

# Introduksi Gen SOD (*Superoxide Dismutase*) pada Tanaman Tembakau (*Nicotiana tabacum*) dengan Metode Infiltrasi dan *Agrobacterium*

Imam Safir Alwan Nurza<sup>1\*</sup>, Dini Nurrahmawati<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institut Pertanian Bogor, Indonesia

<sup>2</sup>Universitas Negeri Jakarta, Indonesia

## ABSTRACT

Plant transformation is process inserting DNA from one plant into another. Transformation is needed to develop plant characteristics to resistant abiotic stress and pathogen attacks. Plant transformation process can use the infiltration method and *Agrobacterium*. Infiltration method used on plant leaf organs. *Agrobacterium* is used as transformation medium because it contains T-DNA which integrate to plant DNA. Infiltration method and *Agrobacterium* experimented with tobacco plant. Because tobacco plant are easy to transform and can improve agronomic properties. However, transformation tobacco plant using infiltration method and *Agrobacterium* has not been studied with the introduction SOD gene. Thus, this research aimed to introduce SOD gene into tobacco plant and isolate putative transgenic DNA as confirmation success introduction and plant transformation. The research method used was infiltration with *Agrobacterium* as medium for introducing SOD gene into tobacco plant. Plant transformation is done by wounding leaf organs. Leaf organs were soaked in solution containing *Agrobacterium* and stirred for 20 minutes. Leaf organs are grown in tissue culture using selection media MS and antibiotics until become whole plants. Isolation of putative transgenic DNA was carried out on plant leaves and amplification SOD gene using PCR. The research results showed that SOD gene was successfully introduced and transformation occurred in tobacco plants. This success is obtained from leaf tissue which grows into a whole plant. Whole plants carrying SOD gene are indicated by appearance of band after PCR amplification. Transformation with SOD gene can increase resistance of tobacco plants to oxidative stress.

## ABSTRAK

Transformasi tanaman adalah proses penyisipan DNA dari satu tanaman ke tanaman lain. Transformasi diperlukan untuk mengembangkan karakter tanaman menjadi tahan terhadap cekaman abiotik dan serangan patogen. Proses transformasi tanaman dapat dilakukan dengan metode infiltrasi dan *Agrobacterium*. Metode infiltrasi digunakan pada organ daun tanaman. *Agrobacterium* digunakan sebagai media transformasi karena mengandung T-DNA yang berintergrasi dengan DNA tanaman. Metode infiltrasi dan *Agrobacterium* diekspresikan pada tanaman tembakau. Karena tanaman tembakau mudah ditransformasi dan dapat memperbaiki sifat agronomi. Namun, transformasi tanaman tembakau menggunakan metode infiltrasi dan *Agrobacterium* belum diteliti dengan introduksi gen SOD. Sehingga, Tujuan penelitian ini dilakukan untuk mengintroduksi gen SOD pada tanaman tembakau dan mengisolasi DNA transgenik putatif sebagai konfirmasi keberhasilan introduksi dan transformasi tanaman. Metode penelitian yang digunakan adalah infiltrasi dengan *Agrobacterium* sebagai media introduksi gen SOD pada tanaman tembakau. Transformasi tanaman dilakukan dengan pelukaan organ daun. Organ daun direndam dengan larutan berisi *Agrobacterium* dan diaduk selama 20 menit. Organ daun ditumbuhkan secara kultur jaringan dengan media seleksi berupa MS dan antibiotik hingga menjadi tanaman utuh. Isolasi DNA transgenik putatif dilakukan pada daun tanaman dan amplifikasi gen SOD dengan PCR. Hasil penelitian menunjukkan gen SOD berhasil terintroduksi dan terjadi transformasi pada tanaman tembakau. Keberhasilan ini diperoleh dari jaringan daun yang tumbuh menjadi tanaman utuh. Tanaman utuh membawa gen SOD diindikasikan dengan muncul pita setelah amplifikasi PCR. Transformasi dengan gen SOD dapat meningkatkan ketahanan tanaman tembakau terhadap cekaman oksidatif.

## KONTAK

imamnurza@apps.ipb.ac.id

## KATA KUNCI

*Agrobacterium*, Infiltrasi, SOD, Tembakau

## PENDAHULUAN

Transformasi tanaman adalah proses yang penyisipan DNA dari satu tanaman ke tanaman lain atau ke dalam genom tanaman yang diinginkan. Teknik modifikasi genetik ini digunakan untuk mempelajari genotipe dan meningkatkan karakter tanaman, seperti hasil, ketahanan terhadap penyakit, toleransi terhadap cekaman, dan produksi nutrisi (Su *et al.*, 2023; Anjanappa dan Gruissem 2021). Ada dua tipe utama transformasi tanaman, yaitu transformasi stabil dan sementara. Transformasi stabil dimana gen diintegrasikan sepenuhnya ke dalam genom tanaman target dan diekspresikan secara terus-menerus. Transformasi sementara dimana ekspresi gen sementara dalam jaringan tanaman untuk pengujian cepat. Prosesnya biasanya mencakup pengiriman DNA ke dalam satu sel dan meregenerasinya menjadi tanaman yang subur. Ini dapat dicapai dengan menggunakan metode seperti transformasi yang dimediasi oleh *Agrobacterium* (Kaur *et al.*, 2021; Hwang *et al.*, 2017).

Tujuan transformasi tanaman untuk memasukkan gen dari organisme lain ke dalam genom tanaman, memahami fungsi gen, mengembangkan karakter tanaman yang beragam secara genetik, dan meningkatkan program pemuliaan. Selain itu, transformasi tanaman dapat berperan dalam memproduksi senyawa-senyawa yang penting secara medis, merekayasa tanaman untuk menghadapi perubahan iklim dan perbaikan karakter tanaman (Li *et al.*, 2024; Altpeter *et al.*, 2016).

DNA asing dapat masuk ke dalam sel tanaman untuk transformasi dicapai melalui berbagai metode. Prosesnya biasa mencakup dua tahap, yaitu transfer DNA ke dalam satu sel dan regenerasi menjadi tanaman melalui kultur jaringan (Yan *et al.*, 2023). Transformasi yang diperantara oleh *Agrobacterium* adalah salah satu metode paling efisien untuk transfer gen. Metode ini melibatkan kolonisasi dan pembentukan sistem virulensi oleh bakteri. Ini juga diikuti dengan transfer fragmen DNA vektor ke dalam genom tanaman (Hwang *et al.*, 2017). Pistol partikel adalah metode lain yang digunakan untuk pengiriman gen pada tanaman. Metode ini melibatkan penggunaan partikel berkecepatan tinggi untuk mengirimkan DNA ke dalam sel tanaman (Godbey, 2021). Regenerasi *in vitro* melalui embriogenesis atau organogenesis merupakan syarat untuk metode transfer DNA (T-DNA) yang dimediasi *Agrobacterium tumefaciens* untuk menghasilkan tanaman transgenik (Nakano dan Otani, 2020). Gen penanda yang dapat dipilih berupa gen reporter dan vektor *Gateway* digunakan untuk memfasilitasi pemilihan sel yang ditransformasi dalam kultur jaringan (Thomson *et al.*, 2011). Vektor biner dan vektor super-biner juga digunakan untuk merakit gen yang diinginkan dengan promotor dan sinyal terminasi pada bakteri *Escherichia coli* untuk kloning (Komari *et al.*, 2006). Perkembangan teknologi dalam transformasi genetik tanaman seperti transformasi sementara melalui magnetofeksi serbuk sari (Zhang *et al.*, 2019).

Prinsip transformasi tanaman berupa desain vektor, pemilihan tanaman sebagai inang, eksplan dan kultur jaringan, metode transfer DNA, seleksi dan regenerasi, skrining, dan karakterisasi. Desain vektor berupa vektor transformasi yang direkayasa untuk membawa DNA asing ke dalam sel tanaman. Vektor-vektor ini biasanya mengandung elemen pengendali, seperti promotor, terminator, dan penanda seleksi untuk memastikan ekspresi dan integrasi DNA stabil yang dimasukkan ke dalam genom tanaman (Nora *et al.*, 2019). Pemilihan tanaman inang pada spesies tanaman yang berbeda memiliki efisiensi dan transformasi yang berbeda-beda. Pemilihan tanaman inang bergantung pada faktor, seperti kemudahan transformasi, kemampuan regenerasi, dan karakter agronomi yang diinginkan (Pathi dan Sprink, 2023). Eksplan dan Kultur Jaringan merupakan teknik kultur tanaman yang sering digunakan untuk meregenerasi seluruh tanaman dari potongan kecil jaringan tanaman (eksplan). Eksplan dapat berasal dari berbagai bagian tanaman, seperti daun, batang, dan embrio. Eksplan ini dikultur pada media yang dilengkapi dengan zat pengatur tumbuh untuk menginduksi pembentukan kalus dan selanjutnya regenerasi tunas (Putri *et al.*, 2023; Hasnain, 2022). Metode transfer DNA yang digunakan berupa media *Agrobacterium*, transformasi biolistik, dan elektroporasi (Çiftçi, 2012).

Transformasi yang dimediasi oleh *Agrobacterium* adalah salah satu metode yang paling banyak digunakan, dimana *Agrobacterium tumefaciens* yang direkayasa secara genetik mentransfer DNA ke dalam sel tanaman (Hwang *et al.*, 2017). *Agrobacterium tumefaciens* digunakan dalam transformasi tanaman karena kemampuannya yang unik dalam mengirimkan gen yang diinginkan ke tanaman inang secara efektif. Bakteri ini bermanfaat untuk transformasi tanaman karena transfer gen yang efisien, dapat digunakan untuk transformasi pada berbagai spesies tanaman, memiliki integrasi yang baik untuk mekanisme transfer T-DNA ke dalam genom tanaman (Agrawal dan Rami, 2022). Seleksi dan regenerasi dilakukan setelah transfer DNA. Sel yang ditransformasi harus diseleksi dan diregenerasi menjadi tanaman utuh. Penanda yang dapat dipilih dapat berupa resistan terhadap antibiotik atau herbisida (Dormatey *et al.*, 2021). Skrining dan karakterisasi dilakukan pada tanaman transgenik untuk memastikan keberadaan dan ekspresi DNA. Teknik ini dapat berupa PCR, southern blotting, dan RT-PCR biasanya digunakan untuk tujuan pengecekan tanaman transgenik (Glowacka *et al.*, 2016).

Tanaman tembakau ditransformasi karena menghasilkan senyawa terapeutik, sebagai tanaman model untuk penelitian, dapat menyerap polutan lingkungan, dan dapat memperbaiki sifat agronomi, seperti tahan hama dan penyakit (Tremblay *et al.*, 2010). Keuntungan menggunakan tanaman tembakau hasil rekayasa genetika berupa efektivitas biaya karena tanaman tembakau relatif mudah dan murah untuk ditanam. Tanaman ini memiliki bioreaktor yang menarik untuk memproduksi obat-obatan dibandingkan dengan metode kultur sel tradisional. Skalabilitasnya besar di lahan pertanian atau lingkungan tertutup, sehingga memudahkan produksi obat-obatan atau senyawa lainnya dalam jumlah besar. Tanaman tembakau memiliki siklus pertanaman yang relatif pendek dibandingkan tanaman lainnya, sehingga mempercepat siklus produksi untuk tujuan farmasi atau penelitian. Efisiensi transformasi tinggi yang sangat mudah menerima untuk transformasi genetik. Kemudahan ini memungkinkan introduksi gen asing secara efisien dan generasi transgenik yang cepat (Murthy *et al.*, 2023; Lee *et al.*, 2023; Kowalczyk *et al.*, 2022). Sehingga, tujuan penelitian ini dilakukan untuk mengintroduksi gen SOD pada tanaman tembakau dan mengisolasi DNA transgenik putatif sebagai konfirmasi keberhasilan introduksi dan transformasi tanaman.

## METODOLOGI

Penelitian ini menggunakan metode infiltrasi dan *Agrobacterium* untuk mentransformasi tanaman tembakau dengan gen SOD. Metode infiltrasi dilakukan dengan rendam dan aduk pada daun tembakau sebagai eksplan. Bakteri yang digunakan adalah *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 sebagai media transfer gen SOD ke tanaman. Introduksi gen SOD ke tanaman tembakau dilakukan dengan rendam daun yang sudah dilukai ke dalam larutan berisi bakteri *A. tumefaciens* (pembawa gen SOD) dan diaduk.

Introduksi gen SOD ke tanaman tembakau dilakukan dengan menyiapkan eksplan berupa daun yang dipotong berukuran 0.5 cm<sup>2</sup> atau 1 cm<sup>2</sup>. Kemudian, direndam dalam *A. tumefaciens* OD 600 0.3-0.5 selama 10 menit di *shaker* 100 rpm pada suhu ruang. Eksplan dikeringkan dengan tisu steril. Dua botol kultur jaringan digunakan berisi 12 eksplan dalam media. Setiap botol kultur jaringan berisi 6 eksplan. Eksplan ditanam dalam media kultivasi COT (MS instan 4.33g/L, vitamin, sukrosa 30 g/L, BAP 0.5 mg/L, IAA 0.1 mg/L, 20 mg/L asetosirongon, agar gelrit 3 g/L) selama tiga hari di ruang gelap suhu 24°C. Setelah di media kokultivasi selama 3 hari. Eksplan dicuci dengan air steril sekali dan direndam dalam larutan antibiotik (sefotaksim 200 mg/L) sebanyak tiga kali dengan rendaman terakhir selama 10 menit. Eksplan dipindahkan ke media regenerasi tunas CIMT (MS instan 4.33g/L + vitamin + BAP 2.5 mg/L + IAA 0.2 mg/L + sefotaksim 100 mg/l + sukrosa 30 g/L + agar gelrit 3g/L) selama 10-12 hari. Subkultur dilakukan ketika kalus sudah tumbuh dan dipindahkan ke media CIMTH (MS instan 4.33g/L + vitamin + BA 2.5 mg/L + IAA 0.2 mg/L + Higromisin 30 mg/L + sefotaksim 100 mg/l + sukrosa 30 g/L + agar gelrit 3 g/L). Eksplan ditumbuhkan dalam media CIMTH selama 30 hari hingga tumbuh tunas. Hasil transformasi dan regenerasi pada kalus yang tumbuh tunas dihitung dengan rumus sebagai berikut.

Transformasi Tanaman Tembakau

$$\text{Tranformasi} = \frac{\sum \text{Kalus}}{\sum \text{Kalus Resisten Higromisin}}$$

Regenerasi Tanaman Tembakau

$$\text{Regenerasi} = \frac{\sum \text{Kalus Resisten Higromisin}}{\sum \text{Kalus yang Bertunas Terbentuk}}$$

Setelah dilakukan transformasi tanaman. Selanjutnya, dilakukan konfirmasi gen SOD dengan mengisolasi DNA tanaman tembakau transgenik putatif. Isolasi DNA tanaman tembakau transgenik dilakukan dengan metode CTAB. Metode CTAB digunakan berupa *buffer* untuk melisis membran sel. *Buffer* CTAB dipersiapkan dengan CTAB 2% dan PVP 2% berisi 600 µl. kemudian, *buffer* CTAB dicampurkan dengan 0.2% 2-Mercaptoetanol dan diinkubasi pada suhu 65°C. Sampel tanaman berupa kalus diambil dan digerus nitrogen cair sampai jadi tepung sebanyak 0.1 gr. Tepung dimasukkan ke dalam *tube* berisi CTAB. Sampel divorteks atau bolak-balik. Kemudian, sampel diinkubasi pada suhu 65°C selama 30 menit (Setiap 10 menit dibolak-balik). Sampel didiamkan selama 5 menit. Setelah itu, sampel ditambahkan 600 µl C:I dan dibolak-balik. Lalu, sampel disentrifugasi 10.000 rpm selama 10 menit dan diambil fase atas. Fase atas ditambahkan PCI 1x volume dan dibolak-balik. Kemudian, campuran disentrifugasi 10.000 rpm selama 10 menit. Fase atas diambil dan ditambahkan NaOAc 0.1X volume dan EtOH

100% 2-3x volume. Sampel disimpan dalam *freezer* semalaman. Sampel yang sudah didinginkan dalam *freezer* semalaman disentrifugasi 10.000 rpm selama 25 menit pada suhu 4°C. Pelet diperoleh dan ditambahkan 500 µl EtOH 70%. Sentrifugasi 10.000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Kemudian, pelet dikeringkan dengan *vacuum dry* selama 20 menit. Setelah itu, pelet ditambahkan 15 µl ddH<sub>2</sub>O dan 0.2x volume RNase. Inkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit.

Analisis kualitatif dilakukan dengan pengamatan elektroforesis. Elektroforesis dilakukan melalui pembuatan gel agarosa 1% dengan mencampurkan 0.35 g agarosa dan 35 ml *buffer* TAE. Kemudian, di *microwave* selama 1 menit sampai bening dan tunggu hangat. Lalu, dituangkan ke dalam cetakan. Cetakan berisi gel agarosa dimasukkan ke dalam elektroforesis dan ditambahkan *buffer* TAE sampai gel agarosa tenggelam. Kemudian, sampel DNA plasmid diambil 5 µl dan ditambahkan dengan larutan *loading dye* 1 µl. Keduanya diresuspensi dengan cara *pipetting*. Lalu, dimasukkan ke dalam elektroforesis. DNA marker Lambda juga dimasukkan sebanyak 1 µl dan 3 µl. Setelah itu, dijalankan elektroforesis dengan 100 volt selama 28 menit. Setelah itu, gel agarosa direndam dengan larutan EtBr selama 15 menit dan divisualisasikan dengan UV transiluminator untuk mengamati ada atau tidaknya pita (DNA tanaman transgenik).

Analisis kuantitatif dilakukan dengan pengamatan spektrofotometer UV-VIS. Pengamatan dilakukan dengan menyiapkan dua kuvet, yaitu blanko berisi aquades dan sampel DNA tanaman transgenik. Satu kuvet diisi dengan aquades 698 µl dan satu kuvet diisi 2 µl sampel DNA tanaman transgenik. Kuvet blanko diisi dengan aquades 700 µl. Kemudian, kuvet blanko dimasukkan ke dalam spektrofotometer UV-VIS dan diatur lambda 260 nm. Lalu, ditekan dan dicatat hasilnya. Kemudian, dikeluarkan blanko, dimasukkan kuvet sampel DNA tanaman transgenik, ditekan kembali pada lambda 260 nm, dan dicatat hasilnya. Kemudian, kuvet sampel DNA tanaman transgenik dikeluarkan dan dimasukkan kuvet blanko. Lalu, diatur ke lambda 280 nm dan dicatat hasilnya. Setelah itu, kuvet blanko dikeluarkan dan dimasukkan kuvet sampel DNA tanaman transgenik. Lalu, ditekan lagi pada lambda 280 nm dan dicatat hasilnya. Hasil yang didapatkan dihitung dengan rumus sebagai berikut untuk mengetahui kemurnian DNA transgenik dan konsentrasinya.

Kemurnian DNA Tanaman Transgenik

$$\text{Kemurnian DNA} = \frac{\lambda \text{ 260 nm}}{\lambda \text{ 280 nm}}$$

Konsentrasi DNA Tanaman Transgenik

$$\text{Konsentrasi DNA} = \lambda \text{ 260 nm} \times 50 \times \text{Faktor Pengenceran} \left[ \frac{700}{2} \right]$$

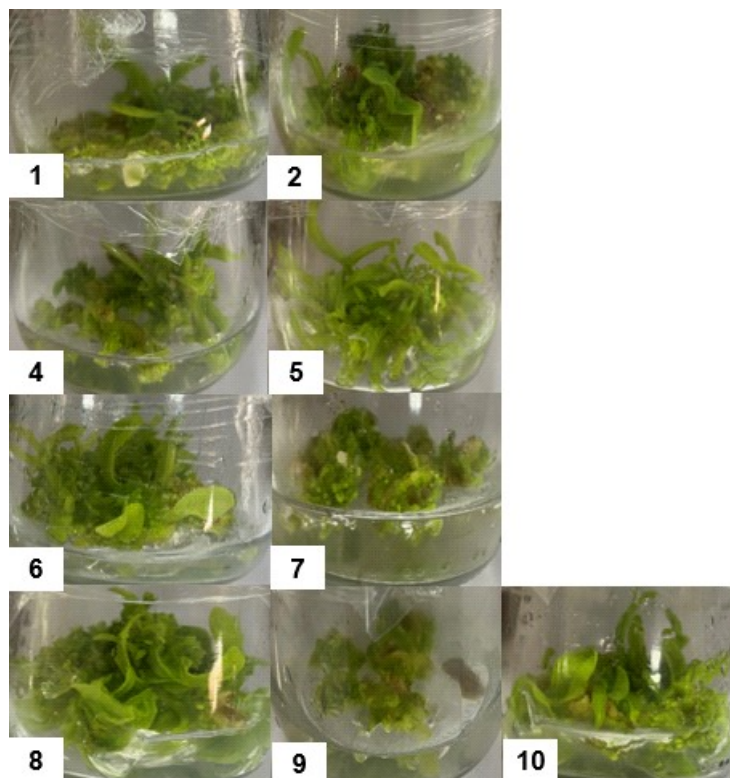
Hasil isolasi DNA dilakukan PCR dengan primer aktin untuk mengetahui kemurnian DNA dan SOD untuk amplifikasinya. Konsentrasi DNA diencerkan dengan perbandingan DNA:ddH<sub>2</sub>O sesuai konsentrasi yang diperoleh. Reaksi PCR aktin dengan komposisi ddH<sub>2</sub>O 3,5 µl, master *mix* 5 µl, primer act-F 0.25 µl, primer act-R 0.25 µl, DNA sampel 100 ng 1 µl. Reaksi PCR SOD dengan ddH<sub>2</sub>O 3,5 µl, master *mix* 5 µl, primer SODF 0.25 µl, primer SODR 0.25 µl, DNA sampel 100 ng 1 µl. Semua campuran dilakukan dengan termosiklus pra-PCR suhu 95°C selama 5 menit, denaturasi suhu 95°C selama 1 menit, *annealing* 55°C selama 45 detik, pemanjangan 72°C selama 1 menit, pasca-PCR 72°C selama 5 menit, dan *cooling* 25°C selama 10 menit. Setelah termosiklus, DNA dimasukkan ke dalam gel agarosa 1% dan dijalankan elektroforesis 100 volt selama 28 menit. Kemudian, gel direndam dalam EtBr selama 15 menit dan diamati pita DNA melalui visualisasi dengan UV transiluminator.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil transformasi tanaman tembakau menunjukkan terbentuk kalus dan tunas pada semua ulangan, kecuali ulangan ke-3 (Figure 1). Hasil transformasi tanaman tembakau pada ulangan ke-3 terkontaminasi oleh kapang seluruh kalus, sehingga tidak ditampilkan. Kontaminasi oleh kapang dapat menurunkan keberhasilan transformasi tanaman (Permadi *et al.*, 2023). Jumlah kalus dan tunas pada ulangan ke-4,5,6,7,8,9, dan 10 tumbuh. Sedangkan ulangan ke-1,2, dan 6 hanya tumbuh kalus baik kalus pada umumnya maupun kalus resisten. Tetapi, ulangan ke-3 tidak tumbuh keduanya. Karena terkontaminasi oleh kapang. Sehingga, mengganggu pertumbuhan kalus dan tunas pada ulangan ke-3 (Table 1).

Jumlah transformasi dan regenerasi pada ulangan ke-1,2,4,5,6,7,8,9, dan 10 memiliki nilai transformasi tanaman antara 1-1,50. Nilai transformasi tanaman tembakau yang paling tinggi ditunjukkan pada ulangan ke-9. Sedangkan ulangan ke-4,5,7,8,9 dan 10 memiliki nilai regenerasi antara 1-2. Nilai regenerasi yang paling tinggi ditunjukkan

ulangan ke-4 dan ke-7 (Table 2). Nilai transformasi diperoleh berdasarkan dari kalus yang tumbuh dan kalus resistensi terhadap higromisin sebagai media seleksinya. Nilai regenerasi berdasarkan dari tunas yang terbentuk dengan kalus yang resistensi higromisin.



Gambar 1. Kultur jaringan pada transformasi tanaman tembakau transgenik. 1-10: ulangan

Tabel 1. Jumlah kalus dan tunas yang tumbuh pada tanaman tembakau transgenik

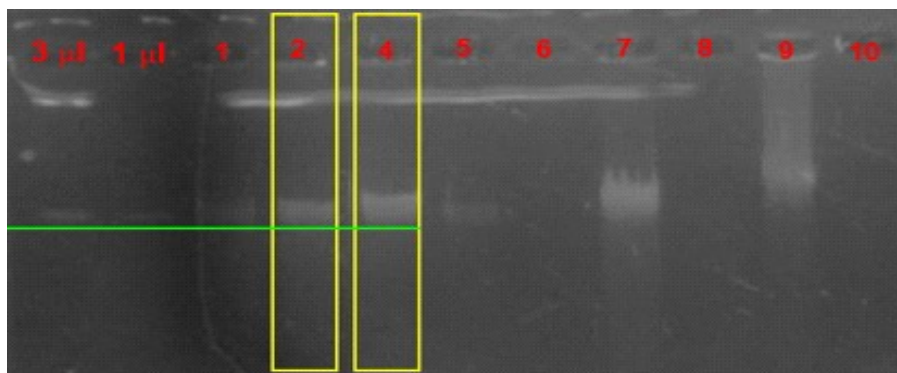
| Tembakau       | Ulangan |    |   |   |   |   |   |   |    |
|----------------|---------|----|---|---|---|---|---|---|----|
|                | 1       | 2  | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| Kalus          | 10      | 12 | 6 | 4 | 7 | 4 | 5 | 9 | 6  |
| Kalus resisten | 10      | 11 | 6 | 4 | 7 | 4 | 4 | 6 | 6  |
| Tunas          | 0       | 0  | 3 | 3 | 0 | 2 | 4 | 6 | 4  |

Tabel 2. Transformasi dan regenerasi pada tanaman tembakau transgenik

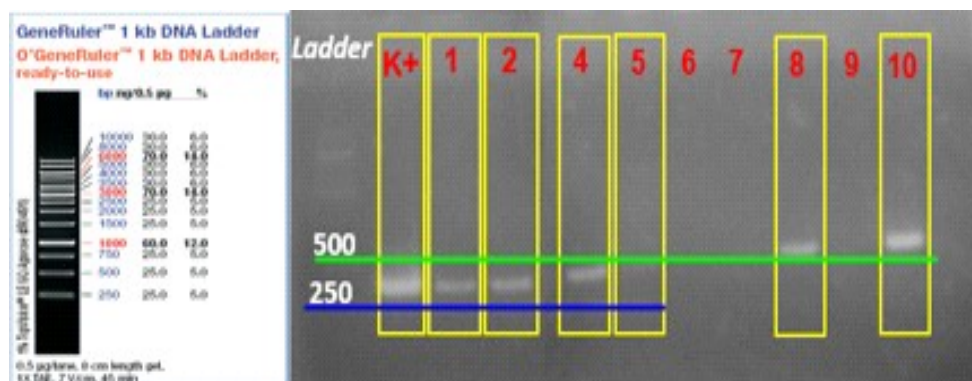
| Tembakau     | Ulangan |      |   |      |   |   |      |      |      |
|--------------|---------|------|---|------|---|---|------|------|------|
|              | 1       | 2    | 4 | 5    | 6 | 7 | 8    | 9    | 10   |
| Transformasi | 1       | 1.09 | 1 | 1    | 1 | 1 | 1.25 | 1.50 | 1    |
| Regenerasi   | 0       | 0    | 2 | 1.30 | 0 | 2 | 1    | 1    | 1.50 |

Hasil isolasi DNA tanaman tembakau transgenik berdasarkan elektroforesis menunjukkan muncul pita pada ulangan ke-2 dan ke-4 yang ukurannya setara dengan DNA marker Lambda 3  $\mu$ l. Namun, Pita pada ulangan ke-9 terbentuk pita tidak setara ukurannya dengan DNA marker Lambda 3  $\mu$ l dan 1  $\mu$ l. Ini teramati setelah direndam dengan EtBr dan divisualisasi dengan UV transiluminator. Sedangkan ulangan ke-1,5,6,7,8, dan 10 tidak muncul pita dalam visualisasi elektroforesis. Ketidakhadiran pita pada ulangan diakibatkan oleh debris dan degradasi (Figure 2). Kemunculan pita dalam visualisasi elektroforesis menunjukkan keberhasilan dalam isolasi DNA tanaman tembakau transgenik. Walaupun hasil isolasi DNA tanaman tembakau transgenik pada beberapa ulangan tidak muncul. Tetapi, hasil PCR DNA dapat mengkonfirmasi introduksi gen SOD menjadi lebih jelas karena PCR DNA mengamplifikasi gen SOD dari tanaman tembakau transgenik.

Hasil PCR gen SOD pada DNA tanaman tembakau transgenik menunjukkan teramplifikasi dengan pita muncul pada kontrol positif (DNA tanaman tanpa primer), ulangan ke-1, 2, 4, 5, 8, dan 10. Sedangkan ulangan ke-6, 7, dan 9 tidak muncul. Kontrol positif, ulangan ke-1, 2, dan 4 memiliki pita berukuran sekitar 250 bp. Ulangan ke-8 dan 10 memiliki pita berukuran sekitar 500 bp. Ulangan ke-5 memiliki pita tipis dan sulit terlihat (Figure 3a). Tidak terjadi amplifikasi kemungkinan disebabkan oleh sebagian sekuen primer yang tidak menempel dengan baik (Anggisti *et al.* 2018).



Gambar 2. Elektroforesis DNA tanaman tembakau transgenik. Isolasi DNA dari daun (ulangan ke-1,5,7,9) dan kalus (ulangan ke-2,4,6,8,10)



Gambar 3. Hasil PCR DNA. K+: kontrol positif (DNA tanaman tanpa primer), 1-10: ulangan, isolasi DNA dari daun (ulangan ke-1,3,5,7,9), kalus (ulangan ke-2,4,6,8,10)

Hasil spektrofotometer UV-VIS menunjukkan kemurnian DNA tanaman tembakau transgenik pada ulangan ke-2 lebih besar daripada lainnya. Tetapi, tidak mendekati tingkat kemurnian antara 1,8-2,0. Hal ini mungkin dikarenakan masih terdapat debris atau pelarut lainnya yang terikut dan tidak tercuci habis setelah diberi EtOH. Rentang kemurnian DNA plasmid yang baik diketahui antara 1,8-2,0. Konsentrasi DNA tanaman tembakau transgenik menunjukkan konsentrasi pada ulangan ke-1 yang paling tinggi (Table 3).

Tabel 3. Spektrofotometer UV-VIS DNA tanaman tembakau transgenik

| Ulangan ke- | $\lambda$ 260 nm | $\lambda$ 280 nm | Kemurnian DNA | Konsentrasi DNA |
|-------------|------------------|------------------|---------------|-----------------|
| 1           | 0.617            | 0.510            | 1.21          | 7198            |
| 2           | 0.156            | 0.113            | 1.38          | 1820            |
| 4           | 0.159            | 0.128            | 1.24          | 1855            |
| 5           | 0.151            | 0.120            | 1.25          | 1762            |
| 6           | 0.094            | 0.086            | 1.09          | 1097            |
| 8           | 0.139            | 0.128            | 1.09          | 1622            |
| 9           | 0.368            | 0.269            | 1.37          | 4293            |
| 10          | 0.185            | 0.154            | 1.20          | 2158            |

Faktor keberhasilan transformasi tanaman dari kultur jaringan dan gen mencakup transfer DNA ke dalam sel dan regenerasi tanaman transgenik, yang sangat penting untuk transformasi genetik. Metode seperti mediasi *Agrobacterium*, biolistik, dan polietilen glikol digunakan untuk pengiriman DNA ke dalam eksplan yang sesuai dari spesies tanaman (Bekalu *et al.*, 2023). Persyaratan hormonal untuk induksi kalus serta pembentukan tunas dan akar dari embrio belum matang dan matang bervariasi antar spesies dan genotipe. Sehingga, mempengaruhi keberhasilan regenerasi. Selain itu, optimalisasi kultur jaringan sangat penting untuk keberhasilan gen terekspresi pada spesies dan genotipe tanaman target (Hesami *et al.*, 2021; Miguel *et al.*, 2020). Penggunaan komponen modular untuk pengiriman molekul biologis, promotor sintetik, dan promotor yang diinduksi dapat meningkatkan efisiensi rekayasa metabolisme multigen pada tanaman. Selain itu, juga menyederhanakan metode transformasi tanaman dan meminimalkan kultur jaringan melalui manipulasi pengembangan sel dan jaringan untuk meningkatkan keberhasilan proses transformasi tanaman (Altpeter *et al.*, 2016; Ren *et al.*, 2022).

Faktor keberhasilan transformasi tanaman juga dapat diperoleh karena bahan yang digunakan sesuai protokol introduksi *Agrobacterium* dalam kultur jaringan, seperti media *Agrobacterium tumefaciens* yang membawa gen target, media kultivasi (COT, CIMT, dan CIMTH) berisi media MS, vitamin, BAP, IAA, cefotaksim, sukrosa, agar gelrit, higromisin, dan asetosiringon. Hasil transformasi tanaman diketahui melalui isolasi DNA dengan bahan nitrogen cair, *buffer* CTAB, fenol: kloroform: isoamilalkohol (P:C:I), kloroform: isoamilalkohol (C:I), etanol, dan RNase. Jones *et al.* (2023) menjelaskan bahwa nitrogen cair digunakan untuk membantu menghancurkan zat keras jaringan tumbuhan dan hewan menjadi konsistensi seperti debu. Proses ini mempermudah diperoleh DNA dari sel dan ekstraksi lebih efisien. Selain itu, nitrogen cair dapat menonaktifkan DNAase.

Media MS, sukrosa, vitamin, dan agar gelrit diketahui untuk mendukung pertumbuhan dan perkembangan kultur tanaman. Medium Murashige dan Skoog merupakan media yang banyak digunakan untuk kultur jaringan tanaman dan kultur protoplas. Media kaya nutrisi yang menyediakan nutrisi makro dan mikronutrien penting untuk pertumbuhan tanaman. Sukrosa adalah sumber karbon yang umum digunakan dalam media tanaman dan menyediakan energi untuk pertumbuhan tanaman. Vitamin termasuk dalam media MS sangat penting untuk pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Agar gelrite adalah bahan pemat yang digunakan untuk menghasilkan konsistensi seperti gel. Gel membantu menjaga struktur dan mendukung pertumbuhan jaringan tanaman (Reed dan Bargmann, 2021).

Yuan *et al.* (2023) menjelaskan bahwa higromisin digunakan sebagai penanda seleksi tanaman transgenik. Norkunas *et al.* (2018) menjelaskan bahwa asetosiringon diketahui dalam transformasi tanaman tembakau dapat menginduksi ekspresi gen virulensi di *Agrobacterium* dan meningkatkan frekuensi transformasinya. Senyawa fenolik ini diproduksi secara alami oleh sel tanaman yang terluka dan diketahui menginduksi ekspresi HspL, protein kejutan panas kecil yang penting untuk akumulasi protein VirB, yang berperan dalam mendorong transfer DNA yang dimediasi virB/D4. Reagen isolasi DNA berupa CTAB digunakan untuk membantu menghancurkan dinding dan membran sel tanaman dengan mengganggu strukturnya. Karena sel tanaman memiliki dinding sel yang kaku dan perlu dipecah untuk melepaskan isi seluler, termasuk DNAny (Boldura *et al.*, 2020). CTAB diketahui juga dapat mendenaturasi dan melarutkan protein (Kumar *et al.*, 2014). Penghapusan debris sel dengan mengendapkan komponen sel, protein, polisakarida, dan kontaminan lainnya. Sehingga, tertinggal DNA dalam larutan yang dikenal sebagai supernatan (Aboul-Maaty dan Oraby, 2019).

Komposisi fenol: kloroform: isoamilalkohol (P:C:I) berupa campuran yang berperan penting dalam memisahkan DNA dari komponen seluler lainnya, seperti protein dan lipid. Fenol merupakan pelarut non polar yang lebih padat dibandingkan air, sedangkan kloroform merupakan pelarut polar. Isoamilalkohol membantu mengurangi busa di antara interfase dan mencegah emulsifikasi larutan. Supernatan (fase atas) mengandung DNA, sedangkan fase organik (bagian bawah) mengandung lipid dan pengotor lainnya. Pemisahan ini didasarkan pada kelarutan biomolekul. DNA menjadi molekul polar yang berpartisipasi ke dalam supernatan atau fasa air (Boldura *et al.*, 2020). Kloroform: isoamilalkohol (C:I) untuk meningkatkan pemurnian DNA dan membantu mengendapkan sisa debris (Shen, 2023). Etanol sebagai reagen pencuci untuk menghilangkan sisa reagen atau debris pada pelet yang berisi DNA (Oda *et al.*, 2016). RNase sebagai enzim pendegradasi RNA untuk meningkatkan kualitas dan kuantitas hasil isolasi DNA (Rodriguez *et al.*, 2016).

Kultur jaringan merupakan langkah penting dalam produksi tanaman transgenik karena memungkinkan pengenalan DNA asing ke dalam sel tanaman secara efisien dan terkendali. Proses ini diperlukan untuk menciptakan organisme hasil rekayasa genetika (GMO) yang memiliki sifat-sifat yang diinginkan yang tidak ditemukan pada organisme alamnya. Penggunaan kultur jaringan memungkinkan manipulasi gen tanaman secara tepat, yang penting untuk pengembangan tanaman transgenik dengan sifat resistensi dan agronomi tertentu (Loyola-Vargas dan Ochoa-Alejo, 2018; Kumar dan Srivastava, 2016). Dalam kultur jaringan untuk menumbuhkan

individu tanaman atau perbanyak tanaman diperlukan bagian organ tanaman. Bagian organ tanaman, seperti daun, batang, dan akar diambil dari alam dan ditumbuhkan dalam media. Bagian organ yang ditumbuhkan akan membentuk kalus sebagai titik awal pembentukan organ tanaman lainnya, seperti daun, batang, dan akar. Kalus merupakan massa sel yang tidak teratur, tidak terdiferensiasi, parenkimatous, dan totipoten. Kalus memiliki kemampuan untuk membelah dan berdiferensiasi menjadi jaringan dan organ organisme. Kalus terbentuk dalam media kultur karena pembelahan mitosis aktif dari sel-sel eksplan (bagian tanaman, jaringan, atau sel yang dikultur). Kalus juga diketahui dapat membelah lebih lanjut membentuk organ tanaman (Fehér, 2023; Ikeuchi *et al.*, 2013).

Metode rendam daun dan aduk (metode infiltrasi daun) dalam transformasi tanaman adalah teknik yang digunakan untuk memfasilitasi penetrasi gen target ke dalam sel daun tanaman. Sehingga, meningkatkan efektivitas protokol transformasi tanaman. Metode ini sangat berguna untuk protokol transformasi tanaman. Teknik ini melibatkan zat cair masuk ke dalam permukaan daun, yang kemudian menyusup ke ruang antar sel melalui stomata. Sehingga, memungkinkan gen yang dibawa oleh *Agrobacterium* dapat terekspresi di dalam sel daun. Metode ini banyak digunakan dalam rekayasa genetik baik untuk tujuan penelitian maupun penerapan, termasuk studi interaksi tanaman-mikroorganisme dan pengenalan modifikasi genetik pada daun tanaman dewasa (Chincinska, 2021). Selain metode infiltrasi daun, ada metode biolistik, transformasi protoplas, elektroporasi sel dan jaringan, mikroinjeksi, jalur tabung serbuk sari, transformasi yang dimediasi silikon karbida, dan transformasi yang dimediasi liposom (Rakoczy-Trojanowska, 2002; Su *et al.*, 2023).

Metode biolistik melibatkan penggunaan partikel berkecepatan tinggi, biasanya emas atau tungsten. Partikel dilapisi dengan DNA untuk mengirim materi genetik ke dalam sel tanaman. Proses pengiriman DNA ini tidak bergantung pada agen biologis, seperti bakteri, sehingga menjadikannya metode yang multifungsi dan efektif untuk mentransformasi berbagai spesies tanaman seperti monokotil. Pendekatan biolistik telah berhasil diterapkan pada berbagai spesies tanaman, termasuk tanaman penting secara agronomi seperti padi, gandum, dan kedelai, serta dalam kultur suspensi sel, bagian daun, dan embrio somatik selentangan, tanaman air seperti *Egeria dens*, dan bunga *Antirrhinum majus* (Kikkert *et al.*, 2005; Lacroix dan Citovsky, 2020). Transformasi protoplas diketahui dimana dinding sel tumbuhan dihilangkan dan memudahkan DNA asing secara langsung masuk. Proses ini digunakan untuk memasukkan gen ke dalam tanaman untuk berbagai tujuan, seperti rekayasa genetika, pengeditan gen, dan analisis ekspresi gen (Reed dan Bargmann, 2021).

Elektroporasi sel dan jaringan menggunakan penerapan listrik bertegangan tinggi untuk membuat pori-pori sementara di membran sel, sehingga memudahkan DNA memasuki sel. Teknik ini sangat berguna untuk transformasi tanaman karena dapat secara efisien mengirimkan DNA ke dalam sel tanaman (Darmawan *et al.*, 2020). Mikroinjeksi merupakan teknik yang digunakan dalam transformasi tanaman untuk memasukkan DNA asing ke dalam sel tanaman. Ini melibatkan penyuntikan DNA ke dalam inti tanaman tunggal atau sitoplasma menggunakan pipet injeksi mikrokapiler kaca. Metode ini sangat berguna untuk memasukkan gen ke dalam sel tumbuhan yang sulit diubah menggunakan metode lain, seperti tanaman dengan dinding sel tebal (Su *et al.*, 2023).

Jalur tabung serbuk sari merupakan transformasi tanaman yang melibatkan pengiriman langsung DNA asing ke dalam sel tumbuhan melalui jalur tabung serbuk sari. Metode ini telah berhasil digunakan pada beberapa tanaman, termasuk kedelai dan kapas, untuk memasukkan gen ke dalam sel tanaman (Ali *et al.*, 2015; Showalter *et al.*, 2009). Transformasi mediasi silikon karbida menggunakan kristal tunggal mineral organik silika dengan bentuk memanjang dan ketahanan yang tinggi terhadap kemampuan ekspansi. Kemampuan ini memudahkan DNA asing masuk ke dalam sel tanaman (Gerhardt, 2011). Transformasi mediasi liposom dengan menggunakan liposom berupa vesikel berbentuk bola yang terdiri dari satu atau lebih membran bilayer fosfolipid. Media ini berfungsi untuk mengirim DNA ke dalam sel tanaman (Sun dan Lu, 2023).

Daun dipotong berbentuk kotak dalam transformasi tanaman sebelum kultur jaringan untuk memudahkan proses transformasi genetik dan regenerasi tanaman selanjutnya. Prosesnya melibatkan beberapa langkah, antara lain penyiapan bahan tanaman, transformasi sel tanaman dengan vektor yang membawa gen yang diinginkan, dan regenerasi sel yang diubah menjadi tanaman utuh. Memotong daun menjadi kotak kecil, biasanya berukuran sekitar 1-1,5 cm. Sehingga, dapat mentransformasi sel tumbuhan dengan vektor secara efisien. Karena ukuran eksplan (bahan tanaman yang digunakan untuk transformasi) yang kecil dapat mudah ditangani dan diproses di laboratorium, serta transformasi dapat terjadi lebih cepat dan efisien. Selain itu, memotong daun menjadi kotak membantu memastikan bahwa eksplan memiliki ukuran dan bentuk yang seragam. Penting untuk hasil yang konsisten dalam proses transformasi. Ini juga memudahkan eksplan untuk ditempatkan pada media transformasi kaya nutrisi yang mendukung pertumbuhan sel tanaman (Wen *et al.*, 2019; Gelvin, 2003; Sainger *et al.*, 2015).

Transformasi tanaman diketahui dapat terjadi kegagalan yang diakibatkan oleh pemilihan kualitas eksplan yang kurang tepat, kondisi kultur jaringan yang tidak memadai, konstruksi genetik yang salah, transfer DNA yang tidak

optimal, kemampuan regenerasi yang terbatas, dan kontaminasi. Pemilihan kulitas eskplan yang kurang tepat karena salah dalam pemilihan jaringan yang ditumbuhkan. Jaringan yang ditumbuhkan harus muda, aktif membelah, dan tidak rusak untuk menghasilkan transformasi yang baik (Espinosa-Leal *et al.*, 2018). Kondisi kultur jaringan mengacu ke komposisi media, pH, suhu, dan kondisi lingkungan. Jika kondisi ini tidak memadai, maka akan sulit untuk menghasilkan tanaman transgenik (Leva dan Rinaldi, 2012). Konstruksi genetik menjadi faktor penting dalam tanaman transgenik. Karena konstruksi genetik, seperti pemilihan promotor, gen penanda, vektor dapat berdampak pada efisiensi transformasi (Basso *et al.*, 2020). Transfer DNA yang tidak optimal dapat menurunkan efisiensi transformasi tanaman (Lee dan Wang, 2023). Kemampuan regenerasi yang terbatas dan kontaminasi pada kultur dapat mempengaruhi pertumbuhan sel tanaman yang telah ditransformasi (Bidabadi dan Jain, 2020).

## KESIMPULAN

Introduksi gen SOD ke tanaman tembakau dengan metode infiltrasi dan *Agrobacterium* dapat dilakukan melalui eksplan dalam kultur jaringan. Eksplan berupa daun tanaman tembakau yang sudah dipotong dengan ukuran seragam. Keberhasilan kultur jaringan tanaman tembakau dapat diamati pada kalus, kalus resisten, dan tunas yang tumbuh. Keberhasilan ini juga didukung oleh media kultur jaringan berupa COT, CIMT, dan CIMTH. Karena media tersebut merupakan penunjang pertumbuhan tanaman selama kultur. Keberhasilan introduksi dan transformasi tanaman dapat diamati melalui visualisasi elektroforesis dan muncul pita dari isolasi DNA transgenik putatif. Kemurnian dan konsentrasi dari hasil isolasi DNA transgenik putatif diperoleh dari spektrofotometer UV-VIS.

## REFERENSI

- Aboul-Maaty N.AF, Oraby HAS. (2019). Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method. *Bull Natl Res Cent.* 43:25. doi: 10.1186/s42269-019-0066-1.
- Agrawal S, Rami E. (2022). A Review: *Agrobacterium*-mediated gene transformation to increase plant productivity. *The Journal of Phytopharmacology.* 11(2):111-117. doi: 10.31254/phyto.2022.11211.
- Ali A, Bang SW, Chung SM, Staub JE. (2015). Plant transformation via pollen tube-mediated gene transfer. *Plant Mol Biol Rep.* 33:742–747. doi: 10.1007/s11105-014-0839-5.
- Altpeter F, Nathan MS, Laura EB, Ann EB, Thomas PB, Vitaly C, Liza JC, Stanton BG, David PJ, Albert PK, Peggy GL, June IM, Martha LOC, David MT, Joyce VE, Daniel FV, Virginia W, Kan W, Zhanyuan JZ, Stewart CN. (2016). Advancing crop transformation in the era of genome editing. *The Plant Cell.* 28(7):1510–1520. doi: 10.1105/tpc.16.00196.
- Anggisti L, Dewi IR, Herman. (2018). Optimasi suhu annealing untuk amplifikasi gen aktin pada pandan (*Pandanus* sp). *Jurnal Dinamika Pertanian.* 34(2):95-100.
- Basso MF, Arraes FBM, Grossi-de-Sa M, Moreira VJV, Alves-Ferreira M, Grossi-de-Sa MF. (2020). Insights into genetic and molecular elements for transgenic crop development. *Front Plant Sci.* 11:509. doi: 10.3389/fpls.2020.00509.
- Bekalu ZE, Panting M, Bæksted Holme I, Brinch-Pedersen H. (2023). Opportunities and challenges of in vitro tissue culture systems in the era of crop genome editing. *Int J Mol Sci.* 24(15):11920. doi: 10.3390/ijms241511920.
- Bidabadi SS, Jain SM. (2020). Cellular, molecular, and physiological aspects of in vitro plant regeneration. *Plants (Basel).* 9(6):702. doi: 10.3390/plants9060702.
- Boldura OM, Balta C, Awwad, NS. (2020). *Biochemical analysis tools - methods for bio-molecules studies.* London, United Kingdom: IntechOpen.
- Chincinska, I.A. (2021). Leaf infiltration in plant science: old method, new possibilities. *Plant Methods.* 17:83. doi: 10.1186/s13007-021-00782-x.
- Çiftçi YO. (2012). *Transgenic plants - advances and limitations.* United Kingdom: IntechOpen.
- Darmawan C, Wiendi NMA, Utomo C, Liwang T. (2020). Electroporation-mediated genetic transformation of oil palm (*Elaeis guineensis*). *BIODIVERSITAS.* 21(8):3720-3726. doi: 10.13057/biodiv/d210839.
- Dormatey R, Sun C, Ali K, Fiaz S, Xu D, Calderón-Urrea A, Bi Z, Zhang J, Bai J. (2021). ptxD/Phi as alternative selectable marker system for genetic transformation for bio-safety concerns: a review. *PeerJ.* 9:e11809. doi: 10.7717/peerj.11809.
- Espinosa-Leal CA, Puente-Garza CA, García-Lara S. (2018). In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta.* 248(1):1-18. doi: 10.1007/s00425-018-2910-1.

- Fehér A. (2023). A common molecular signature indicates the pre-meristematic state of plant calli. *Int J Mol Sci.* 24(17):13122. doi: 10.3390/ijms241713122.
- Gelvin SB. (2003). Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiol Mol Biol Rev.* 67(1):16-37. doi: 10.1128/MMBR.67.1.16-37.2003.
- Gerhardt R. (2011). *Properties and applications of silicon carbide*. United Kingdom: IntechOpen.
- Głowacka K, Kromdijk J, Leonelli L, Niyogi KK, Clemente TE, Long SP. (2016). An evaluation of new and established methods to determine T-DNA copy number and homozygosity in transgenic plants. *Plant Cell Environ.* 39(4):908-17. doi: 10.1111/pce.12693.
- Godbey WT. (2021). *Biotechnology and its applications using cells to change the world*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier.
- Hasnain A, Naqvi SAH, Ayesha SI, Khalid F, Ellahi M, Iqbal S, Hassan MZ, Abbas A, Adamski R, Markowska D, Baazeem A, Mustafa G, Moustafa M, Hasan ME, Abdelhamid MMA. (2022). Plants in vitro propagation with its applications in food, pharmaceuticals and cosmetic industries; current scenario and future approaches. *Front Plant Sci.* 13:1009395. doi: 10.3389/fpls.2022.1009395.
- Hesami M, Baiton A, Alizadeh M, Pepe M, Torkamaneh D, Jones AMP. (2021). Advances and Perspectives in Tissue Culture and Genetic Engineering of Cannabis. *International Journal of Molecular Sciences.* 22(11):5671. doi: 10.3390/ijms22115671.
- Hwang HH, Yu M, Lai EM. (2017). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: biology and applications. *Arabidopsis Book.* 15:e0186. doi: 10.1199/tab.0186.
- Ikeuchi M, Sugimoto K, Iwase A. (2013). Plant callus: mechanisms of induction and repression. *Plant Cell.* 25(9):3159-3173. doi: 10.1105/tpc.113.116053.
- Jones MM, Nagalingum NS, Handley VM. (2023). Testing protocols to optimize DNA extraction from tough leaf tissue: A case study in *Encephalartos*. *Appl Plant Sci.* 11(3):e11525. doi: 10.1002/aps3.11525.
- Kaur M, Manchanda P, Kalia A, Ahmed FK, Nepovimova E, Kuca K, Abd-Elsalam KA. (2021). Agroinfiltration mediated scalable transient gene expression in genome edited crop plants. *Int J Mol Sci.* 22(19):10882. doi: 10.3390/ijms221910882.
- Kikkert JR, Vidal JR, Reisch BI. (2005). Stable transformation of plant cells by particle bombardment/biolistics. *Methods Mol Biol.* 286:61-78. doi: 10.1385/1-59259-827-7:061.
- Komari T, Takakura Y, Ueki J, Kato N, Ishida Y, Hiei Y. (2006). Binary vectors and super-binary vectors. *Methods Mol Biol.* 343:15-41. doi: 10.1385/1-59745-130-4:15.
- Kowalczyk T, Merecz-Sadowska A, Picot L, Brčić Karačonji I, Wieczfinska J, Śliwiński T, Sitarek P. (2022). Genetic manipulation and bioreactor culture of plants as a tool for industry and its applications. *Molecules.* 27(3):795. doi: 10.3390/molecules27030795.
- Kumar MS, Kaur G, Sandhu AK. (2014). Genomic DNA isolation from fungi, algae, plant, bacteria and human blood using CTAB. *IJSR.* 3(9):617-618.
- Kumar P, Srivastava DK. (2016). Biotechnological applications in in vitro plant regeneration studies of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. italica), an important vegetable crop. *Biotechnol Lett.* 38(4):561-571. doi: 10.1007/s10529-015-2031-x.
- Lacroix B, Citovsky V. (2020). Biolistic approach for transient gene expression studies in plants. *Methods Mol Biol.* 2124:125-139. doi: 10.1007/978-1-0716-0356-7\_6.
- Lee K, Wang K. (2023). Strategies for genotype-flexible plant transformation. *Current Opinion in Biotechnology.* 79:102848. doi: 10.1016/j.copbio.2022.102848.
- Leva A, Rinaldi L. (2012). *Recent advances in plant in vitro culture*. United Kingdom: IntechOpen.
- Li Y, Yuan Y, Hu Z, Liu S, Zhang X. (2024). Genetic transformation of forest trees and its research advances in stress tolerance. *Forests.* 15(3):441. doi: 10.3390/f15030441.
- Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N. (2018). An PENDAHULUAN to plant tissue culture: advances and perspectives. *Methods Mol Biol.* 1815:3-13. doi: 10.1007/978-1-4939-8594-4\_1.
- Miguel, S., Michel, C., Biteau, F. Hehn A, Bourgaud F. (2020). In vitro plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of a carnivorous plant, *Nepenthes mirabilis*. *Sci Rep.* 10:17482. doi: 10.1038/s41598-020-74108-7.
- Murthy HN, Joseph KS, Paek KY, Park SY. (2023). Bioreactor systems for micropropagation of plants: present scenario and future prospects. *Front Plant Sci.* 14:1159588. doi: 10.3389/fpls.2023.1159588.
- Nakano M, Otani M. (2020). Plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation systems in liliaceous ornamental plants. *Plant Biotechnol (Tokyo).* 37(2):129-140. doi: 10.5511/plantbiotechnology.20.0114a.

- Nora LC, Westmann CA, Martins-Santana L, Alves LF, Monteiro LMO, Guazzaroni ME, Silva-Rocha R. (2019). The art of vector engineering: towards the construction of next-generation genetic tools. *Microb Biotechnol*. 12(1):125-147. doi: 10.1111/1751-7915.13318.
- Norkunas K, Harding R, Dale J, Dugdale B. (2018). Improving agroinfiltration-based transient gene expression in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Methods* 14:71. doi: 10.1186/s13007-018-0343-2.
- Oda Y, Sadakane K, Yoshikawa Y, Imanaka T, Takiguchi K, Hayashi M, Kenmotsu T, Yoshikawa K. (2016). Highly concentrated ethanol solutions: good solvents for DNA as revealed by single-molecule observation. *Chemphyschem*. 17(4):471-473. doi: 10.1002/cphc.201500988.
- Pathi KM, Sprink T. (2023). From Petri Dish to Field: Plant Tissue Culture and Genetic Engineering of Oats for Improved Agricultural Outcomes. *Plants*. 12(21):3782. doi: 10.3390/plants12213782.
- Permadi N, Nurzaman M, Alhasnawi AN, Doni F, Julacha E. (2023). Managing Lethal Browning and Microbial Contamination in *Musa* spp. Tissue Culture: Synthesis and Perspectives. *Horticulturae*. 9(4):453. doi: 10.3390/horticulturae9040453.
- Putri AI, Kartikawati NK, Nirsatmanto A, Sunarti S, Haryjanto L, Herawan T, Santosa PB, Wahyuningtyas RS, Lestari F, Rimbawanto A. (2023). Tissue culture of gerunggang (*Cratoxylum arborescens* (Vahl) Blume): multipurpose native species of Indonesian peatland. *Forest Science and Technology*. 19(3):171–178. doi: 10.1080/21580103.2023.2220010.
- Rakoczy-Trojanowska M. (2002). Alternative methods of plant transformation--a short review. *Cell Mol Biol Lett*. 7(3):849-858.
- Reed KM, Bargmann BOR. (2021). Protoplast regeneration and its use in new plant breeding technologies. *Front Genome Ed*. 3:734951. doi: 10.3389/fgeed.2021.734951.
- Ren H, Xu Y, Zhao X, Zhang Y, Hussain J, Cui F, Qi G and Liu S. (2022). Optimization of tissue culturing and genetic transformation protocol for *Casuarina equisetifolia*. *Front. Plant Sci*. 12:784566. doi: 10.3389/fpls.2021.784566.
- Rodriguez BV, Malczewskij ET, Cabiya JM, Lewis LK, Maeder C. (2016). Identification of RNase-resistant RNAs in *Saccharomyces cerevisiae* extracts: Separation from chromosomal DNA by selective precipitation. *Anal Biochem*. 492:69-75. doi: 10.1016/j.ab.2015.09.017.
- Sainger M, Chaudhary D, Dahiya S, Jaiwal R, Jaiwal PK. (2015). Development of an efficient in vitro plant regeneration system amenable to *Agrobacterium*-mediated transformation of a recalcitrant grain legume blackgram (*Vigna mungo* L. Hepper). *Physiol Mol Biol Plants*. 21(4):505-517. doi: 10.1007/s12298-015-0315-1.
- Shen CH. (2023). *Diagnostic molecular biology second edition*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier.
- Showalter AM, Heuberger S, Tabashnik BE, Carrière Y. (2009). A primer for using transgenic insecticidal cotton in developing countries. *Journal of Insect Science*. 9(22):1-39. doi: 10.1673/031.009.2201.
- Su W, Xu M, Radani Y, Yang L. (2023). Technological Development and Application of Plant Genetic Transformation. *Int J Mol Sci*. 24(13):10646. doi: 10.3390/ijms241310646.
- Sun D, Lu ZR. (2023). Structure and function of cationic and ionizable lipids for nucleic acid delivery. *Pharm Res*. 40(1):27-46. doi: 10.1007/s11095-022-03460-2.
- Thomson JG, Cook M, Guttman M, Smith J, Thilmony R. (2011). Novel sulI binary vectors enable an inexpensive foliar selection method in *Arabidopsis*. *BMC Res Notes*. 4:44. doi: 10.1186/1756-0500-4-44.
- Tremblay R, Wang D, Jevnikar AM, Ma S. (2010). Tobacco, a highly efficient green bioreactor for production of therapeutic proteins. *Biotechnol Adv*. 28(2):214-221. doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.11.008.
- Wen L, Chen Y, Schnabel E, Crook A, Frugoli J. (2019). Comparison of efficiency and time to regeneration of *Agrobacterium*-mediated transformation methods in *Medicago truncatula*. *Plant Methods*. 15:20. doi: 10.1186/s13007-019-0404-1.
- Yan T, Hou Q, Wei X, Qi Y, Pu A, Wu S, An X, Wan X. (2023). Promoting genotype-independent plant transformation by manipulating developmental regulatory genes and/or using nanoparticles. *Plant Cell Rep*. 42(9):1395-1417. doi: 10.1007/s00299-023-03037-2.
- Yuan G, Lu H, De K, Hassan MM, Liu Y, Islam MT, Muchero W, Tuskan GA, Yang X. (2023). Split selectable marker systems utilizing inteins facilitate gene stacking in plants. *Commun Biol*. 6:567. doi: 10.1038/s42003-023-04950-8.
- Zhang R, Meng Z, Abid MA, Zhao X. (2019). Novel pollen magnetofection system for transformation of cotton plant with magnetic nanoparticles as gene carriers. *Methods Mol Biol*. 1902:47-54. doi: 10.1007/978-1-4939-8952-2\_4.