sesudah 5 kali siklus seleksi pada media yang mengandung antibiotik, namun metode transformasi ini perlu dikembangkan.

Manickavasagam *et al.* (2004) melaporkan bahwa transformasi genetik menggunakan tunas samping (*axillary buds*) tanaman tebu menghasilkan efisiensi transformasi tinggi sekitar 50% dan dalam waktu 5 bulan dapat dihasilkan tanaman tebu transforman. Akan tetapi, sumber eksplan yang diambil dari tunas samping tanaman tebu yang ditumbuhkan di lapangan menimbulkan masalah kesulitan dalam sterilisasi eksplan dan sesudah ditumbuhkan pada media secara *in-vitro* lambat pertumbuhannya (*unpublished data*). Oleh karena itu, keberhasilan penggunaan tanaman *in-vitro* sebagai eksplan untuk transformasi diharapkan dapat menghindarkan permasalahan tersebut. Beberapa perlakuan perlu dikembangkan utamanya untuk meningkatkan pembentukan tunas-tunas baru sesudah ko-kultivasi dengan *Agrobacterium*, seperti penggunaan media dengan kandungan sukrosa tinggi (50 gram per liter). Secara keseluruhan pengembangan metode transformasi menggunakan eksplan tanaman *in-vitro* ini perlu disempurnakan karena lebih sederhana, pertumbuhan eksplan lebih cepat, dan dapat mengurangi risiko variasi somaklonal.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Hibah Penelitian Tim Pascasarjana Dirjen Dikti Departemen Pendidikan Nasional Tahun Anggaran 2005–2007.

KEPUSTAKAAN

Arencibia AD, Carmona ER, Tellez P, Chan MT, Yu SM, Trujillo LE, Oramas P, 1998. An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum spp L.*) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Transgenic Res* 7: 213–222

- Arencibia AD, Carmona ER, Cornide MT, Castiglione S, O'Reilly J, Chine A, Oramas P, Sala F, 1999. Somaclonal variation in insect-resistant transgenic sugarcane (*Saccharum hybrid*) plants produced by cell electrophoration. *Transgenic Res* 8: 349–360.
- Chowdhury MKU, Vasil IK, 1992. Stably transformed herbicide resistance callus of sugarcane via microprojectile bombardment of cell suspension cultures and electrophoration of protoplasts. *Plant Cell Rep* 11: 494–498.
- Enriquez-Obregon GA, Vazquez-Padron RI, Pietro-Samsonov DL, Dela Riva GA, Selman-Housein G, 1998. Herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Planta* 206: 20–27.
- Gallo-Meagher M dan Irvine JM, 1996. Herbicide resistant transgenic sugarcane plants containing the *bar* gene. *Crop Sci* 36: 1367–1374.
- Ishida Y, Saito H, Ohta S, Hiei Y, Komari T, Kumashiro T, 1996. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nat Biotechnol* 14: 745–750.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan NW, 1987. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6: 3901–3907
- Lee TSG, 1987. Micropropagation of sugarcane. *Plant Cell Tissue Org Cult* 10: 47–55.
- Liu D, Oard SV, Oard JH, 2003. High transgene expression levels in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) driven by the rice ubiquitin promoter RUBQ2. *Plant Sci* 165: 743–750.
- Manickavasagam M, Ganapathi A, Anbazhagan VR, Sudhakar B, Selvaraj N, Vasudevan A, Kasthuriengen S, 2004. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and development of herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum species* hybrids) using axillary buds. *Plant Cell Rep* 23: 134–143.
- Matsuoka M, Arifin S, Terauchi T, Tamura Y, Tanio M, Hayakawa A, Miwa H, 2002. Transformation of sugarcane cell mediated by *Agrobacterium* and subsequent shoot regeneration. *Japanese Journal of Tropical Agriculture*. 46: 11–12.
- May GD, Afza R, Mason HA, Wiecko A, Novak FJ, Arntzen CJ, 1995. Generations of transgenic banana (*Musa acuminata*) plants via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Biotechnology* 13: 486–492.
- Park SH, Pinson SRM, Smith RH, 1996. T-DNA integration into genomic DNA of rice following *Agrobacterium* inoculation of isolated shoots apices. *Plant Mol Biol* 32: 1135–1148.
- Raineri DM, Bottino P, Gordon MP, Nester EW, 1990. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice (*Oryza sativa* L.). *Biotechnology* 8: 33–38.
- Taylor PWJ, Dukie S, 1993. Development of an *in vitro* culture technique for conservation of *Saccharum spp.* hybrids germ-plasm. *Plant Tissue Organ Cult* 34: 217–222.

Reviewer: Dr. Y. Sriwulan M., MSi.