

UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

BORANG PENGESAHAN STATUS TESIS@

JUDUL: Transformasi Labisia puruila var. puruila dengan menggunakan
Agrobacterium tumefaciens

IJAZAH: Sarjana Muda Sarus dengan Kepujian Program Bioteknologi

SAYA ANG PEY PEY
 (HURUF BESAR)

SESI PENGAJIAN: 2003 - 2006

mengaku membenarkan tesis (LPSM/Sarjana/Doktor Falsafah) ini disimpan di Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dengan syarat-syarat kegunaan seperti berikut:-

1. Tesis adalah hak milik Universiti Malaysia Sabah.
2. Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dibenarkan membuat salinan untuk tujuan pengajian sahaja.
3. Perpustakaan dibenarkan membuat salinan tesis ini sebagai bahan pertukaran antara institusi pengajian tinggi.
4. Sila tandakan (/)

SULIT

TERHAD

TIDAK TERHAD

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

(Mengandungi maklumat yang berdarjah keselamatan atau Kepentingan Malaysia seperti yang termaktub di dalam AKTA RAHSIA RASMI 1972)

(Mengandungi maklumat TERHAD yang telah ditentukan oleh organisasi/badan di mana penyelidikan dijalankan)

Disahkan Oleh

(TANDATANGAN PENULIS)

(TANDATANGAN PUSTAKAWAN)

Alamat Tetap: 10-4-15, Lintang Sungai Pinang, 10150, Georgetown, Pulau Pinang.

Dr. Jualang Azlan Gansau

Nama Penyelia

Tarikh: 24/4/06

Tarikh: _____

CATATAN:- *Potong yang tidak berkenaan.

**Jika tesis ini SULIT atau TERHAD, sila lampirkan surat daripada pihak berkuasa /organisasi berkenaan dengan menyatakan sekali sebab dan tempoh tesis ini perlu dikelaskan sebagai SULIT dan TERHAD.

@Tesis dimaksudkan sebagai tesis bagi Ijazah Doktor Falsafah dan Sarjana secara penyelidikan atau disertai bagi pengajian secara kerja kursus dan Laporan Projek Sarjana Muda (LPSM).



**TRANSFORMASI *Labisia pumila* var. *pumila*
DENGAN MENGGUNAKAN
*Agrobacterium tumefaciens***

ANG PEY PEY

**UNIVERSITI MALAYSIA SABAH
PERPUSTAKAAN
DISERTASI INI DIKEMUKAKAN UNTUK MEMENUHI
SEBAHAGIAN DARIPADA SYARAT MEMPEROLEHI IJAZAH
SARJANA MUDA SAINS DENGAN KEPUJIAN**

**PROGRAM BIOTEKNOLOGI
SEKOLAH SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH**

Mac 2006



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

PENGAKUAN

Saya akui karya ini adalah hasil kerja saya sendiri kecuali nukilan dan ringkasan yang setiap satunya telah dijelaskan sumbernya.

20 Mac 2006



ANG PEY PEY

HS2003-2812

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

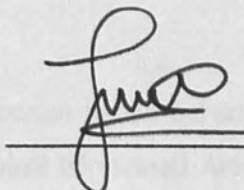
PENGESAHAN

DIPERAKUAN OLEH:

1. PENYELIA

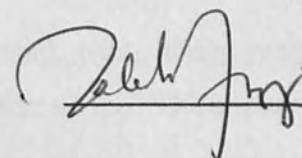
(DR. JUALANG AZLAN GANSAU)

Tandatangan



2. PEMERIKSA 1

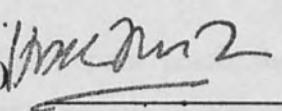
(DR. ZALEHA ABDUL AZIZ)



PERPUSTAKAAN
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

3. DEKAN

(SUPT/KS. PROF. MADYA DR. SHARIFF A.K. OMANG)



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

PENGHARGAAN

Terlebih dahulu, setinggi-tinggi penghargaan dan ribuan terima kasih yang tidak terhingga ingin saya ucapkan kepada Dr. Jualang Azlan Gansau selaku penyelia projek ini di atas segala nasihat, tunjuk ajar dan dorongan yang berguna semasa projek ini dijalankan bagi membolehkan saya menjayakannya.

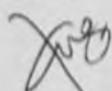
Dalam pada itu, bantuan nasihat dan tunjuk ajar serta pemberian bahan-bahan rujukan yang berguna yang diberikan oleh kak Ainul Mardziah binti Mohamed dan kak Hartini yang membekalkan sumber tumbuhan amat saya hargai.

Jutaan terima kasih diucapkan bagi keluarga tercinta, emak, ayah, abang yang banyak memberikan sokongan moral dan kewangan selama ini. Diharapkan pengorbanan kalian yang dilakukan menjadi kebanggaanmu.

Tidak dilupakan, ribuan terima kasih ingin saya ucapkan kepada pembantu makmal, Cik Rokiah Ibrahim atau penyelidik, sahabat-sahabat terutamanya Foong Wuen Ee dan semua yang terlibat sama ada secara langsung atau tidak dalam membantu saya menyiapkan projek penyelidikan.

Bantuan pensyarah lain Kakitangan Universiti Malaysia Sabah (UMS), para pascasiswazah juga amat dihargai dan akan dikenang. Kerjasama dan kelonggaran daripada pihak perpustakaan UMS dalam proses peminjaman buku-buku juga tidak akan dilupakan.

Yang benar,



ANG PEY PEY



ABSTRAK

Kajian ini melibatkan penggunaan strain *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 (pGPTV) yang membawa gen β -glucuronidase (GUS) dan kerintangan terhadap kanamisin untuk transformasi eksplan daun *Labisia pumila* var. *pumila*. Tempoh ko-kultivasi dan kepekatan asetosyringon yang berbeza dikaji. Eksplan *Labisia pumila* var. *pumila* dikulturkan pada media MS + 2.5mg/L NAA + 10mg/L BAP untuk tiga minggu. Selepas inokulasi selama 20 minit, eksplan telah diko-kultur pada media ko-kultivasi MS selama 1, 2, 3 dan 4 hari untuk mengkaji kesan tempoh ko-kultivasi terhadap frekuensi transformasi. Dengan memilih tempoh ko-kultivasi yang sesuai, eksplan telah diko-kultur dalam media ko-kultivasi yang mengandungi 100 μ M dan 200 μ M asetosyringon untuk mengkaji kesan kepekatan asetosyringon terhadap frekuensi transformasi. Selepas itu, Eksplan kemudian dikultur pada media regenerasi MS + 2.5mg/L NAA + 10mg/L BAP dengan 400mg/L *cefotaxime* selama satu minggu. Akhirnya, sebahagian eksplan akan diuji dengan ujian histokimia GUS untuk mengenalpasti eksplan yang menunjukkan aktiviti GUS. Daripada kajian ini, transformasi eksplan daun *Labisia pumila* var. *pumila* dengan menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* AGL1/pGPTV dapat menunjukkan pengekspresan *transient*. Tempoh ko-kultivasi selama tiga hari telah menunjukkan keputusan positif yang paling baik (44.4%). Penambahan 100 μ M asetosyringon telah meningkatkan kadar transformasi bagi *Labisia pumila* var. *pumila* (61.1%) dan keluasan permukaan eksplan yang berwarna biru. Transformasi ini juga boleh dilakukan tanpa penambahan asetosyringon.



**TRANSFORMASI OF *Labisia pumila* var. *pumila*
BY USING *Agrobacterium tumefaciens***

ABSTRACT

This research involved the use of strain *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 (pGPTV) which harbored genes for β -glucuronidase (GUS) and kanamycin resistant for leaf explants *Labisia pumila* var. *pumila* transformation. Influence of co-cultivation period and acetosyringone concentration on transformation frequency were tested. Explants *Labisia pumila* var. *pumila* were cultured on MS + 2.5mg/L NAA + 10mg/L BAP media for three weeks. After inoculation for 20 minutes, explants were co-cultured on MS co-cultivation media for 1, 2, 3 and 4 days respectively to study the effect of co-cultivation period on the efficiency of transformation. By choosing the suitable co-cultivation period, explants were co-cultured on MS co-cultivation media that contained 100 μ M and 200 μ M acetosyringone respectively to study the effect of acetosyringone to the frequency of transformation. Explants were then cultured on regeneration media MS + 2.5mg/L NAA + 10mg/L BAP with 400mg/L cefotaxime for one week. After that, the explants were tested with histochemical GUS assay to confirm the explants which showing the GUS activity. From this research, transformation of leaves explants *Labisia pumila* var. *pumila* by using *Agrobacterium tumefaciens* AGL1/pGPTV showed transient expression. Three days of co-cultivation showed better positive result (44.4%). The addition of 100 μ M acetosyringone increased the rate of transformation for *Labisia pumila* var. *pumila* (61.1%) and blue spot on the explants. This transformation could still be occurred even without the presence of acetosyringone.



KANDUNGAN

| | Muka Surat |
|---|------------|
| PENGAKUAN | ii |
| PENGESAHAN | iii |
| PENGHARGAAN | iv |
| ABSTRAK | v |
| ABSTRACT | vi |
| KANDUNGAN | vii |
| SENARAI JADUAL | x |
| SENARAI RAJAH | xi |
| SENARAI FOTO | xii |
| SENARAI UNIT DAN SINGKATAN | xiii |
| SENARAI ISTILAH | xiv |
| BAB 1 PENDAHULUAN | 1 |
| | |
| BAB 2 ULASAN PERPUSTAKAAN | |
| 2.1 <i>Labisia pumila</i> (Kacip Fatimah) | 5 |
| 2.1.1 Ciri-ciri <i>Labisia pumila</i> | 6 |
| 2.1.2 Kegunaan <i>Labisia pumila</i> | 7 |
| 2.2 Transformasi | 9 |
| 2.3 Transformasi Genetik | 10 |
| 2.4 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 11 |
| 2.4.1 Plasmid Ti | 12 |
| 2.4.2 Gen-gen virulen dan fungsinya | 14 |
| 2.4.3 Mekanisma pemindahan T-DNA | 16 |
| 2.5 Teknik-teknik Lain dalam Transformasi Genetik | 18 |
| 2.5.1 Teknik rawatan agen kimia | 18 |
| 2.5.2 Teknik elektroforasi | 19 |
| 2.5.3 Teknik suntikan mikro | 20 |
| 2.5.4 Teknik biolistik | 20 |
| 2.6 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Transformasi | 21 |
| 2.6.1 Kepekatan asetosyringon | 21 |



| | |
|-----------------------------------|----|
| 2.6.2 Tempoh ko-kultivasi | 22 |
| 2.6.3 Suhu | 23 |
| 2.6.4 pH | 23 |
| 2.6.5 Strain <i>Agrobacterium</i> | 23 |

BAB 3 METODOLOGI

| | |
|--|----|
| 3.1 Senarai Bahan dan Radas | 25 |
| 3.2. Penyediaan Media | 26 |
| 3.2.1 Penyediaan media untuk pengkulturan <i>Labisia pumila</i> var. <i>pumila</i> | 26 |
| 3.2.2 Penyediaan media untuk pengkulturan <i>Agrobacterium tumefaciens</i> AGL1/pGPTV | 27 |
| 3.3 Prakultur Daun <i>Labisia pumila</i> var. <i>pumila</i> | 28 |
| 3.4 Transformasi Eksplan <i>Labisia pumila</i> var. <i>pumila</i> | 29 |
| 3.4.1 Pengkulturan <i>Agrobacterium tumefaciens</i> AGL1/pGPTV-KAN | 29 |
| 3.4.2 Pengujian aktiviti GUS <i>Agrobacterium tumefaciens</i> AGL1/pGPTV-KAN | 30 |
| 3.4.3 Ko-kultur eksplan <i>Labisia pumila</i> var. <i>pumila</i> bersama <i>Agrobacterium tumefaciens</i> AGL1/pGPTV-KAN | 30 |
| 3.6 Pengujian Aktiviti Gen Pelapor GUS | 31 |
| 3.7 Pengiraan Frekuensi Transformasi | 32 |

BAB 4 KEPUTUSAN

| | |
|--|----|
| 4.1 Pengkulturan <i>In Vitro</i> <i>Labisia pumila</i> var. <i>pumila</i> | 34 |
| 4.2 Prakultur Daun <i>Labisia pumila</i> var. <i>pumila</i> | 35 |
| 4.3 Pengkulturan <i>Agrobacterium tumefaciens</i> AGL1/pGPTV-KAN | 37 |
| 4.4 Pengujian Aktiviti GUS <i>Agrobacterium tumefaciens</i> AGL1/pGPTV-KAN | 38 |
| 4.5 Transformasi Eksplan <i>Labisia pumila</i> var. <i>pumila</i> | 40 |
| 4.6 Pengujian Aktiviti Gen Pelapor GUS | 42 |
| 4.7 Pengiraan Frekuensi Transformasi | 43 |



| | |
|--|----|
| BAB 5 PERBINCANGAN | |
| 5.1 Prakultur Daun <i>Labisia pumila</i> var. <i>pumila</i> | 47 |
| 5.2 Transformasi <i>Labisia pumila</i> var. <i>pumila</i> dengan <i>Agrobacterium tumefaciens</i> AGL1/pGPTV-KAN | 49 |
| 5.3 Kesan Tempoh Ko-kultivasi | 51 |
| 5.4 Kesan Kepekatan Asetosyringon | 53 |
| BAB 6 KESIMPULAN | 56 |
| RUJUKAN | 58 |
| LAMPIRAN A | 67 |
| LAMPIRAN B | 68 |
| LAMPIRAN C | 69 |
| LAMPIRAN D | 70 |



SENARAI JADUAL

| No. Jadual | Muka Surat |
|--|------------|
| 2.1 Contoh-contoh tumbuhan yang telah berjaya ditransformasi | 10 |
| 3.1 Senarai peralatan yang digunakan | 25 |
| 3.2 Media prakultur, media ko-kultivasi tanpa asetosyringon, media ko-kultivasi dengan asetosyringon dan media regenerasi dengan antibiotik. | 27 |
| 3.3 Komposisi reagen X-Gluc | 32 |
| 3.4 Skor untuk peratusan permukaan eksplan yang berwarna biru | 33 |
| 4.1 Kecekapan transformasi untuk tempoh ko-kultivasi yang dikaji | 44 |
| 4.2 Kecekapan transformasi untuk kepekatan asetosyringon yang dikaji | 44 |
| 4.3 Skor permukaan eksplan yang berwarna biru bagi tempoh ko-kultivasi yang berlainan | 45 |
| 4.4 Skor permukaan eksplan yang berwarna biru bagi kepekatan asetosyringon yang berlainan | 46 |



SENARAI RAJAH

| No. Rajah | Muka Surat |
|--|------------|
| 2.1 Peta genetik bagi T-DNA plasmid-Ti (Hughes, 1996) | 14 |
| 2.2 Struktur asetosyringon (Hughes, 1996) | 16 |
| 2.3 Mekanisma pemindahan T-DNA (Zupan and Zambryski, 1992) | 18 |



SENARAI FOTO

| No. Foto | Muka Surat |
|--|------------|
| 2.1 <i>Labisia pumila</i> var. <i>pumila</i> | 7 |
| 4.1 Kultur daun <i>Labisia pumila</i> var. <i>pumila</i> dalam media MS secara <i>in vitro</i> | 35 |
| 4.2 Kultur daun <i>Labisia pumila</i> var. <i>pumila</i> dalam media prakultur (MS + 2.5mg/L NAA + 10mg/L BAP) pada hari pertama | 36 |
| 4.3 Pembentukan kalus dilihat pada minggu ketiga pengkulturan dalam media prakultur (MS + 2.5mg/L NAA + 10mg/L BAP) | 36 |
| 4.4 Koloni tunggal <i>Agrobacterium tumefaciens</i> AGL1/pGPTV-KAN yang terbentuk dalam media pemilihan LB + 25mg/L kanamisin selepas tiga hari | 37 |
| 4.5 Media pemilihan LB cecair yang telah diinokulasi dengan <i>Agrobacterium tumefaciens</i> AGL1/pGPTV semalam untuk proses transformasi | 38 |
| 4.6 Keputusan positif menunjukkan penghasilan warna biru dalam tiub mikrocentrifuge yang mengandungi media LB dan 25mg/L kanamisin dengan pertumbuhan <i>Agrobacterium tumefaciens</i> AGL1/pGPTV-KAN | 39 |
| 4.7 Proses inokulasi dan ko-kultivasi | 41 |
| 4.8 Bintik biru yang kelihatan pada permukaan eksplan | 42 |



SENARAI UNIT DAN SINGKATAN

| | |
|--------------------|---|
| $^{\circ}\text{C}$ | Darjah <i>Celsius</i> |
| μM | Mikromolar |
| mM | Milimolar |
| cm | Sentimeter |
| μm | Mikrometer |
| w/v | Berat per isipadu |
| mL | Mililiter |
| mg/L | Miligram per liter |
| μL | Mikroliter |
| v/v | Isipadu per isipadu |
| nM | Nanomolar |
| GUS | β -Glucuronidase |
| r.p.m | Revolution per minute (pusingan per minit) |
| min | minit |
| DNA | <i>Deoxyribonucleic acid</i> |
| T-DNA | 'Transfer DNA' |
| Plasmid Ti | 'Tumor-inducing plasmid' |
| X-Gluc | <i>5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Glucuronic acid</i> |
| Vir | Virulence (virulen) |
| X-Gal | <i>5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galactosidase</i> |
| IPTG | Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranoside |
| bp | Base pair (pasangan bes) |
| LB | Luria Bertanni |
| MS | Murashige Skoog |
| ss DNA | Single-stranded DNA |
| DMF | Dimethylformamide |
| NPTII | Neomycin phosphotransferase II |
| BAP | 6-Benzylaminopurine |
| NAA | 1-Naphthaleneacetic acid |



SENARAI ISTILAH

| | |
|-------------------------|--------------------|
| Asetosyringon | Acetosyringone |
| Bahagian bingkai bacaan | Open reading frame |
| Bahagian pengenalan | Recognition site |
| Dilorekkan | Streaked |
| Elektroforesis | Electrophoresis |
| Gen pemberitahu | Reporter gene |
| Inkubasi | Incubation |
| Kawalatur | Regulation |
| Mikropengempar | Microcentrifuge |
| Materai | Seal |
| Penanda | Marker |
| Penganjur | Promoter |
| Penerima | Recipient |
| Alat penggegar | Vortexer |
| Perumah | Host |
| Penimbal | Buffer |
| Rintang | Resistance |
| Selitan | Insert |
| Ulangan berterusan | Direct repeat |
| Alat pengeraman | Incubator |
| Kanamisin | Kanamycin |



BAB 1

PENDAHULUAN

Bioteknologi merupakan aplikasi teknik-teknik saintifik untuk memajukan tumbuhan, haiwan dan mikroorganisma dengan meningkatkan nilainya. Bioteknologi pertanian adalah bidang bioteknologi yang melibatkan aplikasi kepada tumbuhan. Pada tahun 1970-an, kemajuan dalam bidang molekular biologi telah membolehkan saintis untuk memindahkan gen daripada organisma termasuk tumbuhan, haiwan, bakteria atau virus ke dalam organisma yang lain. Teknologi ini dikenali sebagai kejuruteraan genetik. Organisma yang telah ditransformasi dengan menggunakan teknik bioteknologi moden dengan menukar maklumat genetiknya adalah merujuk kepada *genetically modified organism* (GMO). Kejuruteraan genetik dalam tumbuhan telah menjadi satu teknik yang penting bagi para petani (Grant *et al.*, 1998).

Kaedah transformasi biasanya digunakan untuk memperbaiki kelemahan dan mencipta pembaharuan pada gen haiwan dan tumbuhan. Ia telah memberikan kesan hasil daripada pembaharuan yang dilakukan. Dalam bidang pertanian, ia mendarangkan kelebihan dengan meningkatkan kualiti dan hasil bagi pengeluaran. Transformasi juga penting dalam pertanian jika dapat menghasilkan tumbuhan yang rintang kepada herbisid, pestisid penyakit, serangan serangga dan serangan virus yang tidak menentu kerana ia akan membawa kesan yang besar kepada industri

pertanian dan pada manusia. Contohnya, tebu (*Saccharum officinarum* L.) yang rintang kepada herbisid telah ditransformasikan dengan menggunakan *Agrobacterium* (Enriquez-Obregón *et al.*, 1998).

Terdapat pelbagai tumbuhan herba di Malaysia, di antaranya ialah *Centella asiatica* (pegaga), *Audrographis paniculata* (hempedu bumi), *Eurycoma longifolia* (tongkat Ali) dan beratus-ratus tumbuhan herba yang lain telah berjaya dikomersialkan dalam bidang komestik dan perubatan. Antara tumbuhan herba yang telah mendapat perhatian yang meluas selain *Eurycoma longifolia* (tongkat Ali) ialah *Labisia pumila*.

Labisia pumila merupakan tumbuhan ubatan tempatan yang banyak digunakan dalam industri perubatan traditional untuk menghasilkan produk terutamanya untuk rawatan wanita Melayu selepas bersalin. Dipercayai juga, *Labisia pumila* boleh memudahkan pengecutan dan menguatkan rahim, mengurangkan darah haid, mengelakkan sakit meroyan, merawat sakit kelamin, batu karang, berak berdarah, cirit-birit, sakit atau patah tulang (Zainon, 2004). Permintaan yang tinggi terhadap *Labisia pumila* dalam industri perubatan traditional telah menyebabkan pengurangan bilangan spesis dalam hutan Negara kita. Kadar pertumbuhannya yang lambat juga menyumbang kepada masalah ini. Melihat kepada sumbangan *Labisia pumila* terhadap ekonomi Malaysia, masalah-masalah ini perlu diatasi.

Ini seterusnya telah membuka peluang kepada bidang bioteknologi terutamanya apabila teknik-teknik dalam kultur tisu dan kejuruteraan genetik telah memberi sumbangan dalam menyelesaikan masalah-masalah yang wujud dalam

industri. Untuk menghindarkan daripada kepupusan *Labisia pumila*, pembiakan *Labisia pumila* adalah penting. Bagi menyelesaikan masalah ketahanan terhadap serangan penyakit dan serangga pula, teknik-teknik dalam kejuruteraan genetik telah diaplikasikan melalui kaedah transformasi. Transformasi adalah perubahan pada fenotip organisma melalui penambahan DNA asing ke dalam genomnya.

Pada masa kini, terdapat beberapa teknik transformasi yang digunakan. Di antaranya ialah teknik pemindahan DNA yang melibatkan rawatan kimia contohnya polyethylene glycol (PEG) dan cara fizikal seperti elektroforasi, suntikan mikro, teknik tembakan partikel biolistik dan teknik pemindahan DNA dengan bantuan *Agrobacterium*.

Dalam kajian ini, *Agrobacterium tumefaciens* digunakan dalam proses transformasi. *Agrobacterium tumefaciens* merupakan kaedah yang digunakan secara meluas dalam DNA transformasi tumbuhan (Vijn dan Govers, 2003). Proses ini adalah berdasarkan kepada proses transformasi yang berlaku secara semulajadi pada tumbuhan dikotiledon yang menyebabkan penyakit *crown gall*. Fenomena semulajadi *Agrobacterium* ini merupakan pencetus idea untuk menjadikannya vektor dalam teknik transformasi genetik, *Agrobacterium tumefaciens* adalah satu kaedah yang murah dan mudah dilakukan secara *in vitro* jika dibandingkan dengan kaedah lain yang agak praktikal dan berkos tinggi.

Transformasi menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* merupakan suatu kaedah yang mengeksplorasikan keupayaan semulajadi bakteria tersebut untuk memperkenalkan satu segmen DNA yang onkogenik yang dikenali sebagai T-DNA ke

dalam sel tumbuhan melalui permukaan luka. Proses pemindahan gennya adalah bergantung kepada plasmid iaitu plasmid perangsang tumor iaitu *tumor-inducing* (plasmid Ti). T-DNA yang diperkenalkan akan berintegrasi dengan genom tumbuhan melalui rekombinasi.

Objektif utama projek ini adalah mentransformasikan *Labisia pumila* dengan menyisip DNA asing ke dalam genom *Labisia pumila* var. *pumila* dengan menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 dengan plasmid pGPTV-KAN dengan mengoptimalkan beberapa parameter untuk meningkatkan proses transformasi. Parameter yang dikaji ialah kepekatan asetosyringon dan tempoh kultivasi.

BAB 2

ULASAN PERPUSTAKAAN

2.1 *Labisia pumila* (Kacip Fatimah)

Labisia pumila merupakan salah satu spesis dalam famili Myrsinaceae. Ia pernah dinamakan sebagai *Labisia pothoina* Lindl (Jamia et al., 2004). Mengikut Burkill (1935), *Labisia pumila* dikenali dengan pelbagai nama seperti selusuh Fatimah, rumput siti Fatimah, akar Fatimah, kunci Fatimah, pokok pinggang, rumput palis, tadah matahari, mata pelanduk rimba dan bunga belangkas hutan, kerakap rimba dan seriau malam di Malaysia. Namun, kebanyakan orang Melayu menggelarnya kacip Fatimah. Mengikut Stone (1988), *Labisia pumila* boleh dijumpai di Malaysia, Thailand, Indochina, Philippines dan New Guinea.

Labisia pumila mudah dijumpai di kebanyakan hutan tanah pamah di Semenanjung Malaysia pada ketinggian 80-100 meter di atas paras laut (Jamia et al., 1999) dan sedikit ditemui di kawasan berbukit (Wiart, 2002). Kawasan tanah gambut yang lembap dan terlindung merupakan faktor utama yang membolehkan kacip Fatimah hidup dengan baik. (Zhari et al., 1999). Daripada kajian, didapati juga serbuk kayu sentang merupakan media terbaik untuk penanaman kacip Fatimah berbanding dengan sabut kelapa, tanah hitam, humus dan tanah biasa (Mohd Radzi et al., 2000).

Labisia pumila mudah dibiakkan secara tampang melalui keratan batang (Rozihawati et al., 2004).

2.1.1 Ciri-ciri *Labisia pumila*

Labisia pumila adalah tumbuhan herba yang kecil dengan batang menjalar (Jamia et al., 2004). Kebanyakan pengamal perubatan traditional mengklasifikasikan pelbagai jenis *Labisia pumila* berdasarkan kepada bentuk petiol, warna daun, lamina daun dan ciri tangkai daun. Mengikut Stone (1988), *Labisia pumila* yang diperoleh di Malaysia mempunyai tiga variati asli, iaitu *Labisia pumila* var. *alata*, *Labisia pumila* var. *pumila* dan *Labisia pumila* var. *lanceolata*.

Labisia pumila var. *alata* mempunyai tangkai daun pendek (2-8cm) bersayap lebar, sementara tangkai daun *Labisia pumila* var. *pumila* yang pendek (2-8cm) bersayap halus. *Labisia pumila* var. *lanceolata* pula mempunyai tangkai daun yang panjang (5-13cm) tanpa sayap (Jamia et al., 2004). *Labisia pumila* var. *alata* mempunyai daun ovat yang sama dengan *Labisia pumila* var. *pumila* tetapi petiolnya bersayap berbanding dengan petiol marginat atau tidak bersayap pada *Labisia pumila* var. *pumila*. *Labisia pumila* var. *lanceolata* pula berbeza dengan kedua-duanya kerana mempunyai petiol yang kurus, bersegitiga dan panjang (5-13cm) dan juga daun yang lanciolat (Latiff et al., 2002). Warna daun *Labisia pumila*, iaitu sama ada hijau atau perang keunguan adalah disebabkan oleh kehadiran pigmen tertentu pada daun. Justeru, kebanyakan daun pokok hutan *Labisia pumila* yang asalnya berwarna ungu bertukar secara perlahan-lahan menjadi hijau apabila ditanam di tempat yang mempunyai keamatian cahaya matahari yang tinggi (Jamia et al., 2004). Secara

umumnya, buah *Labisia pumila* adalah berbentuk bulat yang berdiameter 0.5-0.8cm (Latiff *et al.*, 2002) yang berwarna merah cerah atau ungu (Zhari *et al.*, 1999). Bunganya adalah kecil, berwarna merah jambu atau putih, perbungaan panikel, 6-30cm long, mempunyai 5 kelopak daun, kelopak bunga dan stamen. Akar *Labisia pumila* adalah kuat dan bersifat seperti kayu yang mempunyai akar permulaan yang panjang dan akar sekunder yang sedikit (Zhari *et al.*, 1999).



Foto 2.1 *Labisia pumila* var. *pumila*

2.1.2 Kegunaan *Labisia pumila*

Labisia pumila adalah salah satu tumbuhan ubatan tempatan yang banyak digunakan dalam industri perubatan traditional untuk menghasilkan produk terutamanya untuk rawatan wanita Melayu selepas bersalin. Mengikut Burkhill (1935), *Labisia pumila*

juga digunakan untuk wanita mengandung di mana ia diberikan beberapa bulan sebelum bersalin dan dipercayai dapat mempercepat dan memudahkan bersalin. Walau bagaimanapun, *Labisia pumila* pernah direkodkan sebagai ubat untuk mengurangkan kembung pada bayi kecil dengan menggunakan daunnya yang dihancurkan dan dicampurkan dengan minyak kelapa, minyak ini disapu pada perut bayi (Chai *et al.*, 1989). Bahagian tumbuhan ini yang boleh digunakan sama ada daun, akar atau keseluruhan pokok (Zainon, 2004).

Air rebusan akar kacip Fatimah sangat popular di kalangan masyarakat Melayu di mana ia didakwa dapat memulihkan kewanitaan selepas melahirkan anak, menambahkan kekuatan dan kesegaran serta ubat penjarang atau perancang (Latiff *et al.*, 2002). Dengan meminum air rebusan akarnya, tumbuhan ini dipercayai boleh menyembuhkan sakit otot dan sakit badan. Selain itu, antara khasiat *Labisia pumila* ialah untuk memudahkan pengecutan dan menguatkan rahim, mengurangkan darah haid, mengelakkan sakit meroyan, merawat sakit kelamin, batu karang, berak berdarah, cirit-birit, sakit atau patah tulang (Zainon, 2004), mengubati bisul (Goh, 2000) dan untuk menghentikan penggunaan bekas susu untuk kanak-kanak yang sedang membesar (Khozirah *et al.*, 1992).

Di samping itu, kaum lelaki yang meminum air rebusan akar kacip Fatimah dipercayai boleh mengekal atau meningkatkan stamina (Jamia *et al.*, 2004). Sejak kebelakangan ini, *Labisia pumila* dilaporkan boleh menyebabkan penyakit kulit yang dikenali sebagai dermatitis (Jamia *et al.*, 2004). Ini bermakna daun dan akar *Labisia pumila* akan menyebabkan penyakit dermatitis bagi individu yang sensitive.

Kini, *Labisia pumila* telah dikomersialkan dengan meluas dan ditanam di kebanyakan pusat germplasma di serata tempat di Malaysia, bukan sahaja oleh agensi kerajaan tetapi juga oleh pihak swasta.

2.2 Transformasi

Transformasi ialah satu proses perubahan pada ciri-ciri fenotip organisma akibat daripada pemindahan DNA ke dalam sel organisma dan kemudiannya berintegrasi dengan genom organisma tersebut (Gamborg, 1995). Transformasi adalah penting bagi tanaman yang mempunyai nilai komersial. Sel atau baka yang terhasil daripada proses ini dikatakan telah ditransform sekiranya memperlihatkan pengekspresan marker gen yang dibawa oleh DNA yang diperkenalkan.

Kaedah manipulasi genetik ini membolehkan saintis mengambil satu DNA daripada organisma tertentu dan menyisipkannya ke dalam genom organisma yang berlainan spesis yang dikenali sebagai rekombinan DNA (Trigiano dan Gray, 2000) tanpa memberi kesan kepada genotip tumbuhan tersebut. Gen yang dikehendaki boleh diperoleh daripada spesis lain yang tidak sepadan dan disisipkan kepada tumbuhan yang hendak ditransformkan. Malahan, gen yang boleh meningkatkan kerintangan tumbuhan terhadap penyakit boleh diperoleh daripada spesis lain juga boleh digunakan. Ini seterusnya akan memperluaskan ruang bagi penyelidikan dan pembangunan sesuatu tumbuhan. Jadual 2.1 menunjukkan tumbuh-tumbuhan yang telah berjaya ditransformasikan.

RUJUKAN

- Aoki, T., Kamizawa, A. dan Ayabe, S., 2002. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Lotus japonicus* with reliable antibiotic selection. *Plant Cell Reports* **21**, 238-243.
- Barton, K. A. dan Chilton, M. D., 1983. *Agrobacterium* Ti Plasmids as Vectors for Plant Genetic Engineering. *Methods in Enzymology* **101**, 527-539.
- Becker, D., Kemper, E., Schell, J. dan Masterson, R., 1992. New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA borders. *Plant Molecular Biology* **20**, 1195-1197.
- Bolar, J. P., Brown, S. K., Norelli, J. L. dan Aldwinckle, H. S., 1999. Factors affecting the transformation of 'Marshall McIntosh' apple by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **55**, 31-38.
- Burkill, I. H., 1935. *Dictionary of the economic products of Malay Peninsula*. Crown Agent, London.
- Braun, A. C., 1947. A physiological basis for the autonomous growth of the crown gall tumor cell. *Proc Natl Acad USA* **44**: 344-349.
- Chabaud, M., Larsonneau, C., Marmouget, C. dan Huguet, T., 1996. Transformation of barrel medic (*Medicago truncatula* Gaertn.) by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration via somatic embryogenesis of transgenic plants with the MtENOD12 nodulin promoter fused to the *gus* reporter gene. *Plant Cell Reports* **15**, 305-310.
- Chai, P. P. K., Lee, B. M. H. dan Ismawi, H. O., 1989. *Native Medicinal Plants of Sarawak*. Forest Botany Unit, Forest Department Kuching, Sarawak.

- Cheng, M., Fry, J. E., Pang, S., Zhou, H., Hironaka, C. M., Duncan, D. R., Conner, T. W. dan Wan, Y., 1997. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiology* **115**, 971-980.
- Cortina, C. dan Culianez-Maciá, F. A., 2004. Tomato transformation and transgenic plant production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **76**, 269-275.
- Crossway, A., 1989. Microinjection of cells and protoplasts: integration of foreign DNA. Dlm: Bajaj, Y. P. S. (pnyt.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry 9: Plant Protoplasts and Genetic Engineering II*. Springer-Verlag, Germany, 228-240.
- De Clercq, J., Zambre, M., Montagu, M. V., Dillen, W. and Angenom, G., 2002. An optimized Agro-mediated transformation procedure for *phaseolus acutifolius* A. Gray. *Plant Cell Report* **21**, 333-340.
- Dewulf, J. dan Negrutiu, I., 1991. Direct gene transfer into protoplasts: The chemical approach. Dlm: Negrutiu, I. dan Gharti-Chhetri, G.B. (pnyt.), *A Laboratory Guide for Cellular and Molecular Plant Biology*. Berlin, Birkhäuser Velag Basel, 116-121.
- Enriquez-Obregón, A. G., Vázquez-Padrón, I. R., Prieto-Samsonov, L. D., De la Riva, A. G. dan Selman-Housein, G., 1998. Herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Planta* **206**, 20-27.
- Evans, D. E., Coleman, J. O. D. dan Kearns, A., 2003. *Plant Cell Cultures*. Bios Scientific Publishers, USA.
- Fenning, T. M., Tymens, S. S., Gartland, J. S., Brasier, C. M. dan Gartland, K. M. A., 1996. Transformation and regeneration of English elm using wild-type *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science* **116**, 37-46.

- Filichkin, S. A. dan Gelvin, S. B., 1993. Formation of a putative relaxation intermediate during T-DNA processing directed by the *Agrobacterium tumefaciens* VirD1, D2 endonuclease. *Mol Microbiol* **8**: 915-926.
- Franklin, G. dan Sita, G. L., 2003. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of eggplant (*Solanum melongena* L.) using root explants. *Plant Cell Reports* **21**, 549-554.
- Gamborg, O. L. dan Phillips, G. C., 1995. *Plant cell, Tissue and Organ Culture Fundamental Methods*. Springer-Verlag, Germany.
- Godwin, I., Todd, G., Ford-Lloyd, B. dan Newbury, H. J., 1991. The effects of acetosyringone and pH on *Agrobacterium*-mediated transformation vary according to plant species. *Plant Cell Reports* **9**, 671-675.
- Goh, K. L., 2000. *Malaysian Herbs (Edition Chinese)*. **247**. Percetakan Advanco Sdn. Bhd, Kuala Lumpur.
- Grierson, D., 1991. *Plant Genetic Engineering*. Blackie & Son Ltd, USA.
- Grant, J. E., Cooper, P. A., Gilpin, B. J., Hoglund, S. J., Reader, J. K., Pither-Joyce, M. D. dan Timmerman-Vaughan, G. M., 1998. Kanamycin is effective for selecting transformed peas. *Plant Science* **139**, 159-164.
- Grant, J. E., Dommisso, E. M., Christey, M. C., Conner, A. J., 1991. Gene transfer to plants using *Agrobacterium*. Dlm: Murray (pnyt.), Advanced method in plant breeding and biotechnology. CAB International, United Kingdom, 50-73.
- Han, J. L., Wang, H., Ye, H. C., Liu, Y., Li, Z. Q., Zhang, Y., Zhang, Y. S., Yan, F. dan Li, G. F., 2005. High efficiency of genetic transformation and regeneration of *Artemisia annua* L. via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated procedure. *Plant Science* **168**, 73-80.

Harborne, J. B., 1998. *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plants Analysis*. Ed. ke-3. Chapman and Hall, London.

Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. dan Kumashiro, T., 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa L.*) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant Journal* 6: 271-282.

Hooykaas, P. J. J. dan Schilperoort, R. A., 1984. The molecular genetics of crown gall tumorigenesis. *Advances in Genetics* 22, 209-283.

Hughes, A. M., 1996. *Plant Molecular Genetics*. Longman Limited. England.

Jamia, A. J., Houghton, P. J. dan Milligan, S. R., 1999. Kacip fatimah: A malay traditional herb for pregnant women. Dlm: A. Manaf Ali, Khorizah, S. dan Zuriyati, Z. (pnyt.), *Phytochemicals and Biopharmaceutins from Malaysian Rain Forest*. Forest Research Institute Malaysia, Kuala Lumpur, 166-167.

Jamia, A. J., Houghton, P. J. dan Rohna, R., 2004. Contact dermatitis caused by kacip fatimah. *Seminar on Medicinal & Aromatic plants, current trends & perspectives*, 20 & 21 July 2004, Forest Research Institute Malaysia, Kuala Lumpur.

Jamia, A. J., Ibrahim, J., Khairana, H. dan Juriyati, J., 2004. Perkembangan, penyelidikan dan pembangunan kacip fatimah. Dlm: *New Dimensions in Complementary Health Care*. Forest Research Institute Malaysia, Kuala Lumpur, 13-19.

Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. dan Bevan, M. W., 1987. GUS fusion: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* 6: 3901-3907.

- Jin, S., Koma, T., Gordon, M. P. dan Nester, E. W., 1987. Genes responsible for the supervirulence phenotype of *Agrobacterium tumefaciens* A281. *J.Bacteriol* **169**: 4417-4425.
- Jong, J., Rademaker, W. dan Wordragen, M. F., 1993. Restoring adventitious shoot formation on chrysanthemum leaf explants following cocultivation with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **32**, 263-270.
- Kar, S., Johnson, T. M., Nayak, P. dan Sen, S.K., 1996. Efficient transgenic plant regeneration through *Agrobacterium*-mediated transformation of Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Cell Reports* **16**, 32-37.
- Khorizah, S., Azizol, A. K. dan Mohd Ali, A. R., 1992. Medicinal products from tropical rain forest. *Proceedings of the Conference 1992*, Forest Research Institute Malaysia, Kuala Lumpur.
- Kishimoto, S., Aida, R. dan Shibata, M., 2002. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of Elatior Begonia (*Begonia x hiemalis* Fotsch). *Plant Science* **162**, 697-703.
- Klee, H., Horsch, R. dan Rogers, S., 1987. *Agrobacterium*-mediated plant transformation and its further applications to plant biology. *Annual Review of Plant Physiology* **38**, 467-486.
- Kushikawa, S., Hoshino, Y. dan Mii, M., 2001. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Saintpaulia ionantha* Wendl. *Plant Science* **161**, 953-960.
- Latiff, A. dan Kamarudin Mat Salleh., 2002. *Tumbuhan Ubatan Malaysia*. Universiti Kebangsaan Malaysia, Bangi.
- Lippincott, J. A. dan Lippincott, B. B., 1975. The genus *Agrobacterium* and plant tumorigenesis. *Annual Review of Microbiology* **29**, 377-405.

- Madigan, M. T., Martinko, J. M. dan Parker, J., 1997. *Brock Biology of Microorganism*. Ed. ke-8. Prentice Hall International, London.
- Men, S. Z., Ming, X. T., Liu, R. W., Wei, C. H. dan Li, Y., 2003. *Agrobacterium-mediated genetic transformation of a Dendrobium orchid*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **75**, 63-71.
- Mohd Radzi, A., Mohd Ilham, A., Mohd Azlan, N. dan Mohd Kafi, J., 2000. Perbandingan penggunaan media dalam penanaman kacip fatimah-satu kajian awal. Dlm: Chang, Y. S., Mohtar, M., Subramaniam, V. dan Zainon A. S. (pnyt.), *Towards Bridging Science & Herbal Industry*. Forest Research Institute Malaysia, Kuala Lumpur, 262-269.
- Moses, V. dan Cape, R. E., 2003. *Biotechnology the Science and the Business*. Ed. ke-2. Harwood Academic Publishers, United Kingdom.
- Murashige, T. dan Skoog, F., 1962. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497.
- Nakamura, Y., Kobayashi, S. dan Nakajima, I., 1997. *Agrobacterium-mediated transformation and plant regeneration from hypocotyls segments of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* Thunb)*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **55**, 435-440.
- Nishibayashi, S., Kaneko, H dan Hayakawa, T., 1996. Transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants using *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration from hypocotyls explants. *Plant Cell Reports* **15**, 809-814.
- Potrykus, I., 1995. *Gene Transfer to Plants*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York.
- Ream, W., 2002. *Agrobacterium Genetics*. Dlm: Streips, N. U. dan Yasbin, E. R. (pnyt.), *Modern Microbial Genetics*. Ed. ke-2. Wiley-Liss, New York.



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

- Rozihawati, Z. dan Azmy, M., 2004. Pembiakan tampang melalui keratan bahagian batang *Labisia pumila* (kacip fatimah). Seminar on Medicinal & Aromatic plants, current trends & perspectives, 20 & 21 July 2004. Forest Research Institute Malaysia, Kuala Lumpur.
- Sala, F., Marchesi, M. L., Castiglione, S., Paszkowski, J., Saul, M., Potrykus, I. dan Negrutiu, I., 1989. Direct gene transfer in protoplasts of *Nicotiana plumbaginifolia*. Dlm: Bajaj, Y. P. S. (pnyt.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry 9: Plant Protoplasts and Genetic Engineering II*. Springer-Verlag, Germany, 217-218.
- Satyavathi, V. V., Prasad, V., Lakshmi, B. G. dan Lakshmi G. S., 2002. High efficiency transformation protocol for three Indian cotton varieties via *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science* **162**, 215-223.
- Schaart, J. G., Puite, K. L., Kolova, L. dan Pogrebnyak, N., 1995. Some Methodological aspects of apple transformation by *Agrobacterium*. *Euphytica* **85**, 131-134.
- Srivastava, M. L., 2002. *Plant Growth and Development Hormones & Environment*. Elsevier Science, USA.
- Stachel, S. E., Timmerman, B., dan Zambryski, P., 1986. Generation of single-stranded T-DNA molecules during initial stages of T-DNA transfer *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. *Nature* **322**: 706-712.
- Stone, B. C., 1988. Notes on the Genus *Labisia Lindl.* (Myrsinaceae). *Malayan Nature Journal* **42**, 43-51.

- Taskin, K. M., Turgut, K., Ercan, A. G. dan Scott, R. J., 2003. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabis gunnisoniana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **72**, 173-179.
- Trigiano, N. R. dan Gray, J. D., 2000. *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*. Ed. ke-2. CRC Press, London.
- Tsugawa, H., Kagami, T. dan Suzuki, M., 2004. High-frequency transformation of *Lobelia erinus* L. by *Agrobacterium*-mediated gene transfer. *Plant Cell Reports* **22**, 759-764.
- Uchida, A., Nagamiya, K. dan Takabe, T., 2003. Transformation of *Atriplex gmelini* plants from callus lines using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **75**, 151-157.
- Vergauwe, A., Geldre, E. V., Inzé, D., Montagu, M. V. dan Eeckhout, E. V. D., 1998. Factors influencing *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Artemisia annua* L. *Plant Cell Reports* **18**, 105-110.
- Vijn, I. dan Govers, F., 2003. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant Pathology* **4**, 459-467.
- Vlachova, M., Metz, B. A., Schell, J. dan Bruijn, F. J. 1987. The tropical legume *Sesbania rostrata*: tissue culture, plant regeneration and infection with *Agrobacterium tumefaciens* and *rhizogenes* strains. *Plant Science* **50**, 213-223.
- Westhoff, P., 1998. *Molecular Plant Development from Gene to Plant*. Georg Thieme Verlag, United States.
- Wiart, C., 2002. *Medicinal Plants of Southeast Asia*. Ed. ke-2. Prentice Hall, Malaysia, 118-119.

- Winans, S. C., 1992. Two-way chemical signaling in *Agrobacterium*-plant interactions. *Microbiol Rev* **56**: 12-31.
- Yamada, T., Teraishi, M., Hattori, K. dan Ishimoto, M. 2001. Transformation of azuki bean by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **64**, 47-54.
- Zainon, A. S., 2004. Tumbuhan penawar pelbagai penyakit: tongkat ali, kacip fatimah dan pegaga. Dlm: A. Manaf Ali, Khorizah, S. dan Zuriyati, Z. (pnyt.), *New Dimensions in Complementary Health Care*. Forest Research Institute Malaysia, Kuala Lumpur, 3-6.
- Zambryski, C. P., 1992. Chronicles from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer story. *Annual Review of Plant Physiology* **43**, 465-490.
- Zhari, I., Norhayati, I., dan Jaafar, L., 1999. *Malaysian Herbal Monograph*. Ed. ke-1. Malaysian Monograph Committee, Malaysia, 45-48.
- Zupan, R. J. dan Zambriyski, P., 1995. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiology* **107**, 1041-1047.