

BULETIN *AgroBio*

ISSN 0853-9022

Vol. 5, No. 2, 2002

JURNAL TINJAUAN ILMIAH RISET BIOLOGI DAN BIOTEKNOLOGI PERTANIAN

Perkembangan Penelitian Regenerasi dan Transformasi pada Tanaman Kedelai	Saptowo J. Pardal ...	37
Perkembangan Penelitian Kultur <i>In Vitro</i> pada Tanaman Industri, Pangan, dan Hortikultura	Ika Mariska ...	45
Regenerasi Tanaman melalui Embriogenesis Somatik dan Beberapa Gen yang Mengendalikannya	Ragapadmi Purnamaningsih ...	51
Keragaman Genetik Strain <i>Ralstonia solanacearum</i> berdasarkan Karakterisasi Menggunakan Teknik Berbasis Asam Nukleat	Yadi Suryadi dan M. Machmud	59
Penyakit Hawar Daun (<i>Phytophthora infestans</i> (Mont.) de Bary) pada Kentang dan Tomat: Identifikasi Permasalahan di Indonesia	Haeni Purwanti	67



Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian
Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian

Penerbit

Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya
Genetik Pertanian
Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian
Departemen Pertanian

Alamat Penerbit

Jalan Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111, Indonesia

E-mail: borif@indo.net.id

Telepon: (0251) 339793, 337975

Faksimile: (0251) 338820

Kala Terbit

Dua nomor per volume

Penanggung Jawab

Sutrisno
Kepala Balai Penelitian
Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian

Redaktur Teknis

Novianti Sunarlim
M. Machmud
Ida Hanarida Somantri

Redaktur Pelaksana

Faizal Abidin
Ida N. Orbani

Buletin AgroBio (dahulu bernama *Buletin Penelitian*) memuat artikel tinjauan ilmiah hasil riset dalam bidang biologi dan bioteknologi tanaman. Naskah (boleh ditulis dalam bahasa Indonesia atau Inggris) yang diajukan untuk diterbitkan hendaknya belum pernah dipublikasikan pada media cetak manapun dan ditulis sesuai dengan "Pedoman Bagi Penulis" (lihat sampul belakang bagian dalam). Dewan Redaksi berhak menyunting naskah tanpa mengubah isi dan makna tulisan atau menolak menerbitkan suatu naskah.

Naskah dapat bersifat tinjauan ilmiah (kritis) atau tinjauan informatif (anotasi) terhadap subjek tertentu, atau gabungan antara keduanya. Tinjauan ilmiah merupakan hasil evaluasi, sintesis, dan analisis kritis tentang riset bagi kepentingan ilmu pengetahuan dan teknologi, sedangkan tinjauan informatif merupakan hasil evaluasi bagi kepentingan pengguna.

Isi naskah dapat membahas salah satu dari butir-butir berikut, yaitu: (a) status riset pada subjek tertentu, baik yang telah, sedang, maupun yang akan dikerjakan, (b) pengungkapan masalah dan pemecahannya, (c) pengembangan suatu metode atau konsepsi, dan (d) gagasan dan pendekatan yang dapat dijadikan landasan bagi suatu usulan riset. Sumber bacaan seyogyanya meliputi bahan pustaka terbitan dalam dan luar negeri yang terkini dan relevan.

Perkembangan Penelitian Regenerasi dan Transformasi pada Tanaman Kedelai

Saptowo J. Pardal

Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian

ABSTRACT

Progress of Plant Regeneration and Transformation on Soybean. Saptowo J. Pardal. Soybean is one of the genotype that still difficult to manipulate *in vitro*. Some reports showed that soybean can be regenerated through *in vitro* culture, but infact it can not be repeated successfully by other laboratories. Type of cells or explants and genotype play important role in the plant regeneration of soybean. Soybean mainly can be regenerate through two pathways, i.e. shoot morphogenesis (organogenesis) and somatic embryogenesis. Both pathway have an advantage and disadvantage. Shoot morphogenesis can be induce easily from the cotyledonary node segment of soybean and it will have the same character as a parent, but the number of shoot is limited. On another hand, somatic embryogenesis can not be induce easily from the soybean explants, but the number of embryos or embryogenic callus is plenty if it can be induced. Due to the difficulties of plant regeneration of soybean so far, the genetic transformation of soybean is still far from the routine system. Although it has been reported by the two laboratories using two different protocols. The success of soybean transformation with foreign gene is reported in 1988 by using *Agrobacterium tumefaciens* and particle bombardment method.

Key words: Soybean, plant regeneration, genetic transformation

Kedelai merupakan salah satu jenis tanaman yang masih sulit dimanipulasi secara *in vitro*, karena tanaman ini bersifat rekalsitran. Meskipun telah banyak dilaporkan keberhasilan regenerasi tanaman pada kedelai, ternyata masih sulit diulang oleh peneliti lain (*tidak reproducible*). Keberhasilan regenerasi tanaman kedelai sangat tergantung pada genotipe yang digunakan (Barwale *et al.*, 1986).

Tidak dapat dipungkiri bahwa salah satu hambatan besar dalam transformasi kedelai adalah masih rendahnya respon tanaman kedelai pada manipulasi kultur *in vitro*. Untuk keberhasilan dan efisiensi transformasi, DNA harus diintroduksi ke dalam sel-sel yang kompeten untuk diregenerasikan menjadi tanaman atau klon-klon sel. Pada beberapa pengalaman, sangat sulit untuk menargetkan DNA ke sel-sel kompeten ini. Ada kejadian DNA berhasil diintroduksi ke dalam

sel-sel yang dapat diregenerasikan menjadi tanaman (*regenerable*), tetapi fertilitasnya rendah. Untuk itu, pengetahuan tentang sistem regenerasi tanaman kedelai betul-betul harus dikuasai terlebih dahulu sebelum melakukan transformasi kedelai (Finer *et al.*, 1996).

Regenerasi tanaman pada dasarnya mengacu pada teori totipotensi dari Scleiden dan Schwan, di mana dikatakan bahwa setiap sel hidup mempunyai kemampuan untuk bereproduksi, membentuk organ, dan berkembang menjadi individu baru yang sempurna/utuh jika ditumbuhkan pada media dan lingkungan yang sesuai. Teori ini dijadikan dasar dalam memanipulasi sel atau jaringan tanaman menjadi organ atau tanaman utuh secara *in vitro*. Teknik ini selanjutnya dikenal sebagai kultur sel/jaringan tanaman (Murashige dan Skoog, 1962).

Bertolak dari hal tersebut pada prinsipnya semua sel tanaman dari mana saja asalnya dan jenis tanaman apa saja dapat ditumbuhkan

menjadi tanaman apabila media dan kondisi lingkungan sangat sesuai untuk pertumbuhannya. Namun pada kenyataannya belum semua jenis sel atau tanaman dapat dimanipulasi secara *in vitro*. Hal ini disebabkan adanya perbedaan kemampuan daya tumbuh/regenerasi dari masing-masing jenis sel dan genotipe tanaman. Masing-masing jenis sel dan genotipe memiliki respon pertumbuhan *in vitro* yang berbeda-beda walaupun ditumbuhkan pada media dan kondisi lingkungan tumbuh yang sama. Selain faktor jenis eksplan dan genotip tanaman, regenerasi tanaman juga dipengaruhi oleh komposisi media yang digunakan. Masing-masing jenis eksplan/sel dan genotip tanaman memerlukan komposisi media yang berbeda-beda (Pierik, 1987).

Media untuk menumbuhkan sel/eksplan tanaman pada dasarnya berisi unsur hara makro, mikro, dan gula sebagai sumber karbon. Selain itu, media kultur juga dilengkapi dengan zat besi, vitamin, mineral, dan zat pengatur tumbuh. Zat pengatur tumbuh sangat besar peranannya di dalam mengarahkan pertumbuhan sel tanaman. Kombinasi zat pengatur tumbuh yang tepat akan menghasilkan pertumbuhan sel yang optimal (Wattimena, 1992).

REGENERASI TANAMAN KEDELAI *IN VITRO*

Kedelai dapat diregenerasikan melalui dua proses yang berbeda, yaitu melalui organogenesis (*shoot morphogenesis*) dan embriogenesis somatik (*somatic embryogenesis*) (Barwale *et al.*, 1986). Morfogenesis tunas/organogenesis merupakan proses pembentukan dan perkembangan tunas dari jaringan meristem tunas. Tunas selanjutnya dapat diakarkan untuk mendapatkan tanaman utuh. Embriogenesis somatik merupakan proses regenerasi ta-

naman melalui pembentukan struktur menyerupai embrio (*embrioid*) dari sel-sel somatik yang telah memiliki calon akar dan tunas (serupa embrio zigotik). Tanaman utuh diperoleh dari hasil perkecambahan embrio somatik tersebut.

Morfogenesis tunas dan embriogenesis somatik merupakan dua proses yang berbeda dan keduanya sangat tergantung kepada sumber eksplan dan jenis media kultur yang digunakan. Meskipun sistemnya berbeda, ada beberapa hal yang sama. Kedua sistem sangat dipengaruhi oleh kultivar/genotipe tanaman (*cultivar-specific responses*), di mana beberapa galur lebih responsif terhadap media kultur dari galur lainnya. Galur tanaman yang memiliki respon tinggi untuk morfogenesis, mungkin tidak responsif dalam pembentukan embrio somatik. Galur yang dapat membentuk sejumlah besar embrio somatik selama tahap induksi, mungkin tidak dapat memberikan pertumbuhan/proliferasi yang cepat. Sehingga kondisi kultur jaringan yang optimum untuk masing-masing galur/kultivar harus ditentukan sesuai dengan metode regenerasinya. Hal lain yang sama adalah kultur proliferasi dapat terjadi pada kedua sistem regenerasi. Proliferasi sangat berguna terhadap kedua sistem, karena dapat merangsang sel tunggal yang telah tertransformasi untuk multiplikasi membentuk jaringan yang lebih besar dan menghasilkan tunas/embrio somatik. Untuk mendapatkan pengetahuan tentang kegunaan dan keterbatasan masing-masing sistem regenerasi, maka morfogenesis tunas dan embriogenesis somatik kedelai perlu diinduksi terlebih dahulu.

Morfogenesis tunas (*organogenesis*) dilaporkan pertama kali oleh Wright *et al.* (1986). Mereka menjelaskan sistem di mana tunas-tunas dapat diperoleh secara *de novo* dari nodus kotiledon kecambah kede-

lai (Gambar 1). Jaringan meristem tunas terbentuk di bawah jaringan epidermis dan jaringan morfogenik dapat berproliferasi pada media yang mengandung *benzyl adenine* (BA).

Embriogenesis somatik pada kedelai pertama kali dilaporkan oleh Christianson *et al.* (1983). Jaringan embriogenesis berhasil diinduksi dari eksplan embrio zigotik. Jaringan embriogenik dapat berproliferasi, tetapi sistem ini sulit diulang dan asal dari embrio somatik tidak diketahui. Studi berikutnya secara histologi terhadap kultur jaringan embriogenik kedelai diketahui bahwa proliferasi embrio ber-

asal dari sel-sel permukaan/apikal dan hanya sedikit sel yang terlibat dalam pembentukan embrio somatik (Finer, 1988) (Gambar 2). Pada studi tersebut, sel-sel di permukaan atas embrio lama membentuk embrio baru. Namun, embrio somatik kedelai tidak selalu berasal dari sel-sel apikal. Embrio somatik primer (embrio pertama yang muncul dari eksplan) tergantung kepada jaringan eksplan dan kadar auksin pada media induksinya (Hartweck *et al.*, 1988). Melalui proses proliferasi, satu sel atau sekelompok kecil sel di permukaan embrio primer membentuk embrio somatik baru (embrio sekunder).



Tunas muncul pada bagian aksilar (ketiak) eksplan kotiledon tua kedelai varietas Wilis

Gambar 1. Organogenesis pada kedelai



Embrio somatik muncul pada permukaan eksplan kotiledon muda kedelai varietas Tidar

Gambar 2. Embriogenesis somatik pada kedelai

Kultur embriogenik juga dapat digunakan dengan baik untuk transformasi, jika asal dari embrio dan keterbatasan biologis dari proliferasi kultur embriogenik telah diketahui. Keterbatasan biologis termasuk kesulitan perkembangan kultur embriogenik hasil proliferasi dan masalah penurunan fertilitas tanaman (variasi akibat kultur) yang sering terjadi pada proses proliferasi kultur embriogenik yang lama.

PERKEMBANGAN PENELITIAN TRANSFORMASI KEDELAI

Sejak ada laporan pertama tentang transformasi dan regenerasi tanaman tembakau (Horsch *et al.*, 1985), diperkirakan bahwa semua tanaman akan dapat ditransformasi secara rutin dalam waktu dekat. Namun, kedelai dan beberapa tanaman lain masih sulit ditransformasi.

Walaupun transformasi kedelai telah dilaporkan pada tahun 1988 oleh dua laboratorium yang berbeda dengan protokol yang berbeda pula (Hinchee *et al.*, 1988; McCabe *et al.*, 1988), namun tingkat keberhasilan transformasi kedelai masih rendah di berbagai laboratorium yang mencoba. Kenyataannya, hanya sedikit laboratorium yang dapat mengulangi keberhasilan transformasi kedelai seperti yang dilaporkan pertama tersebut sehingga masih perlu dikembangkan metode introduksi gen asing ke dalam tanaman kedelai agar lebih efisien, efektif, dan dapat diulang (*reproducible*).

Penelitian regenerasi tanaman kedelai secara *in vitro* juga telah dicoba di Indonesia, di antaranya oleh Pardal *et al.* (1994) untuk melihat pengaruh jenis dan umur eksplan serta genotipe kedelai terhadap kultur embrio muda kedelai. Kemudian Pardal *et al.* (1997) melakukan regenerasi kedelai secara *in vitro* menggunakan dua macam

eksplan, dua jalur regenerasi dan empat varietas kedelai Indonesia. Hasil kedua penelitian tersebut menunjukkan daya regenerasi kedelai yang masih sangat rendah. Namun Mariska *et al.* (2001) berhasil melakukan regenerasi tiga varietas kedelai melalui jalur embriogenesis somatik dari eksplan embrio muda kedelai dengan tingkat keberhasilan yang cukup tinggi.

Penelitian transformasi kedelai berikutnya lebih mengarah kepada perbaikan sistem regenerasi (Finer dan McMullen, 1991; Santarem *et al.*, 1998; Trick dan Finer, 1998; Santarem dan Finer, 1999), dan perbaikan metode transformasi (Finer *et al.*, 1991; Trick dan Finer, 1997).

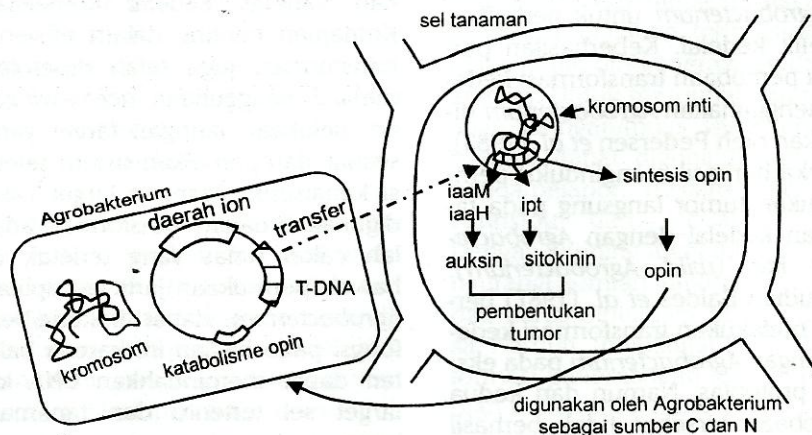
METODE TRANSFORMASI GENETIK KEDELAI

Gen asing dapat diintroduksi ke dalam genom kedelai seperti pada jenis tanaman lain baik secara biologi (tidak langsung) atau fisik (langsung). Karena *Agrobacterium* merupakan satu-satunya vektor biologi untuk transformasi kedelai, maka beberapa metode transformasi secara fisik banyak dikembangkan.

Pada transformasi tidak langsung (alami) melalui *Agrobacterium*, bakteri diinokulasi ke permukaan jaringan responsif dan DNA

asing akan ditransfer ke dalam genom sel target oleh adanya T-DNA pada *Agrobacterium* (Gambar 3). Agar teknik ini efektif, *Agrobacterium* harus dapat memasukkan DNA ke dalam jaringan target yang kompeten dan selanjutnya *Agrobacterium* dihilangkan/dimatikan. Masalah utama dalam penggunaan *Agrobacterium* adalah jenis jaringan dan adanya inkompatibilitas inang. Meskipun kedelai sesuai untuk inang *Agrobacterium*, tetapi kurang responsif untuk infeksi dan transfer DNA seperti tanaman dikotil lainnya. Embrio dan jaringan embriogenik sangat tipikal kurang sensitif terhadap infeksi *Agrobacterium*. Adanya inkompatibilitas antara *Agrobacterium* dan kedelai telah diatasi dengan penggunaan strain *Agrobacterium* yang memiliki virulensi tinggi (Hansen *et al.*, 1994) dan *acetosyringone* senyawa penginduksi proses transfer DNA (Stachel *et al.*, 1985).

Metode transformasi genetik secara fisik (langsung) untuk introduksi DNA di antaranya adalah *particle bombardment* (Sanford, 1988), elektroporasi protoplas (Shillito *et al.*, 1985), elektroporasi jaringan utuh (D'Halluin *et al.*, 1992), dan silikon karbida *whiskers* (Kaeppeler *et al.*, 1990). Beberapa metode lain telah dicoba seperti



Gambar 3. Mekanisme transfer gen secara alami oleh bakteri *Agrobacterium tumefaciens* ke dalam sel tanaman inang

Tanaman kedelai transgenik telah berhasil diperoleh melalui penembakan partikel terhadap kultur suspensi embriogenik oleh beberapa laboratorium (Finer dan McMullen, 1991; Sato *et al.*, 1993; Parrott *et al.*, 1994). Sistem transformasi ini tergantung pada stadium kultur suspensi embriogenik kedelai (Finer dan Nagasawa, 1988) di mana jaringan embriogenik berasal dari proliferasi sel-sel permukaan embrio somatik primer (Finer, 1988; Finer dan McMullen, 1991). Proliferasi sel-sel permukaan (*epidermis*) menjadikan sistem transformasi lebih efisien untuk transformasi, karena sel-sel embriogenik hasil proliferasi di permukaan jaringan eksplan dapat dengan mudah ditembak. Selain itu, proses seleksi jaringan transforman terhadap antibiotik atau herbisida dapat dilakukan dengan mudah melalui kultur suspensi ini (Finer *et al.*, 1996).

Meskipun sistem penembakan menggunakan jaringan kultur suspensi embriogenik memiliki kelebihan dibandingkan dengan penembakan meristem, tetapi ada beberapa kendala berkaitan dengan kultur *in vitro* (regenerasi tanaman transforman). Kendala pertama adalah sulitnya menghasilkan kultur suspensi sel embriogenik. Selanjutnya, regenerasi tanaman melalui kultur suspensi dapat terjadi variasi genetik, seperti sterilitas sebagian atau sterilitas penuh. Namun, kendala kedua ini dapat diatasi dengan memperpendek proses induksi kultur suspensi sel, dan ternyata tanaman hasil regenerasinya tetap fertil.

Pada kedua sistem transformasi melalui *particle bombardment*, partikel pembawa DNA hanya dapat menembus 1-2 lapis sel. Perbedaan efisiensi dari kedua sistem ini berhubungan dengan kemampuan penargetan penembakan sel yang mampu membentuk tanaman utuh. Namun hingga kini belum ada alat penembak yang dapat mengatur

kedalaman penetrasi partikel pada jaringan target (Finer *et al.*, 1996).

KESIMPULAN

Kedelai masih merupakan salah satu jenis tanaman yang tidak mudah dimanipulasi secara *in vitro*. Walaupun telah banyak dilaporkan keberhasilan kultur jaringan kedelai, namun masih sulit diulang dan sangat dipengaruhi oleh genotipe.

Demikian juga dengan transformasi kedelai, walaupun telah dilaporkan keberhasilannya oleh dua laboratorium yang berbeda dengan protokol yang berbeda pula ternyata masih sulit diulang keberhasilannya oleh laboratorium lain.

DAFTAR PUSTAKA

- Baldes, R., M. Moos, and K. Geider. 1987. Transformation of soybean protoplasts from permanent suspension cultures by cocultivation with cells of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology* 9:135-145.
- Barwale, U.B., H.R. Kerns, and J.M. Widholm. 1986. Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. *Planta* 167:473-481.
- Bidney, D., C. Scelonge, J. Martich, M. Burrus, L. Sims, and G. Huffman. 1992. Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology* 18:301-313.
- Cao, J., X. Duan, D. McElroy, and Ray Wu. 1992. Regeneration of herbicide resistant transgenic rice plants following microprojectile mediated transformation of suspension culture cells. *Plant Cell Reports* 11:586-591.
- Chee, P.P., K.A. Fober, and J.L. Slightom. 1989. Transformation of soybean (*Glycine max*) by infecting germinating seeds with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiology* 91:1212-1218.
- Christianson, M.L., D.A. Warnick, and P.S. Carlson. 1983. A morphologically competent soybean suspension culture. *Science* 222:632-634.
- Christou, P. 1990. Morphological description of transgenic soybean chimeras created by the delivery, integration and expression of foreign DNA using electric discharge particle acceleration. *Annals of Botany* 66:379-386.
- Christou, P. and D.E. McCabe. 1992. Prediction of germ-line transformation events in chimeric Ro transgenic soybean plantlets using tissue-specific expression patterns. *Plant Journal* 2:283-290.
- Christou, P., D.E. McCabe, and W.F. Swain. 1988. Stable transformation of soybean calus by DNA-coated gold particles. *Plant Physiology* 87:671-674.
- Christou, P., W.F. Swain, Y. Nuryani, and D.E. McCabe. 1989. Inheritance and expression of foreign genes in transgenic soybean plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86:7500-7504.
- Christou, P., T.L. Ford, and M. Kofron. 1991. Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important Indica and Japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. *Bio/Technology* 9:957-962.
- D'halluin, K., E. Bonne, M. Bossut, M.D. Beuckeleer, and J. Leemans. 1992. Transgenic maize plants by tissue electroporation. *Plant Cell* 4:1495-1505.
- Finer, J.J. 1988. Apical proliferation of embryogenic tissue of soybean (*Glycine max* [L.] Merrill). *Plant Cell Reports* 7:238-241.
- Finer, J.J. and Nagasawa A. 1988. Development of an embryogenic suspension culture of soybean (*Glycine max* [L.] Merrill). *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture* 15:125-136.
- Finer, J.J. and M.D. McMullen. 1990. Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via particle bombardment. *Plant Cell Reports* 8:586-589.

- Finer, J.J. and M.D. McMullen. 1991. Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 27:175-182.
- Finer, J.J., P. Vain, M.W. Jones, and M.D. McMullen. 1992. Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. *Plant Cell Reports* 11:323-328.
- Finer, J.J., T.S. Cheng, and D.P.S. Verma. 1996. Soybean transformation: Technologies and progress. In Verma and Shoemaker (Eds.) *Soybean: Genetics, Molecular Biology, and Biotechnology*. Biotechnology in Agriculture No. 14. CAB International.
- Fromm, M.E., F. Morrish, C. Armstrong, R. Williams, J. Thomas, and T.M. Klein. 1990. Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. *Bio/Technology* 8:833-839.
- Gordon-Kamm, W.J., T.M. Spencer, M.L. Mangano, T.R. Adams, R.J. Daines, W.G. Start, J.V. O'Brien, S.A. Chambers, W.R.J. Adams, N.G. Willetts, T.B. Rice, C.J. Mackey, R.W. Krueger, A.P. Kausch, and P.G. Lemaux. 1990. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *Plant Cell* 2:603-618.
- Hansen, G., A. Das, and M.D. Chilton. 1994. Constitutive expression of the virulence genes improves the efficiency of plant transformation by *Agrobacterium*. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 91:7603-7607.
- Hartweck, L.M., P.A. Lazzeri, D. Cui, G.B. Collin, and E.G. Williams. 1988. Auxin orientation effect on somatic embryogenesis from immature soybean cotyledons. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 24:821-828.
- Hinchee, M.A.W., D.V. 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/Tech.* 6:915-922.
- Horsch, R.B., J.E. Fry, N.L. Hoffman, D. Eicholtz, S.G. Rogers, and R.T. Fraley. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227:1229-1231.
- Kaeppeler, H.F., W. Gu, D.A. Somers, H.W. Rines, and A.F. Cockburn. 1990. Silicon carbide-mediated DNA delivery into plant cells. *Plant Cell Reports* 9:415-418.
- Klein, T.M., M. Fromm, A. Weissinger, D. Tomes, S. Scahna, M. Sletten, and J. Sanford. 1988. Transformation of maize cells using high velocity microprojectile. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 85:4305-4309.
- Mariska, I., S. Hutami, M. Kosmianin, A. Husni, W.H. Adil, and Y. Supriyati. 2001. Somatic embryogenesis in different soybean varieties. *Proceedings of Workshop on Soybean Biotech for Al Tolerant in Acid Soils and Disease Resistance*. Research Institute for Food Crop Biotechnology Bogor. p. 34-45.
- McCabe, D.E., W.F. Swain, B.J. Martinell, and P. Christou. 1988. Stable transformation of soybean (*Glycine max* L.) by particle acceleration. *Bio/Technology* 6:923-926.
- McCabe, D.E. and B.J. Martinell. 1993. Transformation of elite cotton cultivars via particle bombardment of meristems. *Biotechnology* 11: 596-598.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Nuryani, Y. and P. Christou. 1990. Cell type specific expression of a CaMV 35S-GUS gene in transgenic soybean plants. *Developmental Genetics* 11:289-293.
- Pardal, S.J., G.A. Wattimena, M.F. Masyhudi, dan S. Harran. 1994. Pengaruh umur embrio dan genotipe tanaman terhadap pertumbuhan kultur embrio muda kedelai. *Zuriat* 5(2):51-56.
- Pardal, S.J., D.R. Untari, A. Sisharmini, D. Rijadi, dan M. Herman. 1997. Regenerasi kedelai secara *in vitro*. In Moeljopawiro, S., M. Herman, S. Saono, I. Mariska, B. Purwantara, dan H. Kasim (Eds.). *Prosiding Seminar Perhimpunan Bio-teknologi Pertanian Indonesia*. Surabaya, 12-14 Maret 1997. hlm. 27-38.
- Parrott, W.A., L.M. Hoffman, D.F. Hildebrand, E.G. Williams, and G.B. Collins. 1989. Recovery of primary transformant soybean. *Plant Cell Reports* 7:615-617.
- Parrott, W.A., J.N. Ali, M.J. Adang, M.A. Bailey, and H.R. Boerma. 1994. Recovery and evaluation of soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) plants transgenic for *Bacillus thuringiensis* var *Kurstaki* insecticidal gene. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 30:144-149.
- Pedersen, H.C., J. Christiansen, and R. Wyndaele. 1983. Induction and *in vitro* culture of soybean crown gall tumors. *Plant Cell Reports* 2:201-204.
- Pierik, R.L.M. 1987. *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publisher, Lancaster.
- Sanford, J.C. 1988. The biolistic process. *Trends in Biotechnology* 6:299-302.
- Sanford, J.C., F.D. Smith, and J.A. Russell. 1993. Optimizing the biolistic process during different biological applications. *Methods in Enzymology* 217:483-509.
- Santarem, E.R., H.N. Trick, J.S. Essig, and J.J. Finer. 1998. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean immature cotyledons: Optimization of transient expression. *Plant Cell Reports* 17:752-759.
- Santarem, E.R. and J.J. Finer. 1999. Transformation of soybean (*Glycine max* [L.] Merrill) using proliferative embryogenic tissue maintained on semi-solid medium. *In Vitro Cellular Developmental Biology* 35:451-455.
- Sato, S., C. Newell, K. Kolacz, L. Tredo, J.J. Finer, and M. Hinchee. 1993. Stable transformation via particle bombardment in two different soybean regeneration systems. *Plant Cell Reports* 12:408-413.
- Sauter, C., H. Waldner, G. Neuhaus-Urli, A. Galli, G. Neuhaus, and I. Potrykus. 1991. Micro targeting: High efficiency gene transfer using a novel approach for the acceleration of micro-projectiles. *Bio/Technology* 9: 1080-1085.

- Shilito, R.D., M.W. Saul, J. Paszkowski, M. Mueller, and I. Potrykus. 1985. High efficiency direct gene transfer to plants. *Bio/Technology* 3:1099-1103.
- Stachel, S.E., E. Messens, M. Van Montagu, and P. Zambryski. 1985. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells which activate the T-DNA transfer process in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 318:624-629.
- Takeuchi, Y., M. Dotson, and N.T. Keen. 1992. Plant transformation: A simple particle bombardment device based on flowing helium. *Plant Molecular Biology* 18:835-839.
- Trick, H.N. and J.J. Finer. 1997. SAAT: Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation. *Transgenic Research* 6:329-336.
- Trick, H.N. and J.J. Finer. 1998. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean (*Glycine max* [L.] Merrill) embryogenic suspension culture tissue. *Plant Cell Reports* 17:482-488.
- Vain, P., M.D. McMullen, and J.J. Finer. 1993. Osmotic treatment enhances particle bombardment mediated transient and stable transformation of maize. *Plant Cell Reports* 12:84-88.
- Vasil, V., S.M. Brown, D. Re, and I. Vasil. 1992. Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by micro projectile bombardment of regenerable embryogenic callus. *Bio/Technology* 10:667-674.
- Wattimena, G.A. 1992. Bioteknologi tanaman. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi, PAU Bioteknologi IPB. 71 hlm.
- Weeks, J.T., O.D. Anderson, and A.E. Blechl. 1993. Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Physiology* 102:1077-1084.
- Wright, M.S., S.M. Kohler, M.A. Hinchee, and M.G. Carnes. 1986. Plant regeneration by organogenesis in *Glycine max*. *Plant Cell Reports* 5:150-154.
-