

UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

BORANG PENGESAHAN STATUS TESIS@

JUDUL: TRANSFORMASI ORKID DARI SPESIES COELOGYNE

MENGGUNAKAN AGROBACTERIUM

Ijazah: SARJANA MUDA SAINS

SESI PENGAJIAN: 2003/2004

Saya GOH CHIEN LONG

(HURUF BESAR)

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

1. Tesis adalah hakmilik 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

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

☐

TERHAD

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

☒

TIDAK TERHAD

Disahkan oleh

Goh Chien Long
(TANDATANGAN PENULIS)

(TANDATANGAN PUSTAKAWAN)

Alamat Tetap: 1877-2, Jalan Bukit
Palan, Bukit Baru, 75150

Nama Penyalia

melaka

Tarikh: 22/3/04

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 disertasi bagi pengajian secara kerja kursus dan penyelidikan, atau Laporan Projek Sarjana Muda (LPSM).



TRANSFORMASI ORKID DARI SPESIES *COELOGYNE* MENGGUNAKAN
AGROBACTERIUM

GOH CHIEN LONG

DISERTASI INI DIKEMUKAKAN UNTUK MEMENUHI SEBAHAGIAN
DARIPADA SYARAT MEMPEROLEHI IJAZAH SARJANA MUDA SAINS
DENGAN KEPUJIAN

PROGRAM BIOTEKNOLOGI
SEKOLAH SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

2004

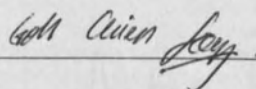


UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

PENGAKUAN

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

11 Mac 2003



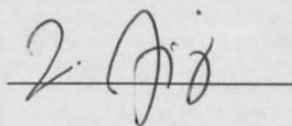
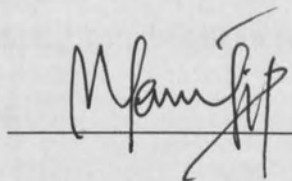
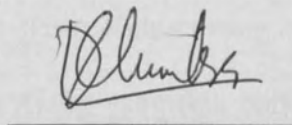
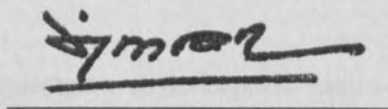
GOH CHIEN LONG

HS 2001-2408



DIPERAKUI OLEH

Tandatangan

1. PENYELIA**(DR. ZALEHA ABDUL AZIZ)****2. PEMERIKSA 1****(PROF. MADYA DR. MARIAM ABDUL LATIP)****3. PEMERIKSA 2****(DR. LEE PING CHIN)****4. DEKAN****(PROF. MADYA DR. AMRAN AHMED)**

PENGHARGAAN

Sekalung penghargaan kepada Universiti Malaysia Sabah kerana telah memberikan peluang kepada saya untuk mengikuti pengajian selama 3 tahun dalam bidang Bioteknologi ini.

Di sini saya ingin merakamkan jutaan terima kasih kepada penyelia projek saya, Dr. Zaleha Abdul Aziz yang telah banyak memberi nasihat, dorongan serta bantuan yang amat berharga sepanjang projek ini dijalankan di samping membekalkan sampel bagi memastikan projek saya dapat disiapkan dengan lancar.

Tidak ketinggalan juga di sini saya ingin mengucapkan ribuan terima kasih kepada semua pelajar-pelajar post-graduate di makmal Tisu Kultur yang mesra memberi nasihat terutamanya kepada Kak Roseline Baun Ajang yang rela berkongsi maklumat, nasihat serta antibiotiknya dengan saya, Kak Abidah dan Kak Ainul Mardziah Mohamed yang telah banyak membantu dalam menjayakan projek saya.

Di sini saya juga ingin mengucapkan penghargaan saya kepada rakan-rakan seperjuangan saya yang rela menghulurkan bantuan peralatan dengan segera apabila diperlukan dan juga nasihat mereka. Sekian, terima kasih.



ABSTRAK

Kajian ini dijalankan adalah untuk mendapatkan satu sistem transformasi *Agrobacterium tumefaciens* ke atas tumbuhan monokotiledon orkid *Coelogyne* yang efisien serta melihat kesan acetosyringone dan tempoh ko-kultivasi yang sesuai. Kehadiran komponen fenolik acetosyringone diperhatikan dan dibezakan dengan masa ko-kultivasi tanpa acetosyringone pada tempoh masa ko-kultivasi yang berlainan iaitu 3, 5, 6, 7, dan 9 hari. Media penyarigan digunakan untuk memilih sel yang mengekspreskan gen yang rintang terhadap antibiotik hygromycin. Ujian GUS pula bertujuan menunjukkan kehadiran gen GUS pada bahagian sel tumbuhan yang diinfeksi. Didapati orkid *Coelogyne* berkemungkinan besar boleh ditransform menggunakan *Agrobacterium* dengan kejayaan 100%. Kehadiran 200 μ M acetosyringone meningkatkan kadar dan peratus transformasi iaitu 76.7% pada hari kelima manakala 40% pada hari kelima tanpa acetosyringone.



ABSTRACT

This main purpose of this project is to produce a transformation system for *Coelogyne* orchid using *Agrobacterium*. It was also to determine the effect of acetosyringone and cocultivation period on transformation system. Throughout the test, the presence and absence acetosyringone were observed and compared with co-cultivation period of 3, 5, 6, 7, and 9 days. Selection media was used to select the cells expressing the gene coding for hygromycin resistance. The purpose of GUS test was to observe the expression of *gus* gene where the plant cells was infected. From the test that had been done, *Coelogyne* orchid can be 100% successfully transform with *Agrobacterium*. The presence of 200 μ M of acetosyringone increases the percentage of transformation that was 76.7% at 5 days of cocultivation period compared to, 55.9% at 5 days cocultivation period without acetosyringone.



KANDUNGAN

	Muka Surat
PENGAKUAN	ii
PENGESAHAN	iii
PENGHARGAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
SENARAI KANDUNGAN	vii
SENARAI JADUAL	ix
SENARAI RAJAH	x
SENARAI FOTO	xi
SENARAI SIMBOL	xii
 BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 PENGENALAN	1
1.2 KEPENTINGAN ORKID (<i>Orchidaceace Coelogyne spp</i>)	2
1.3 TUJUAN KAJIAN	4
 BAB 2 ULASAN PERPUSTAKAAN	
2.1 ORKID (<i>Coelogyne</i>)	5
2.2 TRANSFORMASI GENETIK TUMBUHAN	7
2.3 FAKTOR YANG MEMPENGARUHI TRANSFORMASI DENGAN MENGGUNAKAN <i>Agrobacterium</i>	8
2.4 TRANSFORMASI TUMBUHAN MENGGUNAKAN <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	9
2.5 STRAIN AGL 1 DAN PLASMID pCAMBIA 1303	14
2.6 KOMPONEN FENOLIK ACETOSYRINGONE	15
2.7 MEDIA	16

BAB 3 BAHAN DAN KAEDAH

3.1	PENYEDIAAN MEDIA AGAR LURIA BERTANNI (LB)	17
3.2	PENGKULTURAN <i>Agrobacterium tumefaciens</i> DALAM MEDIA AGAR LURIA BERTANNI	17
3.3	PENYEDIAAN MEDIA CECAIR LURIA BERTANNI (LB)	18
3.4	PENGKULTURAN <i>Agrobacterium</i> DALAM MEDIA CECAIR LURIA BERTANNI (LB)	18
3.5	PENYEDIAAN MEDIA KO-KULTIVASI, KNUDSON C	19
3.6	INFEKSI DAN TRANSFORMASI	20
3.7	LARUTAN PENCUCI	21
3.8	MEDIA PENYARINGAN	22
3.9	PEMILIHAN EKSPLAN DALAM MEDIA PENYARINGAN	22
3.10	UJIAN HISTOKIMIA GUS	23

BAB 4 KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN

4.1	PENGKULTURAN DALAM MEDIA KOKULTIVASI	24
4.2	PENGKULTURAN ORKID DALAM MEDIA PENYARINGAN	25
4.3	TOMPOKAN BIRU UJIAN GUS	30
4.4	LANGKAH BERJAGA-JAGA	35

BAB 5 KESIMPULAN

	RUJUKAN	39
	LAMPIRAN	43



SENARAI JADUAL

No. Jadual	Muka Surat
3.1 Jumlah replikasi eksplan dalam jenis media ko-kultivasi dalam tempoh masa tertentu	21
4.1 Peratus eksplan yang masih berwarna hijau dalam media penyaringan daripada ko-kultivasi dengan kehadiran acetosyringone (AS)	26
4.2 Peratus eksplan yang masih berwarna hijau dalam media penyaringan daripada ko-kultivasi tanpa acetosyringone (AS)	27
4.3 Peratus eksplan yang menunjukkan tompokan biru dalam media ko-kultivasi yang berlainan	30

SENARAI RAJAH

No. Rajah	Muka Surat
2.1 Peta genetik octopine plasmid Ti	10
2.2 Pembentukan T-strand dalam <i>Agrobacterium</i>	12
2.3 Langkah asas dalam proses transformasi sel tumbuhan oleh <i>Agrobacterium</i>	13
2.5 Plasmid pCAMBIA 1301 yang mengandungi urutan hptII <i>Hygromycin</i> phosphotransferase cDNA dan gen <i>GUSA</i> beta-glucuronidase dengan catalase intron	14

SENARAI FOTO

No. Foto	Muka Surat
2.1 Benih meletup keluar dari buah orkid	6
4.1 Eksplan yang menunjukkan pertumbuhan <i>Agrobacterium</i> selepas enam hari dalam media ko-kultivasi tanpa acetosyringone	24
4.2 Eksplan yang masih berwarna hijau setelah dikulturkan dalam media penyaringan. (a) Daripada kultur 0 hari dalam media ko-kultivasi (b) Daripada kultur 3 hari dalam media ko-kultivasi tanpa acetosyringone. (c) Daripada kultur 9 hari dalam media ko-kultivasi dengan kehadiran acetosyringone.	29
4.3 Eksplan menunjukkan tompokan warna biru selepas direndam dalam larutan X-Gluc selama 24 jam. (a) Eksplan yang tidak tertransform. (b) Eksplan dalam NAS 3. (c) Eksplan dalam NAS 5. (d) Eksplan dalam NAS 6. (e) Eksplan dalam NAS 7. (f) Eksplan dalam NAS 9.	31
4.4 Eksplan menunjukkan tompokan warna biru selepas direndam dalam larutan X-Gluc selama 24 jam. (a) Eksplan dalam AS 3. (b) Eksplan dalam AS 5. (c) Eksplan dalam AS 6. (d) Eksplan dalam AS 7. E Eksplan dalam AS 9.	33

SENARAI SIMBOL

°C	Darjah selsius
%	Peratus
:	Nisbah
v/v	Isipadu per isipadu
w/v	Berat per isipadu
σ	Sisihan piawai
AS	Acetosyringone (Dengan acetosyringone)
AS5	Dalam media ko-kultivasi dengan kehadiran acetosyringone selama 5 hari
NAS	Non Acetosyringone (Tanpa acetosyringone)
NAS3	Dalam media ko-kultivasi tanpa acetosyringone selama 3 hari

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Pengenalan

Segala hidupan di dunia ini mempunyai beberapa ciri yang ketara untuk memastikannya ialah suatu hidupan yang bernyawa. Seperti yang diajar dalam subjek biologi, semua hidupan mesti mempunyai tiga peringkat asas iaitu dapat diregenerasikan, dapat berkembang menjadi matang, dan akhir sekali mati. Berikutan dengan perkembangan bidang bioteknologi dalam era moden ini, segala hidupan dapat diidentifikasi dengan lebih spesifik menerusi analisis DNA. Sekiranya terdapat perubahan DNA, maka transformasi atau mutasi berlaku. Transformasi genetik (perubahan genotip) biasanya akan menunjukkan perubahan fenotip serta ciri-cirinya. Pada masa kini kaedah transformasi digunakan bertujuan untuk mendapatkan tumbuhan yang lebih berkualiti.



Pengetahuan transformasi ini membawa banyak faedah apabila ia diaplikasikan dalam industri pertanian. Terdapat pelbagai kaedah transformasi dijalankan pada hari ini akibat daripada perkembangan teknologi serta pelbagai kajian yang dijalankan. Transformasi tanaman pertanian dan tumbuhan hiasan banyak dilakukan untuk mendapat tanaman yang dapat membuahkan hasil yang lebih lumayan dan juga lebih rintang terhadap serangan serangga perosak, penyakit dan juga racun serangga dan herbisid.

1.2 Kepentingan orkid (*Orchidaceace Coelogyne spp*)

Menurut The American Orchid Society, setiap tahun masih terdapat spesies baru yang ditemui. Maka masih banyak peluang kajian terhadap orkid ini. Lebih-lebih lagi bunga orkid digunakan untuk pelbagai hiasan. Menurut statistik yang dikeluarkan oleh American Orchid Society, pada tahun 2002, urusan niaga orkid di Amerika berharga US\$106 juta (The American Society).

Sungguhpun orkid amat diminati di pasaran, namun orkid yang terdapat di pasaran masih mempunyai kualiti yang rendah dan kebanyakannya mudah terdedah terhadap serangan penyakit seperti pertumbuhan kulat pada batang pokok orkid. Serangan virus juga merupakan masalah terhadap pertumbuhan seperti kelemahan, proses pertumbuhan yang terbantut serta kecacatan. Infeksi virus juga akan menyebabkan perubahan bentuk batang pokok, daun, serta keguguran bunga yang belum matang. Tumbuhan yang telah dilemahkan akibat infeksi virus ini dipercayai

lebih mudah terdedah terhadap serangan penyakit dan serangga lain (The American Society).

Pelbagai kajian dijalankan untuk menghasilkan tumbuhan yang rintang terhadap penyakit dan berupaya mengalami pertumbuhan pada kadar yang cepat. Pada kebiasaannya gen yang paling kerap dipindahkan adalah gen yang mengkod rintangan terhadap herbisid, serangga perosak, patogen dan sebagainya. Ia adalah satu cara untuk mengubah genetik sesuatu tumbuhan secara *in-vitro*. Proses transformasi ini akan menyebabkan perubahan genotip dan fenotip terhadap sel perumah. Sekiranya ciri-ciri daripada DNA asing yang dipindahkan terhasil, maka proses transformasi telah berjaya (Karp, 1999).

Maka boleh dikatakan bidang hortikultur ini amat berpotensi terhadap pembangunan dan membantu ekonomi. Harganya yang memberangsangkan dan permintaan yang agak tinggi terhadap orkid yang berkualiti serta cantik merupakan punca utama pelbagai kajian terhadapnya dijalankan. Lebih-lebih lagi di kawasan Borneo terdapat ribuan spesies orkid yang berpotensi untuk dikaji dan dieksploitasikan sebagai bunga yang berharga baik di pasaran.

1.3 Tujuan kajian

Projek yang dijalankan ini adalah bertujuan untuk:

1. membangunkan satu sistem transformasi menggunakan *Agrobacterium* untuk orkid *Coelogyne* dengan menggunakan *Agrobacterium*.
2. melihat kesan acetosyringone terhadap sistem transformasi orkid *Coelogyne*.
3. menentukan tempoh ko-kultivasi yang sesuai untuk transformasi orkid *Coelogyne* menggunakan *Agrobacterium*.



BAB 2

ULASAN PERPUSTAKAAN

2.1 Orkid (*Coelogyne*)

Orkid merupakan kumpulan tumbuhan yang paling besar dan mempunyai pelbagai warna dalam famili tumbuhan berbunga. Bunga orkid mempunyai kelopak bunga yang berbeza saiz dan bentuk. Ia tidak boleh dibelah kepada dua bahagian yang mirip. Orkid adalah tumbuhan biseksual, iaitu stamen dan stigma terletak pada bunga yang sama. Terdapat pelbagai spesies orkid yang wujud di dunia ini. Lebih kurang 25,000 spesies telah dikenalpasti dan dijangka terdapat lebih daripada 30,000 spesies yang wujud. Orkid amat banyak didapati di kawasan tropikal yang lembap dan biasanya tergantung di atas pokok dan juga batu. Pertumbuhan orkid biasanya adalah pada altitud 4200 meter dari paras laut (Collier, 1994).



Coelogyne adalah daripada perkataan Greek *koilos gyne* bermaksud “lubang betina”. Genus ini banyak terdapat di Himalaya, China, Filipina, Malaysia, Indonesia, Papua New Guinea dan Kepulauan Pasifik. Ia adalah tumbuhan epifit yang mempunyai bunga yang besar, wangi, dan mempunyai pelbagai warna.



Foto 2.1 Benih meletup keluar dari buah orkid (Lewis *et al.*, 2002)

Orkid membiak dengan pembenihan. Benih orkid adalah amat halus dan amat banyak sekali. Ia amat sensitif ketika awal pertumbuhan dan amat mudah termusnah apabila keadaan persekitarannya berubah. Lagipun benih orkid amat mudah diserang fungi. Maka benih ini biasanya akan dikulturkan dalam agar yang steril dahulu sebelum dibangunkan menjadi orkid yang lebih sempurna. Kaedah ini diaplikasi daripada ahli bakteriologi untuk mendapatkan anak orkid yang sihat dan bebas daripada fungi.

2.2 Transformasi genetik tumbuhan

Bioteknologi menggunakan kaedah transformasi untuk menghasilkan tumbuhan yang mutan, iaitu tumbuhan yang mempunyai gen asing dalam genomnya. Pada masa kini terdapat lima kaedah transformasi; iaitu elektroporasi, porasi kimia, biolistik, suntikan mikro dan juga vektor biologi (contohnya *Agrobacterium spp*). Namun begitu transformasi tidak langsung lebih digemari (Fisk *et al.*, 1993). Ini adalah kerana kosnya adalah lebih rendah dan murah. Lagipun hasilnya adalah lebih stabil berbanding dengan transformasi langsung yang menggunakan senapang biolistik dan suntikan mikro.

Transformasi dengan menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* adalah satu kaedah transformasi yang tidak langsung. Strain *A. tumefaciens* akan diubahsuai dengan menyahaktifkan plasmid perangsang tumor dan memasukkan plasmid yang ingin dimasukkan ke dalam pokok orkid yang ingin ditransformkan. Sungguhpun begitu, terdapat kelemahan dengan menggunakan kaedah ini. Ini kerana transformasi *Agrobacterium* kurang berlaku ke atas tumbuhan monokotiledon.

2.3 Faktor yang mempengaruhi transformasi dengan menggunakan *Agrobacterium*

Seperti yang dinyatakan di atas, *Agrobacterium* biasanya hanya menginfeksi tumbuhan dikotiledon sahaja. Kebanyakan tumbuhan monokotiledon tidak akan menunjukkan kesan pertumbuhan “crown gall”. Namun begitu terdapat laporan yang menyatakan bahawa *Agrobacterium* telah berjaya digunakan untuk mentransformkan orkid *Phalaenopsis* (Belarmino *et al.*, 2000), orkid *Dendrobium* (Yu *et al.*, 2001) dan orkid *Oncidium* (Liau *et al.*, 2003).

Eksplan yang mempunyai sel yang membahagi dengan giat serta eksplan yang cedera akan merembeskan komponen fenolik untuk membantu pertumbuhan sel baru. Namun begitu, komponen fenolik ini juga berfungsi sebagai “pematik” *Agrobacterium* ke arahnya. Menurut Liau *et al.* (2003) transformasi *Agrobacterium* berjaya dilakukan ke atas orkid *Dendrobium* tanpa penambahan acetosyringone tetapi menurutnya lagi penambahan acetosyringone menambahkan keefisienan transformasi.

2.4 Transformasi tumbuhan menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*

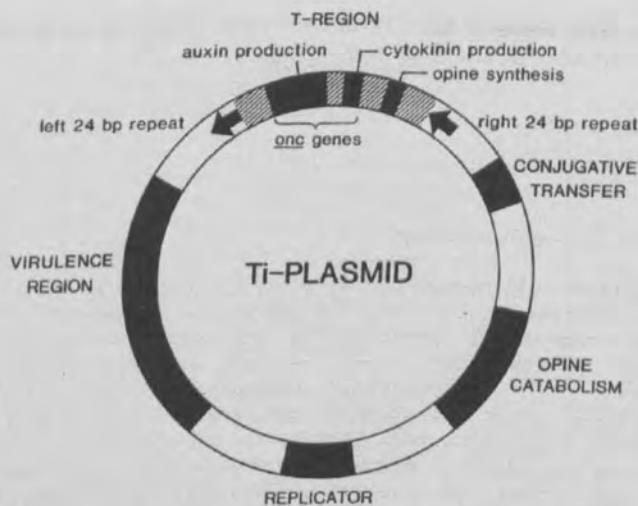
Agrobacterium ialah bakteria anaerobik, tidak berspora, Gram negatif, tidak berpigmen dan bergerak menggunakan 1-6 peritrichous flagella. Koloni *Agrobacterium* pula adalah berwarna putih ke kuning, cembung, bulat, licin dan menghasilkan banyak polisakarida extrasellular melekit pada media yang kaya dengan karbohidrat (Bradbury, 1986). Suhu optimum pertumbuhan adalah pada 25°C hingga 28°C.

Agrobacterium merupakan sejenis bakteria yang hidup di tanah dan biasanya akan menyerang bahagian luka tumbuhan dikotiledon dan menyebabkan pertumbuhan tumor atau akar rerambut (Murray, 1993). Semasa induksi tumor, *Agrobacterium* akan melekat pada tumbuhan dan memindahkan sebahagian plasmid induktif tumor ke bahagian dalam tumbuhan yang luka.

Bakteria ini ditemui oleh Smith dan Townsend (1907), penyakit bengkak yang menyerang pelbagai jenis tumbuhan, dan ia dinamakan sebagai *Bacteria tumefaciens*. Kemudian namanya ditukar kepada *Agrobacterium tumefaciens* oleh Conn pada 1942. Penyakit ini mendapat nama sempena dengan bentuk tumor besar yang terbentuk pada batang pokok yang terletak sedikit lebih tinggi dari paras tanah ("crown gall").

Serangan bacteria ini akan menyebabkan harga tumbuhan itu menjadi rendah dan tidak digemari walaupun ia biasanya tidak mendatangkan kerosakan yang serius terhadap pokok yang lebih tua. White dan Brown membuktikan bahawa walaupun *A. tumefaciens* diperlukan untuk induksi “crown gall”, tetapi setelah ia dimulakan, bacteria itu boleh dibuang dan diabaikan. Dengan kata lain, *Agrobacterium* hanya diperlukan pada awal sebagai infeksi sahaja.

Keunikan upaya *Agrobacterium tumefaciens* memindahkan gen menjadikanya digunakan sebagai vektor untuk membantu pembiakan tumbuhan. Sebarang gen yang ingin dimasukkan ke dalam tumbuhan, gen rintang herbisid atau gen tosik serangga, boleh diusahakan ke dalam DNA bakteria seterusnya memasukkannya ke dalam genom tumbuhan. Penggunaan *Agrobacterium* bukan sahaja memendekkan proses membiak konvensional, malah membolehkan seluruh gen baru dimasukkan ke dalam tanaman.



Rajah 2.1 Peta Genetik Octopine Plasmid Ti (Nester *et al.*, 1993)

Agrobacterium akan melekat pada sel orkid yang tercedera dan seterusnya memindahkan plasmid ke dalam tumbuhan pada bahagian luka orkid itu dengan induksi gen virulen (*vir*). T-DNA, yang dikelilingi oleh 24 pasangan base, dipindahkan ke dalam sel orkid, akan berintegrasi dengan nuklear DNA sel orkid dan dieskpres di dalam genom nuklear sel itu (Nester *et al.*, 1993).

Bahagian gen *vir* akan menentukan sistem dari T-DNA untuk dipindahkan ke dalam sel orkid. Kedua-dua bahagian *vir* dan bahagian T mengandungi gen yang menentukan hos tumbuhan yang akan membentuk tumor. Terdapat banyak strain yang membawa plasmid Ti (plasmid induktif tumor) yang berupaya untuk mentransformkan sel normal kepada sel yang membiak dan menjadi "crown gall". Terdapat juga strain yang membawa plasmid Ri (plamid induktif akar) yang memulakan penyakit akar rerambut. Agen pembawa penyakit "crown gall" semuanya dibawa oleh *A. tumefaciens*, manakala agen pembawa penyakit akar rerambut pula dibawa oleh *A. rhizogenes*.

RUJUKAN

- Belarmino M. M., Mii, M., 2000. *Agrobacterium*-mediated Genetic Transformation Of A *Phalaenopsis* Orchid. *Plant Cell Rep* **19**, 435-422.
- Bhojwani, S. S., Razdan, M.K., 1983. *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*, Elsevier Science Publishers, The Netherlands.
- Bradbury, J. F., 1986. *Guide To Plant Pathogenic Bacteria*. C. A .B International, United Kingdom. 6
- Collins' Encyclopedia* **18**. 1994. P.F Collier and Son Ltd, Canada.
- David R. Murray., 1991. *Advanced Methods in Plant Breeding and Biotechnology*, C.A.B International, United Kingdom. 50-66.
- Dommissie, E. M., Conner, A. J., 1989. *Monocotyledonous Plants As Host For Agrobacterium*. Australian Society of Plant Physiologist, 29th Annual Meeting, Abstract 36.
- Dommissie, E. M., Leung, D. W. M., Shaw, M. L., Conner, A. J., 1990. Onion Is A Monocotyledonous Host For *Agrobacterium*. *Plant Science* **69**, 249-257.



Fisk, H. J., Danker, A. M., 1993. The Introduction And Expression Of Transgenes In Plants. *Sci. Hort* **55**, 5-36.

Hodson, M., Paine, R., Anderson, N., 1991, *Letts Guide To Orchids Of The World*, Collin, Angus and Robertson Publisher Pty Ltd, Australia.

Henry, R. J., Ronalds, J. A., 1994. *Improvement of Cereal Qualityby Genetic Engineering*, Plenum Press, New York.

Karp, G, 1992, *Cell and Molecular Biology*. Ed ke-2. Jojn Wiley and Son, Canada. 811-813.

Kjellsson, G., Simonsea, V., Ammann, K., 1997. *Methods for Risk Assessment of Transgenic Plants*, Birkhäuser Verlag, Switzerland.

Lewis, R., Gaffin, D., Hoefnagels, M., Parker, B., 2002. *Life*. Ed ke-4. McGraw-Hill, New York. 553

Liau, C. H., You, S. J., V.Prasad, Hsiao, H, H., Lu, J. C., Yang, N. S., Chan, M. T., 2003. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated Transformation Of An *Oncidium* Orchid.

<http://link.springer.de/link/service/journals/00299/contents/03/00614/paper/s00299-003-0614-9ch110.html>



- Lindsey, K., Jones, M.G.K., 1989. *Plant Biotechnology in Agriculture*, Wiley Publisher, England.
- Nester, E. W., Verma, D. P. S., 1993. *Advances In Molecular genetics Of Plant Microbe Interactions*, Netherland. 37-49.
- Olsen, F. L., 1991. Isolation And Cultivation Of Embryogenic Microspores From Barley (*Hordeum vulgae* L.). *Hereditas* **115**. 255-266.
- Oparka, K. J., Murphy, R., Derrick, P. M., Prior, D. A. M., Smith, J. A. C, 1991. Modification of The Pressure-probe Technique Permits Controlled Intracellular Microinjection Of Fluorescent Probes. *J. Cell Sci* **98**. 539-544.
- Suseelan, K.N., Bhagwat, A., Mathews, H., Bhatia, C. R., 1987. *Agrobacterium tumefaciens* – Induced Tumour Formation on Some Tropical Dicot And Monocot Plants. *Current Science* **56**, 888-889.
- The American Orchid Society, 2002. *Orchid Popularity Still "Growing" In US*.
<http://www.orchidweb.org/usda2002.html>

Yu, H., Yang, S. H., Goh, C. J., 2001. *Agrobacterium*-mediated Transformation Of A
Dendrobium Orchid With The Class 1 *Knox* gene *DOH 1*.
<http://link.springer.de/link/service/journals/00299/contents/01/00334/paper//s002990100334ch110.html>

