

Konstruksi dan Ekspresi Transien Kaset Kimera yang Mengandung Fusi Promotor CaMV 35S atau *OsAER1* dan Gen *GUS* pada Tembakau

(Construction and Transient Expression of Chimeric Cassettes Containing CaMV 35S or *OsAER1* Promoter and *GUS* Gene Fusion in Tobacco)

Aniversari Apriana^{1*}, Atmitri Sisharmini¹, Hajrial Aswidinnoor², Kurniawan R. Trijatmiko¹, dan Sudarsono²

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111 Indonesia
Telp. (0251) 8622833; Faks. (0251) 8622833; *E-mail: aniversari@pertanian.go.id, nanas_setyawan@yahoo.com

²Program Studi Pemuliaan dan Bioteknologi Tanaman, Departemen Agronomi dan Hortikultura, Institut Pertanian Bogor, Jl. Meranti, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680 Indonesia

Diajukan: 30 Agustus 2018; Direvisi: 17 Oktober 2018; Diterima: 22 Oktober 2018

ABSTRACT

Reporter gene assays are commonly used to study the expression pattern of a gene and the promoter activity. The aims of this study were to assemble the chimeric gene constructs consisting of CaMV 35S promoter or *OsAER1* gene promoter connected to the β -glucuronidase (*GUS*) reporter gene encoding the β -glucuronidase enzyme and to obtain an efficient method for *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transient transformation of tobacco sprouts. The CaMV 35S promoter fragment reamplified from pCambia1301 binary vector and the *OsAER1* gene promoter fragment amplified from rice cv. Awan Kuning were ligated into pCambia1300int::gus::tNOS to produce binary vectors pCambia1300int::p35S::gus::tNOS and pCambia1300int::prOsAER1::gus::tNOS. The vectors were used for transient transformation of a 5-day old tobacco seedling. Transient transformation was carried out using two bacterial cultures with densities of OD₆₀₀ = 0.5 and OD₆₀₀ = 1.0 combined with a vacuum treatment for 15 and 30 minutes each. Tobacco seedlings transformed with pCambia1300int::p35S::gus::tNOS showed higher transformation efficiency as compared to the ones transformed with pCambia1300int::prOsAER1::gus::tNOS. A higher efficiency was obtained from transformation using bacterial culture with density of OD₆₀₀ = 0.5 in combination with a vacuum treatment for 30 minutes. Expression of *GUS* gene in the tobacco sprouts transformed with CaMV 35S promoter construct was observed throughout the sprouts tissues (root, hypocotyl, cotyledon, and leaf), whereas expression of *GUS* gene was observed in root, hypocotyl, and cotyledon, but not in leaf on tobacco sprouts transformed with *OsAER1* promoter construct. These results indicate that the transient transformation is a quick and simple method for testing the expression of a chimeric gene construct.

Keywords: *GUS* gene, tobacco, transient transformation, gene expression.

ABSTRAK

Uji gen pelapor umumnya digunakan untuk mempelajari pola ekspresi gen dan aktivitas promotor. Tujuan penelitian ini adalah merakit konstruk gen kimera yang terdiri atas promotor konstitutif CaMV 35S atau promotor gen *OsAER1* yang disambungkan dengan gen pelapor *GUS* yang menyandi enzim β -glucuronidase dan mendapatkan metode transformasi transien yang efisien pada kecambah tembakau utuh dengan bantuan *Agrobacterium tumefaciens*. Fragmen promotor CaMV 35S yang diisolasi dari vektor biner pCambia1301 dan promotor gen *OsAER1* yang diamplifikasi dari DNA padi cv. Awan Kuning masing-masing diligasasi ke pCambia1300int::gus::tNOS untuk menghasilkan vektor biner pCambia1300int::p35S::gus::tNOS dan pCambia 1300int::prOsAER1::gus::tNOS. Kedua konstruk vektor ini digunakan untuk transformasi transien kecambah tembakau berumur 5 hari. Transformasi transien tembakau dilakukan dengan menggunakan dua kepadatan bakteri (OD₆₀₀ = 0,5 dan OD₆₀₀ = 1,0) yang dikombinasikan dengan perlakuan vakum selama 15 menit dan 30 menit. Kecambah tembakau yang ditransformasi dengan pCambia 1300int::p35S::gus::tNOS menunjukkan efisiensi transformasi yang lebih tinggi dibanding dengan yang ditransformasi dengan pCambia1300int::prOsAER1::gus::tNOS. Efisiensi transformasi yang lebih tinggi diperoleh pada transformasi menggunakan bakteri dengan kepadatan OD₆₀₀ = 0,5 dikombinasikan dengan perlakuan vakum selama 30 menit. Ekspresi gen *GUS* pada kecambah tembakau yang ditransformasi dengan konstruk promotor CaMV 35S diamati di seluruh organ kecambah tembakau (akar, hipokotil, kotiledon, dan daun), sedangkan ekspresi gen *GUS* pada kecambah tembakau yang ditransformasi dengan konstruk promotor gen *OsAER1* terjadi di bagian akar, hipokotil, dan kotiledon, tetapi tidak di daun. Hasil ini menunjukkan bahwa transformasi transien merupakan metode yang cepat dan sederhana untuk pengujian konstruk gen kimera.

Kata kunci: Gen *GUS*, tembakau, transien transformasi, ekspresi gen.

PENDAHULUAN

Studi analisis fungsi gen berkembang pesat sejak selesainya proyek sekuensing genom tanaman model *Arabidopsis* (The Arabidopsis Genome Initiative 2000) dan padi (International Rice Genome Sequencing Project 2005). Kemajuan teknik bioinformatika saat ini dapat memprediksi fungsi suatu gen secara *in silico*, namun diperlukan metode untuk mendapatkan bukti eksperimental bahwa suatu gen dapat mengekspresikan suatu protein pada genom tanaman. Dalam studi analisis fungsi suatu gen, transformasi genetik merupakan sarana untuk menyisipkan transgen ke dalam genom tanaman sehingga dapat digunakan untuk membuktikan ekspresi gen tersebut pada tanaman (Li et al. 2009; Lu et al. 2017). Namun demikian, hal tersebut dibatasi oleh masih sangat sedikitnya metode transformasi genetik yang dapat diterapkan pada spesies tanaman, terutama tanaman rekalsitran.

Metode transformasi genetik yang murah dan banyak dipraktikkan adalah dengan bantuan *Agrobacterium tumefaciens* pada tanaman model *Arabidopsis* (Marion et al. 2008; Li et al. 2009; Dehestani et al. 2010; Tsuda et al. 2012) dan tembakau (Shamloul et al. 2014; Dickey et al. 2017). Efisiensi transformasi tanaman dengan bantuan *A. tumefaciens* dapat ditingkatkan dengan menginduksi ekspresi gen *vir* dengan penambahan asetosirgongin pada media infeksi dan kokultivasi, optimalisasi pH media infeksi, dan suhu kokultivasi (Kutty et al. 2010; Muhammad et al. 2010). Selain itu, penggunaan surfaktan dan perlakuan vakum (Dehestani et al. 2010; Elfahmi et al. 2014; Guo et al. 2015), kepadatan bakteri (Dehestani et al. 2010; Li et al. 2017), serta lamanya kokultivasi (Li et al. 2017) juga dapat memengaruhi efisiensi terjadinya transformasi.

Untuk mendapatkan tanaman transgenik yang mengekspresikan suatu gen secara stabil, biasanya diperlukan waktu yang lama sehingga teknik transformasi transien saat ini telah banyak dikembangkan untuk membantu karakterisasi fungsi gen secara cepat dan sederhana (Arcos-Ortega et al. 2010). Transformasi transien dapat dilakukan dengan menggunakan tanaman utuh, kecambah, atau potongan organ sebagai materi untuk ditransformasi. Selain dikembangkan untuk analisis fungsi gen secara *in vivo*, metode transformasi transien juga dapat digunakan untuk mengevaluasi aktivitas promotor baru, analisis lokalisasi subseluler suatu protein, studi interaksi antarprotein (*protein-protein interaction*), dan studi aktivitas promotor pada tanaman (Takata dan Eriksson 2012; Tsuda et al. 2012; Mangano et al. 2014;

Krenek et al. 2015). Wu et al. (2014) mengembangkan sistem transformasi *Agrobacterium-mediated Enhanced Seedling Transformation* (AGROBEST) yang digunakan untuk menganalisis fungsi gen dengan menggunakan kecambah utuh tanaman *Arabidopsis*. Dengan teknik transformasi transien, lokasi aktivitas suatu promotor baru yang mengendalikan ekspresi suatu gen pada tanaman dapat diketahui dengan tepat dan cepat (Xiong et al. 2016). Menurut Arcos-Ortega et al. (2010), hanya dibutuhkan waktu 5–8 hari sejak transformasi hingga didapatkan informasi pola ekspresi gen reporter pada tanaman transgenik.

Promotor CaMV 35S (Odell et al. 1985) adalah promotor yang diisolasi dari genom *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) dan merupakan jenis promotor kuat yang dapat mengendalikan ekspresi gen secara konstitutif hampir di semua tipe sel dan jaringan tanaman serta di semua tahapan perkembangan tanaman, terutama tanaman dikotil. Promotor gen *OsaAER1* adalah promotor pengendali gen *OsaAER1* yang menyandikan enzim alkenal reduktase. Gen *OsaAER1* menunjukkan ekspresi tinggi di organ akar, namun rendah di organ lain pada tanaman padi subsp. *japonica* (National Institute of Agrobiological Sciences 2016). Tujuan penelitian ini adalah 1) merakit konstruk gen kimera yang terdiri atas promotor konstitutif CaMV 35S dan promotor gen *OsaAER1* yang disambungkan dengan gen pelapor *GUS* yang menyandi enzim μ -glucuronidase dan 2) mendapatkan metode transformasi transien yang efisien pada kecambah tembakau utuh yang ditransformasi dengan bantuan *A. tumefaciens*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Bogor.

Konstruksi Promotor CaMV 35S dan *OsaAER1*

Isolasi fragmen promotor CaMV 35S dan *OsaAER1*

Fragmen promotor CaMV 35S diperoleh dari hasil reamplifikasi vektor biner pCambia 1301, sedangkan fragmen promotor gen *OsaAER1* diperoleh dari hasil amplifikasi DNA padi cv. Awan Kuning. Awan Kuning adalah kultivar lokal dari Kalimantan Selatan yang toleran terhadap logam berat besi (Fe). Kedua fragmen diamplifikasi menggunakan pasangan primer spesifik yang ditambah situs enzim restriksi untuk keperluan kloning (Tabel 1). Situs enzim restriksi *HindIII* dan *AvrII* ditambahkan pada ujung 5'

Tabel 1. Primer yang digunakan dalam perakitan konstruk promotor CaMV 35S dan *OsaAER1* yang disambungkan dengan gen *GUS*.

Nama primer	Sekuen*
F-p35S	5' <u>GCAAGCTT</u> ACTAGTCCTAGGGGCGCGCCCATGGAGTCAAAGATTCAAA3'
R-p35S	5'GCGGATCCCTGCAGGGTCGACGGCGCGCCAGTCCCCGTGTTCTCTCCA3'
F-pr <i>OsaAER1</i>	5' GCCCTAGGTCATCAAGTGTCTACGCCATGA3'
R-pr <i>OsaAER1</i>	5' <u>GCGGATCC</u> TGCTGTTTAGATTCTTGTAACCAGGCTAAGCAACCCA3'

*Basa nukleotida dengan garis bawah menunjukkan situs pemotongan enzim restriksi.

primer promotor CaMV 35S *forward*, sedangkan situs enzim restriksi *Bam*HI ditambahkan pada ujung 5' primer promotor CaMV 35S *reverse*. Situs enzim restriksi *Avr*II ditambahkan pada ujung 5' primer promotor gen *OsaAER1 forward* dan *Bam*HI ditambahkan pada ujung 5' primer promotor gen *OsaAER1 reverse*. Pasangan primer dirancang dengan menggunakan perangkat lunak *Primer Blast* yang tersedia secara bebas (National Center for Biotechnology Information 2016).

Reaksi PCR dilakukan dalam volume total 20 µl, terdiri atas 2 µl bufer PCR 10× (konsentrasi akhir 1×), 1,2 µl MgCl 2 mM (konsentrasi akhir 0,12 mM), 0,6 µl dNTPs 10 mM (konsentrasi akhir 0,3 mM), 1 µl pasangan primer spesifik kandidat gen spesifik akar 5 µM (konsentrasi akhir 0,25 µM), 0,16 µl Taq DNA polimerase 5 U/µl (konsentrasi akhir 0,04 U/µl), 12,04 µl ddH₂O, dan 2 µl sampel DNA. Program PCR yang digunakan adalah denaturasi awal pada 95°C selama 3 menit, 35 siklus tahapan yang terdiri atas denaturasi pada 95°C selama 30 detik, penempelan primer pada 55°C selama 30 detik, dan pemanjangan DNA pada 72°C selama 2,5 menit. PCR diakhiri dengan satu siklus tahap pemanjangan akhir pada 72°C selama 5 menit. Hasil PCR kemudian diseparasi menggunakan gel agarosa 1% dan divisualisasi dengan *ChemiDoc™ EQ System* (Bio-Rad). Produk amplifikasi dengan ukuran sekitar 500 bp (fragmen CaMV 35S) dan 2.000 bp (fragmen promotor gen *OsaAER1*) diisolasi dari gel agarosa dan dipurifikasi dengan menggunakan *QIAquick® Gel Extraction Kit* (Qiagen) untuk mendapatkan fragmen-fragmen promotor.

Konstruksi promotor CaMV 35S dan *OsaAER1* ke vektor biner

Fragmen promotor CaMV 35S dan *OsaAER1* masing-masing diligasikan ke dalam vektor kloning *pGEM®-T Easy Vector Systems* (Promega) dan ditransformasikan ke dalam *Escherichia coli*. Vektor *pGEM-T Easy* rekombinan yang mengandung fragmen promotor tersebut diisolasi dari koloni tunggal yang tumbuh di media seleksi (LB + ampicilin 100 mg/l). Verifikasi vektor *pGEM-T Easy* rekombinan yang mengandung fragmen promotor CaMV 35S atau

OsaAER1 dilakukan dengan memotong vektor tersebut dengan enzim restriksi *Eco*RI. Vektor *pGEM-T Easy* rekombinan dikirim ke perusahaan 1st BASE untuk sekuensing.

Vektor *pGEM-T Easy*-CaMV 35S rekombinan yang telah diverifikasi dipotong dengan enzim restriksi *Hind*III dan *Bam*HI untuk mendapatkan fragmen promotor CaMV 35S. Fragmen tersebut selanjutnya diligasikan dengan bantuan enzim T4-DNA ligase ke vektor biner pCambia1300int::gus::tNOS (Trijatmiko et al. 2016) yang sebelumnya telah dipotong dengan enzim restriksi yang sama (*Hind*III dan *Bam*HI) sehingga diperoleh vektor biner rekombinan pCambia1300int::p35S::gus::tNOS.

Fragmen promotor gen *OsaAER1* dipotong dari vektor *pGEM-T Easy-OsaAER1* rekombinan dengan enzim restriksi *Avr*II dan *Bam*HI. Fragmen ini kemudian diligasikan ke dalam vektor biner pCambia 1300int::p35S::gus::tNOS yang sebelumnya telah dipotong dengan enzim restriksi yang sama (*Avr*II dan *Bam*HI). Fragmen promotor gen *OsaAER1* menggantikan posisi promotor CaMV 35S sehingga diperoleh vektor biner pCambia 1300int::pr*OsaAER1*::gus::tNOS. Kedua vektor biner rekombinan tersebut kemudian ditransformasi ke *E. coli*. Vektor biner rekombinan diisolasi dari koloni tunggal yang berhasil tumbuh di media seleksi LB padat yang mengandung kanamisin 100 mg/l dan dipotong dengan enzim restriksi *Hind*III dan *Bam*HI untuk verifikasi.

Transformasi vektor biner rekombinan ke *A. tumefaciens*

Vektor biner rekombinan yang telah mengandung promotor CaMV 35S atau *OsaAER1* berdasarkan hasil verifikasi kemudian dimasukkan ke *A. tumefaciens* strain LBA4404 menggunakan metode *freeze-thaw*. Vektor rekombinan diisolasi dari *A. tumefaciens* kemudian ditransformasi balik ke *E. coli* untuk keperluan verifikasi. Vektor rekombinan yang diisolasi dari *E. coli* hasil transformasi balik dipotong dengan enzim restriksi *Hind*III dan *Bam*HI. *A. tumefaciens* yang positif mengandung vektor biner rekombinan (yang telah mengandung promotor CaMV 35S atau *OsaAER1*) kemudian digunakan untuk

transformasi transien pada kecambah tembakau cv. SR1. Kecambah tembakau berasal dari benih yang sebelumnya disterilisasi dengan cara perendaman dalam etanol 70% selama 1 menit, dilanjutkan dengan perendaman dalam larutan pemutih komersial 20% ditambah dengan 1 tetes Tween-20 selama 20 menit dan pembilasan dengan ddH₂O steril sebanyak enam kali, kemudian ditanam di media MS₀ dan ditumbuhkan di ruang kultur pada 25°C dengan pencahayaan penuh selama 5 hari.

Transformasi Transien dan Pengujian Histokimia

Suspensi *A. tumefaciens*

Bakteri *A. tumefaciens* strain LBA4404 yang mengandung konstruk pCambia1300int::p35S::gus atau pCambia1300int::prOsAER1::gus dari koloni tunggal ditumbuhkan di media LB cair yang mengandung kanamisin 100 mg/l dan diinkubasi pada 28°C dalam kondisi gelap selama 2 hari sambil digoyang dengan kecepatan 150 rpm. *A. tumefaciens* LBA4404 kosong yang tidak mengandung vektor biner rekombinan juga ditumbuhkan di media LB cair tanpa antibiotik dan digunakan sebagai kontrol. Sebanyak 2 ml suspensi bakteri kemudian dipindahkan ke dalam tabung mikro dan disentrifus dengan kecepatan 5.000 rpm selama 1 menit. Pelet yang terbentuk dilarutkan dengan media MS₀ cair, kemudian ditambahkan dengan asetosiringon 100 mM dan Tween-20 0,2%. Kerapatan bakteri kemudian diukur dengan spektrofotometer.

Transformasi transien

Tiga puluh sampai tiga puluh enam kecambah tembakau utuh yang berumur 5 hari direndam dalam suspensi *A. tumefaciens* dengan kerapatan optik OD₆₀₀ = 0,5 dan OD₆₀₀ = 1,0, kemudian divakum selama 15 menit dan 30 menit. Kecambah yang telah divakum kemudian ditanam di media kokultivasi (MS + asetosiringon 0,1 mM) selama 3 hari. Setelah kokultivasi, kecambah dicuci dengan ddH₂O steril yang mengandung sefotaksim 250 mg/l, ditiriskan pada kertas saring, dan diuji secara histokimia.

Pengujian histokimia

Pengujian histokimia dilakukan dengan mengacu pada metode Jefferson et al. (1987). Kecambah yang telah ditransformasi direndam dalam *assay buffer* yang mengandung bufer *potassium phosphate* 100 mM (pH 7,0), EDTA 10 mM (pH 8,0), Tween-20 0,1%, *potassium ferricyanide* 5 mM, dan *5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronic acid* (X-Gluc; Sigma) 2 mM, dan diinkubasi pada 37°C dalam kondisi gelap

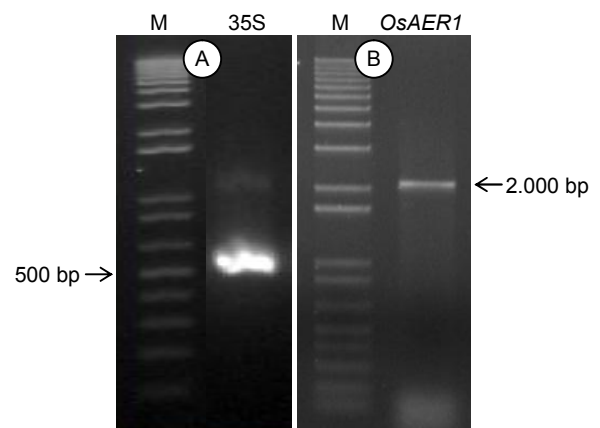
semalaman. Klorofil dilarutkan dengan merendam kecambah tersebut dalam etanol absolut selama semalam. Setelah klorofil larut sepenuhnya, etanol absolut diganti dengan etanol 70%. Kecambah kemudian diamati dan diambil gambarnya dengan perangkat digital mikroskop *OptiLab Advance* (Miconos) di bawah mikroskop stereo (Bausch and Lomb).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Konstruksi Promotor CaMV 35S dan *OsAER1*

Reamplifikasi vektor pCambia1301 dengan menggunakan pasangan primer spesifik promotor CaMV 35S menghasilkan ampikon dengan ukuran sekitar 500 bp (Gambar 1A), sedangkan amplifikasi DNA padi cv. Awan Kuning dengan menggunakan pasangan primer spesifik promotor gen *OsAER1* menghasilkan ampikon dengan ukuran sekitar 2.000 bp (Gambar 1B). Hasil PCR ini menunjukkan bahwa ampikon yang dihasilkan diduga merupakan fragmen promotor CaMV 35S dan *OsAER1*.

Analisis perbandingan sekuen menunjukkan bahwa fragmen promotor CaMV 35S, dari hasil reamplifikasi vektor biner pCambia1301, mempunyai kesamaan 100% dengan sekuen rujukan (Gambar 2A). Hasil ini menunjukkan bahwa fragmen yang dihasilkan adalah promotor CaMV 35S dan sekuen hasil reamplifikasi adalah utuh tanpa adanya mutasi pada basa nukleotidanya. Sementara itu, sekuen frag-

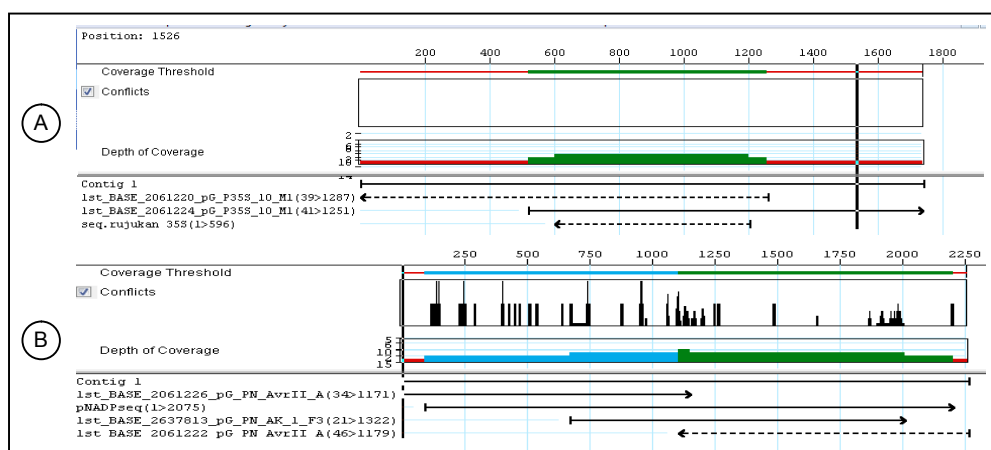


Gambar 1. Hasil reamplifikasi untuk promotor CaMV 35S dan amplifikasi untuk promotor gen *OsAER1*. (A) Reamplifikasi vektor biner pCambia1301::p35S::gus dengan primer spesifik untuk promotor CaMV 35S menghasilkan ampikon berukuran sekitar 500 bp. (B) Amplifikasi DNA padi cv. Awan Kuning menggunakan primer spesifik untuk promotor gen *OsAER1* menghasilkan ampikon berukuran sekitar 2.000 bp. M = 1 Kb Plus, 35S = fragmen promotor CaMV 35S, OsAER1 = fragmen promotor gen *OsAER1*.

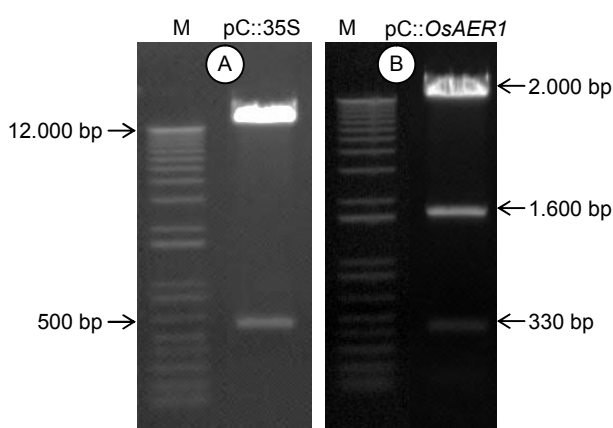
men promotor gen *OsaER1* mempunyai kesamaan 98% dengan sekuen rujukan (padi cv. Nipponbare) yang tersedia di basis data (Rice Genome Annotation Project 2015) (Gambar 2B). Penyebab perbedaan ini diduga karena fragmen gen *OsaER1* diisolasi dari tanaman padi cv. Awan Kuning yang merupakan jenis padi subsp. *indica*, sedangkan sekuen rujukan yang digunakan adalah sekuen padi cv. Nipponbare yang merupakan jenis padi subsp. *japonica*.

Pemotongan vektor biner pCambia1300int::p35S::gus::tNOS dengan enzim restriksi *HindIII*-*Bam*HI menghasilkan fragmen dengan ukuran sekitar 12.000 bp yang merupakan ukuran vektor biner pCambia

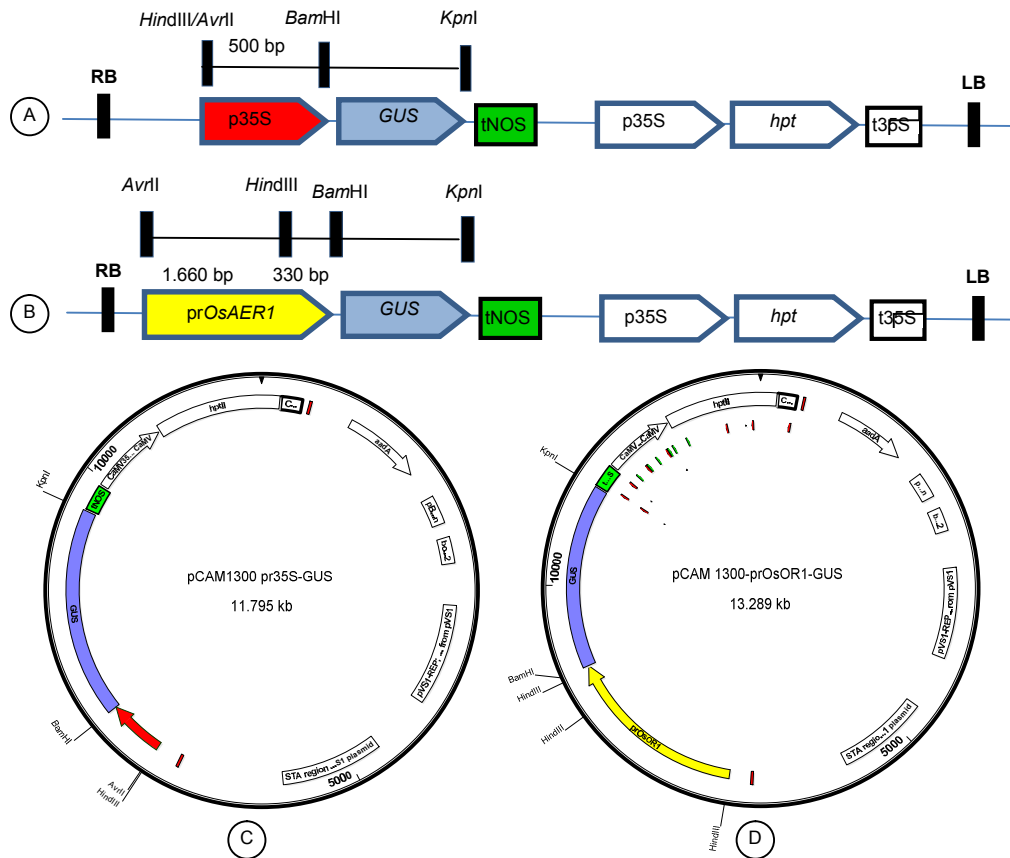
1300int::gus::tNOS dan sekitar 500 bp yang merupakan ukuran fragmen promotor CaMV 35S (Gambar 3A dan 4A). Pemotongan vektor biner pCambia 1300int::pr*OsaER1*::gus::tNOS dengan enzim restriksi *HindIII*-*Bam*HI menghasilkan tiga fragmen dengan ukuran sekitar 12.000 bp yang merupakan fragmen pCambia1300int::gus::tNOS dan fragmen dengan ukuran sekitar 330 bp dan 1.660 bp yang merupakan fragmen promotor gen *OsaER1* yang terpotong menjadi dua bagian (Gambar 3B dan 4B). Promotor gen *OsaER1* mempunyai situs enzim restriksi *HindIII* pada posisi 330 bp ke arah hulu dari kodon *start* (ATG) sehingga jika dipotong dengan enzim *HindIII* dan



Gambar 2. Hasil analisis perbandingan sekuen vektor biner untuk promotor CaMV 35S dan promotor gen *OsaER1* menggunakan program *Sequence Manager*. (A) pCambia1300int::p35S::gus::tNOS yang menunjukkan sekuen promotor CaMV 35S yang berasal dari reamplifikasi vektor biner pCambia1301, mempunyai kesamaan 100% dengan sekuen rujukan (National Center for Biotechnology Information 2016). (B) pCambia 1300int::pr*OsaER1*::gus::tNOS yang menunjukkan sekuen promotor gen *OsaER1* yang berasal dari hasil amplifikasi DNA padi cv. Awan Kuning, mempunyai kesamaan 98% dengan sekuen rujukan padi cv. Nipponbare (Rice Genome Annotation Project 2015).



Gambar 3. Pemotongan vektor kimera untuk promotor CaMV 35S dan promotor gen *OsaER1* dengan enzim restriksi. (A) Pemotongan vektor kimera pCambia1300int::prCaMV35S::gus::tNOS dengan enzim restriksi *AvrII* dan *Bam*HI menghasilkan fragmen dengan ukuran sekitar 500 bp (fragmen promotor CaMV 35S) dan 12.000 bp (ukuran plasmid pCambia1300int::gus::tNOS). (B) Pemotongan vektor kimera pCambia1300int::pr*OsaER1*::gus::tNOS dengan enzim restriksi *HindIII* dan *Bam*HI menghasilkan fragmen dengan ukuran sekitar 12.000 bp (pCambia1300int::gus::tNOS), 1.660 bp dan 330 bp (dua fragmen promotor gen *OsaER1*). M = 1 Kb Plus, pC::35S = pCambia 1300int::prCaMV35S::gus::tNOS, pC::OsaER1 = pCambia1300int::pr*OsaER1*::gus::tNOS.



Gambar 4. Skema bagian T-DNA vektor biner pCAMBIA1300int dengan situs pemotongan enzim restriksi dan kaset kimera. (A) Bagian yang membawa konstruk promotor CaMV 35S yang berukuran sekitar 500 bp. (B) Bagian yang membawa konstruk promotor gen *OsaER1* yang berukuran sekitar 2.000 bp. (C) Vektor biner pCAMBIA 1300int::pr35S::gus::tNOS (SeqBuilder: DNASTAR). (D) Vektor biner pCAMBIA 1300int::prOsAER1::gus::tNOS (SeqBuilder: DNASTAR).

*Bam*HI akan menghasilkan dua fragmen, yaitu fragmen dengan ukuran sekitar 330 bp dan 1.660 bp. Hasil verifikasi ini menunjukkan bahwa vektor biner rekombinan telah mengandung fragmen promotor CaMV 35S atau *OsaER1*. Ilustrasi kaset kimera vektor biner pCAMBIA1300int::p35S::gus::tNOS dan pCAMBIA 1300int::prOsAER1::gus::tNOS yang berhasil dirakit disajikan pada Gambar 4C dan 4D secara berurutan.

Transformasi Transien dan Pengujian Histokimia

Kecambah transgenik yang mengandung konstruk gen kimera dan mengekspresikan gen *GUS* akan memberikan sinyal warna biru setelah direndam dalam larutan X-Gluc. Gen *GUS* hanya diekspresikan di sel tanaman dan tidak di *A. tumefaciens* karena gen *GUS* pada konstruk yang digunakan untuk transformasi mengandung intron pada daerah N-terminalnya (Jouanin et al. 1993). Pada pengujian histokimia, enzim β -glucuronidase yang disandikan oleh gen *GUS* akan mengurai substrat X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D glucuronic acid) dan akan terbentuk senyawa antara indoksil yang larut dalam air, yang se-

lanjutnya melalui reaksi dimerisasi oksidatif menghasilkan *dichloro-dibromoindigo* (ClBr-indigo) yang berwarna biru (Hou 2015). Secara alami, di dalam tanaman tidak ada aktivitas *GUS*. Dengan demikian, warna biru di dalam sel atau jaringan yang dihasilkan pada saat pengujian dengan larutan X-Gluc menggambarkan aktivitas promotor yang mengendalikan transkripsi gen *GUS* di lokasi sel atau jaringan yang menghasilkan warna biru (Cruz et al. 2015).

Hasil transformasi transien pada kecambah tembakau dengan menggunakan konstruk promotor CaMV 35S::gus dan *OsaER1*::gus secara umum menunjukkan adanya ekspresi gen *GUS* pada transforman kecambah tembakau berumur 5 hari (Gambar 5B–5G). Hasil ini menunjukkan bahwa transformasi transien yang dilakukan telah berhasil mengintroduksi konstruk promotor CaMV 35S::gus dan *OsaER1*::gus ke dalam kecambah tembakau.

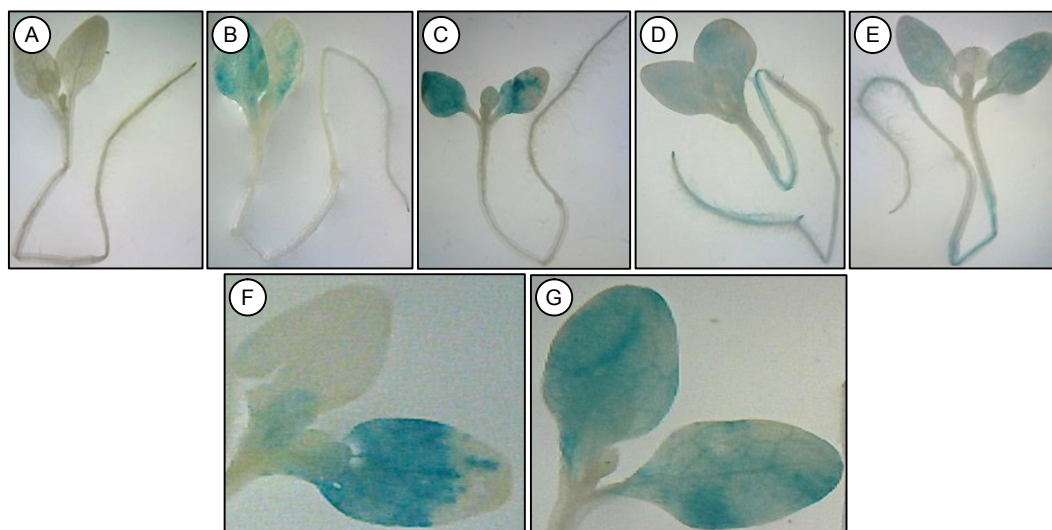
Ekspresi gen *GUS* pada transforman yang mengandung konstruk promotor CaMV 35S::gus teramati di semua bagian transforman kecambah tembakau, yaitu di organ akar, hipokotil, kotiledon, dan daun.

Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas promotor CaMV 35S mengarahkan ekspresi gen di semua organ kecambah tembakau berumur 5 hari. Ekspresi gen *GUS* pada transforman yang mengandung konstruk promotor gen *OsaER1::gus* teramati di organ akar, hipokotil, dan kotiledon (Tabel 2). Hal ini menunjukkan bahwa promotor gen *OsaER1* mengarahkan ekspresi suatu gen lebih kuat di organ akar dan kotiledon kecambah tembakau. Analisis *microarray* sebelumnya menunjukkan bahwa gen *OsaER1* merupakan gen yang diekspresikan secara kuat di organ akar tanaman padi subsp. *japonica* (National Institute of Agrobiological Sciences 2016). Sementara itu, kecambah tembakau yang ditransformasi menggunakan *A. tumefaciens* strain LBA4404 yang tidak membawa konstruk vektor biner rekombinan menghasilkan transforman yang tidak mengekspresikan gen *GUS* di semua bagian tanaman pada semua perlakuan (Gambar 5A).

Kecambah tembakau yang ditransformasi dengan menggunakan *A. tumefaciens* yang mengandung konstruk promotor CaMV 35S::*gus* menghasilkan efisiensi transformasi sebesar 100% pada semua perlakuan. Artinya, semua kecambah yang ditransformasi dengan menggunakan konstruk promotor gen CaMV 35S mengekspresikan gen *GUS*. Kecambah tembakau yang ditransformasi dengan konstruk promotor gen *OsaER1::gus* menghasilkan nilai efisiensi transformasi yang lebih rendah, yaitu antara 63,3–87,5%. (Tabel 2). Kecambah tembakau yang ditransformasi dengan konstruk promotor gen *OsaER1*

tersebut tidak semuanya mengekspresikan gen *GUS*. Kecambah tembakau yang tidak mengekspresikan gen *GUS* sebanyak 12,5–36,7%. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas promotor CaMV 35S lebih kuat dibanding dengan promotor gen *OsaER1*. Telah diketahui bahwa promotor CaMV 35S merupakan jenis promotor kuat yang diekspresikan secara terus menerus di semua bagian tanaman (Odell et al. 1985). Pada bagian promotor CaMV 35S, secara alami terdapat elemen-elemen kompleks yang dilibatkan oleh virus untuk menginfeksi inangnya dan terjadinya transkripsi yang dikendalikan oleh promotor CaMV 35S tidak bergantung pada protein *trans-acting factor* yang ada pada virus saja (Odell et al. 1985) sehingga promotor tersebut di dalam sel tanaman tetap dapat mengarahkan ekspresi gen yang berada di bagian hilirnya. Promotor gen *OsaER1* mengarahkan ekspresi gen *GUS* yang lebih rendah di kecambah tanaman tembakau. Promotor gen *OsaER1* diisolasi dari tanaman padi yang termasuk golongan monokotil yang mungkin memberikan aktivitas ekspresi yang lebih rendah di tanaman tembakau yang merupakan tanaman dikotil.

Transforman kecambah tembakau yang ditransformasi dengan konstruk promotor CaMV 35S sebagian besar mengekspresikan gen *GUS* di organ akar dan kotiledon, sedangkan ekspresinya di daun hanya diperoleh pada kecambah yang ditransformasi dengan perlakuan vakum selama 30 menit (Tabel 2). Besar kemungkinan kotiledon dan akar tembakau lebih mudah dipenetrasi oleh *A. tumefaciens* diban-



Gambar 5. Hasil pengujian histokimia kecambah tembakau transgenik berumur 5 hari, gambar diambil dengan perangkat digital mikroskop *OptiLab Advance* (Miconos) di bawah mikroskop stereo (Bausch and Lomb) 0,8 $\times$. (A) Kecambah tembakau yang tidak mengekspresikan gen *GUS*. (B) Kecambah dengan ekspresi gen *GUS* di kotiledon, daun, dan akar. (C) Kecambah dengan ekspresi gen *GUS* di kotiledon, daun, dan akar. (D) Kecambah dengan ekspresi gen *GUS* di kotiledon, hipokotil, dan akar. (E) Kecambah dengan ekspresi gen *GUS* di kotiledon, daun, hipokotil, dan akar. (F) Ekspresi gen *GUS* di kotiledon dan daun. (G) Ekspresi gen *GUS* di kotiledon.

Tabel 2. Hasil transformasi transien pada kecambah tembakau dengan bantuan *A. tumefaciens* yang mengandung konstruk pCAMBIA1300int::p35S::gus::tNOS dan pCAMBIA1300int::prOsAER1::gus::tNOS.

Perlakuan			Jumlah kecambah tembakau dengan ekspresi gen <i>GUS</i> di organ				Jumlah kecambah tembakau		
Konstruk	OD	Waktu perlakuan vakum (menit)	Kotiledon + akar	Kotiledon + akar + daun	Kotiledon + hipokotil + akar	Kotiledon + hipokotil + akar + daun	Dengan ekspresi gen <i>GUS</i>	Tanpa ekspresi gen <i>GUS</i>	Total
35S	0,5	15	28 (80,0)	-	7 (20,0)	-	35 (100,0)	-	35
		30	14 (46,7)	8 (26,7)	5 (16,7)	3 (10,0)	30 (100,0)	-	30
	1,0	15	30 (83,3)	-	6 (16,7)	-	36 (100,0)	-	36
		30	21 (61,8)	5 (14,7)	6 (17,6)	2 (5,9)	34 (100,0)	-	34
<i>OsAER1</i>	0,5	15	21 (67,7)	-	-	-	21 (67,7)	10 (32,3)	31
		30	23 (71,9)	-	5 (15,6)	-	28 (87,5)	4 (12,5)	32
	1,0	15	19 (63,3)	-	-	-	19 (63,3)	11 (36,7)	30
		30	17 (51,5)	-	7 (21,2)	-	24 (72,7)	9 (27,3)	33
LBA4404	0,5	15	-	-	-	-	-	31 (100,0)	31
		30	-	-	-	-	-	34 (100,0)	34
	1,0	15	-	-	-	-	-	30 (100,0)	30
		30	-	-	-	-	-	33 (100,0)	33

35S = *A. tumefaciens* LBA4404 yang mengandung konstruk promotor CaMV 35S::gus, OsAER1 = *A. tumefaciens* LBA4404 yang mengandung konstruk promotor OsAER1::gus, LBA4404 = *A. tumefaciens* LBA4404 yang tidak mengandung vektor rekombinan. Angka dalam kurung menyatakan persentase.

ding dengan organ hipokotil dan daun. Perbedaan dalam efisiensi transformasi antarorgan yang berbeda pada tanaman yang sama telah ditunjukkan oleh Marionet al. (2008) yang menggunakan eksplan kecambah *Arabidopsis* untuk transformasi transien. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa efisiensi transformasi pada organ kotiledon muda lebih tinggi dibanding dengan akar dan daun.

Pengaruh perlakuan kerapatan bakteri dalam meningkatkan efisiensi transformasi dapat dilihat pada transformasi yang menggunakan konstruk promotor gen *OsAER1*. Transformasi transien dengan menggunakan OD₆₀₀ = 0,5 yang dikombinasikan dengan vakum selama 15 menit dapat meningkatkan efisiensi transformasi sebesar 4,4% dibanding dengan OD₆₀₀ = 1,0, sedangkan perlakuan dengan kerapatan bakteri OD₆₀₀ = 0,5 dengan vakum selama 30 menit dapat meningkatkan efisiensi transformasi sebesar 14,8% dibanding dengan OD₆₀₀ = 1,0 (Tabel 2). Hal ini menunjukkan bahwa kerapatan *A. tumefaciens* dengan OD₆₀₀ = 0,5 sudah cukup untuk menginfeksi tanaman. Kerapatan bakteri yang tinggi cenderung menyebabkan pertumbuhan bakteri yang berlebihan dan tidak efektif dalam menginfeksi sel tanaman (Li et al. 2017).

Transformasi kecambah tembakau yang mengekspresikan gen *GUS* di organ daun hanya diperoleh pada kecambah yang ditransformasi menggunakan konstruk promotor CaMV 35S::gus dengan perlakuan vakum selama 30 menit pada semua perlakuan kerapatan bakteri (Tabel 2). Sementara itu, perlakuan vakum selama 15 menit pada semua perlakuan kerapatan bakteri tidak menunjukkan adanya transfor-

man yang mengekspresikan gen *GUS* di organ daun. Hasil ini menunjukkan bahwa durasi perlakuan vakum dapat membantu *A. tumefaciens* masuk ke dalam jaringan daun. Penelitian yang dilakukan oleh Dewanto dan Suhandono (2016) menunjukkan bahwa perlakuan vakum dapat meningkatkan ekspresi gen *GUS* di daun cocor bebek.

Kecambah tembakau yang ditransformasi dengan promotor gen *OsAER1* dengan perlakuan vakum selama 30 menit menunjukkan efisiensi transformasi yang lebih tinggi dibanding dengan perlakuan menggunakan vakum selama 15 menit pada kedua kerapatan bakteri (Tabel 2). Selain perlakuan vakum, faktor penunjang peningkatan efisiensi transformasi transien adalah penambahan surfaktan Tween-20 ke dalam media kokultivasi. Penambahan surfaktan ke dalam media infeksi akan membantu penetrasi *A. tumefaciens* ke dalam jaringan tanaman sehingga dapat meningkatkan transfer T-DNA ke dalam sel tanaman (Dehestani et al. 2010; Guo et al. 2015). Tween-20 yang bersifat hidrofobik akan membantu menurunkan tegangan permukaan jaringan tanaman sehingga suspensi *A. tumefaciens* dapat melekat merata di seluruh permukaan jaringan dan akan meningkatkan penetrasi bakteri ke dalam jaringan tanaman. Konsentrasi dan jenis surfaktan dapat memengaruhi efisiensi transformasi transien. Penelitian yang dilakukan oleh Dehestani et al. (2010) menunjukkan bahwa aplikasi surfaktan Silwet L-77 pada konsentrasi 0,05% yang dikombinasikan dengan perlakuan vakum adalah teknik yang paling baik untuk transformasi tanaman *Arabidopsis* secara *in planta* dengan bantuan *A. tumefaciens* dibanding dengan

penggunaan Tween-20 dan Triton-X100. Pada konsentrasi lebih rendah (0,015%), Silwet L-77 adalah surfaktan yang terbaik dalam menghasilkan transforman yang mengekspresikan gen *GFP* pada percobaan transformasi transien dengan vakum infiltrasi pada tanaman *Populus* (Takata dan Eriksson 2012).

KESIMPULAN

Fragmen promotor CaMV 35S telah berhasil diisolasi dari vektor biner pCambia1301 yang menghasilkan ampikon berukuran sekitar 500 bp, sedangkan promotor gen *OsaAER1* telah berhasil diamplifikasi dari DNA padi cv. Awan Kuning yang menghasilkan ampikon dengan ukuran sekitar 2.000 bp. Kedua promotor tersebut telah berhasil dirakit ke dalam vektor biner yang mengandung gen *GUS* sehingga diperoleh kaset kimera vektor biner pCambia1300int::p35S::gus::tNOS dan pCambia1300int::pOsaAER1::gus::tNOS. Konstruksi kaset kimera tersebut telah digunakan untuk transformasi kecambah tembakau berumur 5 hari secara transien dengan bantuan *A. tumefaciens* strain LBA4404. Hasil transformasi transien menunjukkan bahwa lokalisasi ekspresi *GUS* pada kecambah tembakau yang ditransformasi menggunakan promotor CaMV 35S dapat diamati di semua organ, sedangkan pada kecambah tembakau yang ditransformasi dengan promotor gen *OsaAER1* ekspresi gen *GUS* terjadi di organ akar, hipokotil, dan kotiledon, tetapi tidak terekspresi di daun. Efisiensi transformasi pada kecambah yang ditransformasi dengan konstruksi yang mengandung promotor CaMV 35S::gus dan *OsaAER1*::gus masing-masing sebesar 100% dan 63,3–87,5%. Metode transformasi transien yang efisien ditunjukkan oleh metode yang menggunakan kerapatan bakteri dengan $OD_{600} = 0,5$ dikombinasikan dengan perlakuan vakum selama 30 menit.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai melalui *Sustainable Management of Agricultural Research and Technology Dissemination (SMARTD) Project*, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Kementerian Pertanian. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Muhammad Husni Mubarak, Nuryati, dan Heri Hersusatio atas bantuan teknis selama penelitian berlangsung.

DAFTAR PUSTAKA

Arcos-Ortega, G.F., Chan-Kuuk, R.A., Gonzalez-Kantun, W.A., Souza-Perera, R., Nakazawa-Uejii, Y.E., Aviles-Berzunza, E., Godoy-Hernández, G., Lawton, M.A. &

Aguilar, J.J.Z. (2010) *Agrobacterium tumefaciens*-transient genetic transformation of Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) leaf explants. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13 (4), 1–9. doi: 10.2225/vol13-issue4-fulltext-10.

Cruz, L., Chaljub, L., Do, H., Griffin, K. & Zhang, X.H. (2015) Tissue specificity of *GUS* gene activity in *Agrobacterium*-mediated transformed tobacco plants. *FAU Undergraduate Research Journal*, 4 (1), 43–51.

Dehestani, A., Ahmadian, A., Salmanian, A.H., Jelodar, N.B. & Kazemitabar, K. (2010) Transformation efficiency enhancement of *Arabidopsis* vacuum infiltration by surfactant application and apical inflorescence removal. *Trakia Journal of Science*, 8 (1), 19–26.

Dewanto, H.A. & Suhandono, S. (2016) Transformasi menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* pada tunas daun *Kalanchoe mortagei* dan *Kalanchoe daigremontiana* 1 dan 2. *Chimica et Natura Acta*, 4 (2), 97–105.

Dickey, A., Wang, N., Cooper, E., Tull, L., Breedlove, D., Manson, H., Liu, D. & Wang, K.Y. (2017) Transient expression of lumbrokinase (Pl239) in tobacco (*Nicotiana tabacum*) using a geminivirus-based single replicon system dissolves fibrin and blood clots. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 1–9. doi:10.1155/2017/6093017.

Elfahmi, Suhandono, S. & Chahyadi, A. (2014) Optimization of genetic transformation of *Artemisia annua* L. using *Agrobacterium* for artemisinin production. *Pharmacognosy Magazine*, 10 (37), 176–180. doi: 10.4103/0973-1296.127372.

Guo, B.F., Guo, Y., Wang, J., Zhang, L.J., Jin, L.G., Hong, H.L., Chang, R.Z. & Qiu, L.J. (2015) Co-treatment with surfactant and sonication significantly improves *Agrobacterium*-mediated resistant bud formation and transient expression efficiency in soybean. *Journal of Integrative Agriculture*, 14 (7), 1242–1250.

Hou, Q. (2015) Comparative studies of selected stress responsive *DREB* and *ALDH* genes in *Arabidopsis thaliana*, *Eutrema salsugineum*, and *Hordeum vulgare*. Doctoral thesis. Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

International Rice Genome Sequencing Project (2005) The map-based sequence of the rice genome. *Nature*, 436 (7052), 793–800.

Jefferson, R.A. (1987) Essaying chimeric genes in plant: The *GUS* gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter*, 5 (4), 387–405.

Jouanin, L., Brasileiro, A.C.M., Leplé, J.C., Pilate, G. & Cornu, D. (1993) Genetic transformation: A short review of methods and their applications, results, and perspectives for forest trees. *Annals of Forest Science*, 50, 325–336.

Krenek, P., Samajova, O., Luptovciak, I., Doskocilova, A., Komis, G. & Samaj, J. (2015) Transient transformation

- mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: Principles, methods, and applications. *Biotechnology Advances*, 33, 1024–1042.
- Kutty, P.C., Parveez, G.K.A. & Huyop, F. (2010) An easy method for *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to *Nicotiana tabacum* cv. TAPM26. *Journal of Biological Sciences*, 10 (6), 480–489.
- Li, J.F., Park, E., Arnim, A.G. & Nebenfuhr, A. (2009) The FAST technique: A simplified *Agrobacterium*-based transformation method for transient gene expression analysis in seedlings of *Arabidopsis* and other plant species. *Plant Methods*, 5 (6), 1–15.
- Li, S., Cong, Y., Liu, Y., Wang, T., Shuai, Q., Chen, N., Gai, J. & Li, Y. (2017) Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation in soybean. *Frontiers in Plant Science*, 8 (246), 1–15. doi: 10.3389/fpls.2017.00246.
- Lu, J., Bai, M., Ren, H., Liu, J. & Wang, C. (2017) An efficient transient expression system for gene function analysis in rose. *Plant Methods*, 13 (116), 1–12.
- Mangano, S., Gonzales, C.D. & Petruccielli, S. (2014) *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transient Transformation of *Arabidopsis thaliana* Leaves. *Arabidopsis Protocols, Methods in Molecular Biology*. Springer Science-Business Media, New York. doi: 10.1007/978-1-62703-580-4_8.
- Marion, J., Bach, L., Bellec, Y., Meyer, C., Gissot, L. & Faure, J.D. (2008) Systematic analysis of protein subcellular localization and interaction using high-throughput transient transformation of *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Journal*, 56, 169–179.
- National Center for Biotechnology Information (2016) *The National Center for Biotechnology Information*. [Online] Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> [Accessed 15 September 2016].
- National Institute of Agrobiological Sciences (2016) *RiceXPro, global gene expression profile*. [Online] Available from: <http://ricexpro.dna.affrc.go.jp/category-select.php> [Accessed 8 September 2016].
- Odell, J.T., Nagy, F. & Chua, N.H. (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the *Cauliflower mosaic virus* 35S promoter. *Nature*, 313, 810–812.
- Rice Genome Annotation Project (2015) *Introduction to the Rice Genome Annotation Project*. [Online] Available from: <http://rice.plantbiology.msu.edu/> [Accessed 8 September 2015].
- Shamloul, M., Trusa, J., Mett, V. & Yusibov, V. (2014) Optimization and utilization of *Agrobacterium*-mediated transient protein production in *Nicotiana*. *Journal of Visualized Experiments*, 86, 1–13.
- Takata, N. & Eriksson, M.E. (2012) A simple and efficient transient transformation for hybrid aspen (*Populus tremula*×*P. tremuloides*). *Plant Methods*, 8 (30), 1–10.
- The Arabidopsis Genome Initiative. (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408, 796–814.
- Trijatmiko, K.R., Duenas, C., Tsakirpaloglou, N., Torrizo, L., Arines, F.M., Adeva, C., Balindong, J., Oliva, N., Sapaap, M.V., Borrero, J. et al. (2016) Biofortified *indica* rice attains iron and zinc nutrition dietary targets in the field. *Scientific Report*, 6 (19792), 1–13.
- Tsuda, K., Qi, Y., Nguyen, L.V., Bethke, G., Tsuda, Y., Glazebrook, J. & Kat, F. (2012) An efficient *Agrobacterium*-mediated transient transformation of *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 69, 713–719.
- Wu, H.Y., Liu, K.H., Wang, Y.C., Wu, J.F., Chiu, W.L., Chen, C.Y., Wu, S.H., Sheen, J. & Lai, E.M. (2014) AGROBEST: An efficient *Agrobacterium*-mediated transient expression method for versatile gene function analyses in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Methods*, 10 (19), 1–16.
- Xiong, T.C., Sanchez, F., Briat, J.F., Gaymard, F. & Dubos, C. (2016) Spatio-temporal imaging of promoter activity in intact plant tissues. *Plant Synthetic Promoters: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. Springer Science-Business Media, New York. doi: 10.1007/978-1-4939-6396-6_7.
- Zia, M., Rizvi, Z.F., Riaz-Ur-Rehman & Chaudhary, M.F. (2010) *Agrobacterium* mediated transformation of soybean (*Glycine max* L.): Some conditions standardization. *Pakistan Journal of Botany*, 42 (4), 2269–2279.
-