**PENGEMBANGAN MODEL PEMBELAJARAN *SOCIOSCIENTIFIC REAL WORLD APPLICATION* UNTUK MENINGKATKAN KETERAMPILAN BERARGUMENTASI DAN MEMECAHAN MASALAH PADA PEMBELAJARAN BIOLOGI BERBASIS KASUS**

**PROPOSAL DISERTASI**

**Disusun untuk memenuhi Sebagian Persyaratan Mencapai Derajat Doktor**

**Program Studi Doktor Pendidikan IPA**

****

**Oleh**

**Anwari Adi Nugroho**

**T851908002**

**FAKULTAS KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN**

**UNIVERSITAS SEBELAS MARET**

**SURAKARTA**

**2020**

**SUBSTANSI MATERI TANAMAN TRANSGENIK**

Anwari Adi Nugroho

Program Studi Doktor Pendidikan IPA, Universitas Sebelas Maret

Pada disertasi ini, substansi materi yang diangkat adalah materi biologi diperguruan tinggi (pendidikan biologi) yang mengandung konten materi berbasis kasus dan dikemas dalam topik/ isu sosiosaintifik. Salah satu materi yang digunakan adalah bioteknologi. Materi bioteknologi seperti rekayasa genetika (transgenik dan kloning). Topik rekayasa genetika merupakan topik yang *uptodate* (terkini) yang mengandung unsur kontroversi (memicu perdebatan), tidak terstruktur dan komplek sehingga sesuai dengan karakteristik isu sosiosaintifik. Rekayasa genetika merupakan dasar dari bioteknologi yang di dalamnya meliputi manipulasi gen, kloning gen, DNA rekombinan, teknologi modifikasi genetik, dan genetika modern dengan menggunakan prosedur identifikasi, replikasi, modifikasi dan transfer materi genetik dari sel, jaringan, maupun organ. Salah satu bentuk aplikasi rekayasa genetika dalam tumnbuhan yaitu produksi tanaman transgenik.

Tabel 1. Daftar Artikel Jurnal Internasional Bereputasi Tentang *Agrobacterium tumifaciens* dan Tanaman Transgenik

| No | Judul Artikel | Jurnal | Tahun | Sumber |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | Efficient method of seed transformation via Agrobacterium tumefaciens for obtaining transgenic plants of Hibiscus cannabinus L. | Industrial Crops & Products | 2018 | (Hanana et al., 2018) |
| 2 | Optimization of *Agrobacterium tumefaciens*-MediatedTransformation Systems in Tea Plant (*Camellia sinensis*) | Horticultural Plant Journal | 2017 | (LV et al., 2017) |
| 3 | Research Progress on *Agrobacterium tumefaciens* -based Transgenic Technology in *Brassica rapa* | Horticultural Plant Journal | 2018 | (LI et al., 2018) |
| 4 | Improved protocol for Agrobacterium mediated transformation of tomato and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic gene CsZCD | Scientia Horticulturae | 2007 | (Qiu, Diretto, Tavarza, & Giuliano, 2007) |
| 5 | Generation of transgenic watermelon resistance to Cucumber mosaicvirus facilitated by an effective Agrobacterium mediatedtransformation method | Scientia Horticulturae | 2015 | (Liu, Gu, Ijaz, Zhang, & Ye, 2016) |
| 6 | An efficient method for the production of transgenic plants of peanut (*Arachis hypogaea* L.) through *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation | Plant Science | 2000 | (Sharma & Anjaiah, 2000) |
| 7 | Agrobacterium-mediated genetic transformation of pigeon pea (Cajanus cajan (L.) Millsp.) using embryonal segments and development of transgenic plants for resistance against Spodoptera | Plant Science | 2005 | (Surekha et al., 2005) |
| 8 | Efficient production of transgenic potato (S. tuberosum L. ssp. andigena) plants via Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation | Plant Science | 2006 | (Banerjee, Prat, & Hannapel, 2006) |
| 9 | Production of transgenic plants of the Liliaceous ornamental plant *Agapanthus praecox* ssp. *orientalis* (Leighton) Leighton via *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic calli | Plant Science | 2001 | (WU et al., 2006) |
| 10 | Production of Transgenic Tall Fescue Plants with Enhanced Stress Tolerances by *Agrobacterium tumefaciens-* Med iat ed Transformation | Agricultural Sciences in China | 2006 | (Suzuki, Supaibulwatana, Mii, & Nakano, 2001) |
| 11 | Transgenic plants: Types, benefits, public concerns and future | journal of pha rmacy research | 2013 | (Jhansi Rani & Usha, 2013) |
| 12 | Improving drought-, salinity-, and heat-tolerance in transgenic plants by cooverexpressing Arabidopsis vacuolar pyrophosphatase gene AVP1 and Larrea Rubisco activase gene RCA | Plant Science | 2020 | (Wijewardene et al., 2020) |
| 13 | Characterization of AhLea-3 and its enhancement of salt tolerance intransgenic peanut plants | Electronic Journal of Biotechnology | 2021 | (Qiao et al., 2020) |
| 14 | Expression of the Galanthus nivalis agglutinin (GNA) gene intransgenic potato plants confers resistance to aphids | C. R. Biologies | 2017 | (Mi et al., 2017) |
| 15 | Overexpression of *StCYS1* gene enhances tolerance to salt stress in the transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) plant | Journal of Integrative Agriculture | 2020 | (LIU et al., 2020) |
| 16 | Enhanced tolerance of the transgenic potato plants overexpressing Cu/Zn superoxide dismutase to low temperature | Scientia Horticulturae | 2020 | (Che et al., 2020) |

**REVIU ARTIKEL JURNAL**

1. **Efficient method of seed transformation via Agrobacterium tumefaciens for obtaining transgenic plants of Hibiscus cannabinus L**

Metode transformasi benih yang efisien melalui Agrobacterium tumefaciens untuk memperoleh tanaman transgenik Hibiscus cannabinus L.

Kenaf (*Hibiscus cannabinus L*.) merupakan tanaman serat dari famili Malvaceae yang kebanyakan tumbuh di daerah tropis Asia dan Afrika. Kanal memiliki potensi besar dalam pembuatan kertas, media penyerapan dan pakan ternak. Serat tanaman kenaf sangat bergantung pada kondisi lngkungan seperti kekeringan dan salinitis. Apabila kondisi lingkungan tidak mendukung maka hasil serat tidak maksimal. Solusi untuk mengatasi permasalahan tersebut adalah dengan rekayasa genetika untuk memproduksi tanaman kenaf yang toleransi terhadap cekaman lingkungan. Gen yang digunakan yautu gen kandidat faktor transkripsi VvWRKY2 dengan media transformasi genetik *Agrobacterium tumifaciens.*

Plasmid vektor yang digunakan adalah plasmid pGreen-VvWRKY2 dimobilisasi ke dalam Agrobacterium tumefaciens (strain GV3010) dengan elektroporasi.



Gambar. Konstruksi Genetik of the plasmid pGreen-VvWRKY2

 *Pengaruh asetosyringone pada efisiensi transformasi genetik*. Acetosyringone dikenal untuk mengaktifkan gen virulensi Agrobacterium tumefaciens, sehingga memicu tahapan berbeda yang mengarah pada transfer informasi genetik ke sel tumbuhan target. asetosyringone meningkatkan efisiensi transformasi secara signifikan. Konsentrasi 100 μM asetosyringone meningkatkan efisiensi transformasi secara signifikan dengan 72% kapasitas perkecambahan benih transgenik putatif. Kotiledon hijau tertinggi bibit diperoleh dari eksplan yang diberi 100 μM acetosyringone. transformasi genetik telah mempengaruhi perkecambahan benih dan variabilitas kapasitas perkecambahan, dan efisiensi transformasi genetik berkaitan dengan parameter yang berbeda seperti adanya kelebihan Agrobakterium dalam medium, konsentrasi asetosiringon yang rendah atau lebih tinggi untuk mengaktifkan gen virulensi bakteri dan penggunaan antibiotik selektif yang dapat menghambat perkecambahan dan pertumbuhan tanaman.

 *Konfirmasi tanaman transgenik melalui amplifikasi PCR*. Hasil amplifikasi PCR multipel ditunjukkan pada gen P35S dan VvWRKY2 terdeteksi adanya pita yang sesuai dengan ukuran transgen VvWRKY2 (1,6 Kb).

 *Pemilihan transforman tahan kanamisin*. Eksplan untuk transforman tahan kanamisin dapat mengakumulasi klorofil dan terus tumbuh secara normal. Namun, non-transforman gagal mengakumulasi klorofil dan tetap pucat, dengan kotiledon tertutup atau tidak terekspansi. Adanya seleksi kanamisin menghasilkan transforman hijau yang mudah dibedakan dari non-transforman kuning pada medium yang mengandung kanamisin.

 Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa tanaman kenaf transgenik dapat diperoleh dengan transformasi yang dimediasi Agrobacterium, dan stabilitas transgen dikonfirmasi untuk generasi F0 sehingga perlu dilakukan konfirmasi pada generasi lainnya.

1. **Optimization of *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation Systems in Tea Plant (*Camellia sinensis*).**

Optimasi Sistem Transformasi yang Dimediasi Agrobacterium tumefaciens di Pabrik Teh (Camellia sinensis).

 Tanaman teh [Camellia sinensis (L.) O. Kuntze] adalah salah satu tanaman kayu abadi dari keluarga Theaceae, yang juga merupakan salah satu dari tiga tanaman minuman utama dunia. Untuk mempromosikan studi pemuliaan genetik tanaman teh dan meningkatkan laju penggunaan teh, manusia menggunakan bioteknologi untuk mengubah gen yang bermanfaat bagi kesehatan manusia serta dengan ekspresi yang efektif pada tanaman teh, atau menghambat ekspresi gen yang merugikan dalam teh. Saat ini terdapat banyak jenis transformasi genetik, seperti transformasi gen yang dimediasi Agrobacterium tumefaciens.

 *Pengaruh waktu infeksi terhadap rasio transformasi kalus*. bertambahnya waktu infeksi, rasio transformasi kotiledon kalus C. sinensis meningkat pada awalnya dan kemudian menurun, terlihat pada saat infeksi kalus 5 menit, rasio transformasi minimal yaitu hanya 9,3. %, sedangkan puncak rasio transformasi mencapai maksimum 46,7%, dengan waktu infeksi 15 menit. Selanjutnya, dengan waktu infeksi, rasio transformasi terus menurun dan rasio transformasi berkurang menjadi 15,9% saat terinfeksi selama 30 menit.

 *Pengaruh waktu kultur rasio transformasi kalus*. rasio transformasi kalus kotiledon meningkat terlebih dahulu dan kemudian menurun dengan bertambahnya waktu kokultur.

 *Pengaruh medium kultur terhadap rasio transformasi kalus*. Media co-culture juga merupakan salah satu faktor terpenting yang mempengaruhi rasio transformasi dalam co-culture. Kedua jenis media kultur sangat mempengaruhi rasio transformasi kalus

 *Pengaruh konsentrasi AS terhadap rasio transformasi kalus*. AS adalah penginduksi aktivasi umum untuk gen Agrobacterium di wilayah Vir.

 Sistem transformasi genetik yang dioptimalkan, dengan rasio puncak transformasi sebesar 46,7%. Meskipun ada beberapa perbaikan, transformasi yang dimediasi A. tumefaciens masih dibatasi oleh beberapa faktor yang tidak pasti.

1. **Research Progress on *Agrobacterium tumefaciens* -based Transgenic Technology in *Brassica rapa*** *.*

Kemajuan Penelitian Teknologi Transgenik Berbasis Agrobacterium tumefaciens di Brassica rapa

 Meskipun hibridisasi jauh telah digunakan untuk memperkenalkan beberapa karakteristik yang sangat baik pada tanaman Brassica, proses ini sangat memakan waktu dan tenaga. Gen seperti yang bertanggung jawab atas virus mosaik lobak (TuMV), penyakit akar gada dan jamur berbulu halus serta warna ungu dapat dimasukkan ke dalam galur bawaan berkualitas tinggi oleh pemulia menggunakan teknologi transgenik. 

Gambar. Diagram proses transformasi dengan Agrobacterium tumefaciens

Analisis proses transgenik berbasis Agrobacterium tumefaciens di Brassica rapa.

 Faktor penting untuk proses transformasi di Brassica rapa. Dari tiga strain Agrobacterium tumefaciens yang diuji (C58C1, EHA105 dan LBA4404), hasil terbaik telah diperoleh dengan menggunakan strain LBA4404. Agrobacterium rhizogenes juga telah digunakan untuk transformasi Brassica, tetapi tanaman yang diproduksi dengan bakteri ini sering menunjukkan kelainan morfologi. Eksplan hipokotil yang telah dibudidayakan diubah dengan Agrobacterium yang tersuspensi dalam media infeksi MS cair selama 30 menit dan kemudian dipindahkan ke kertas blotting autoklaf steril untuk menghilangkan kelebihan Agrobacterium. Meningkatkan waktu infeksi menjadi lebih dari 35 menit menyebabkan jaringan target menjadi cokelat dan menurunkan vitalitas tanaman. waktu ko-kultivasi ∼3 hari telah diamati untuk meningkatkan efisiensi transformasi. dan ko-kultivasi dalam kondisi gelap meningkatkan frekuensi transformasi B. Napus. Media MS yang mengandung NAA (3,0 mg · L-1) dan benzil amino purin (BAP; 4,0 mg · L-1) dianggap cocok untuk induksi kalus. Setelah 5 minggu, hanya 8 dari 215 kalus tahan higromisin yang beregenerasi dari eksplan, menghasilkan efisiensi transformasi 3,7%.

 Induksi pembentukan pucuk. AgNO 3 telah rutin digunakan untuk meningkatkan regenerasi tunas tanaman Brassica yang dibudidayakan secara in vitro. Dibandingkan dengan spesies Brassica lainnya, B. rapa adalah spesies yang paling sulit diubah. Dengan memasukkan konsentrasi AgNO 3 yang tinggi dalam media regenerasi, Regenerasi pucuk dari kotiledon, hipokotil, ruas batang dan eksplan lainnya bervariasi, yang menunjukkan bahwa jenis eksplan berpengaruh signifikan terhadap frekuensi regenerasi. Faktor-faktor lain selain jenis eksplan dan usia yang memiliki efek besar pada regenerasi tunas termasuk fitohormon, penghambat etilen (AgNO 3 dan Ag 2 S 2 O 3), amino etoksivinilglisin dan prolin.

 Induksi pembentukan akar. Tidak ada perbedaan dalam perakaran yang ditemukan antara media MS dan media MS yang mengandung hormon perakaran (asam indole-3-butirat dan asam indole-3-asetat). Setelah 3 minggu pembiakan, tanaman yang berakar dapat dipindahkan ke tanah. Kira-kira 2 minggu kemudian, tanaman yang tahan higromisin dapat dipilih.

 Konfirmasi tanaman transgenik. PCR, strategi yang paling umum digunakan untuk mendeteksi tanaman transgenik, adalah efisien; namun, metode ini tidak dapat diterapkan sampai tanaman memiliki tiga daun atau lebih, yang membutuhkan waktu yang cukup lama.

1. **Improved protocol for Agrobacterium mediated transformation of tomato and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic gene CsZCD**.

Peningkatan protokol untuk transformasi yang dimediasi oleh Agrobacterium dari tomat dan produksi tanaman transgenik yang mengandung gen biosintetik karotenoid CsZCD

 Tomat (Lycopersicon esculentum) merupakan salah satu tanaman sayuran terpenting dan model genetik untuk memperbaiki tanaman tanaman dikotil lainnya. Pengembangan metode transformasi tomat yang efisien sangat penting. Terlepas dari keberhasilan transformasi tomat ini, sebagian besar prosedur bergantung pada lapisan feeder yang tidak praktis (petunia, tomat, atau tembakau), formulasi media yang memakan waktu, atau subkultur yang berurutan. Tidak ada prosedur umum yang sederhana untuk transformasi tomat. Tomat sangat diminati karena variasi jalur biosintetik karotenoid dapat dengan mudah diamati dengan akumulasi berbagai zat antara biosintetik karotenoid. Kode CsZCD untuk enzim kromoplast yang memulai biogenesis tiga turunan karotenoid utama — crocetin glikosida, pikrokin, dan safranal.

 Enam sampai delapan minggu setelah inokulasi pada media dengan kanamisin dan karabenisilin, tunas terpilih beregenerasi dari permukaan potongan eksplan, dan ini terutama merupakan regeneran yang telah ditransformasikan. CsZCD memiliki efisiensi transformasi yang lebih rendah pada tomat Micro-Tom daripada b-LCY. Jumlah sel Agrobacterium dalam inokulum dianggap sebagai faktor efisiensi transformasi. Tunas dipisahkan dari eksplan induk dan diinduksi ke akar selama sekitar 2-3 minggu yang merupakan transforman utama. Transforman ini dikonfirmasi dengan analisis PCR. DNA genom dari 13 tanaman tomat yang dipilih secara acak dilakukan dengan PCR untuk mengetahui keberadaan gen yang dimasukkan. Semua transforman ini menunjukkan pita yang diprediksi untuk gen CsZCD.

 Sekuen transformasi menggunakan eksplan yang dikultur selama 1 hari pada medium dengan zeatin 2 mg / L, IAA 0,1 mg / L, direndam secara hati-hati dalam inokulum Agrobacterium dengan OD600 = 0,2 selama 20 menit, kemudian dikulturkan dengan agrobacterium selama 3 hari pada waktu yang sama. medium, diikuti dengan transfer ke medium yang sama dengan 500 mg / L cefotaxin selama 3 hari dan kemudian dengan transfer ke medium yang sama dengan 100 mg / L L kanamycin dan 500 mg / L carabenillin selama 6–8 minggu dan menghasilkan efisiensi transformasi lebih dari 20%. Metode transformasi ini sederhana, dapat diulang, tidak memerlukan lapisan pengumpan dan dapat menjadi cara umum untuk mengubah tomat.

1. **Generation of transgenic watermelon resistance to Cucumber mosaicvirus facilitated by an effective Agrobacterium mediatedtransformation method**

Generasi ketahanan semangka transgenik terhadap Cucumber mosaicvirus difasilitasi oleh metode transformasi yang dimediasi Agrobacterium yang efektif.

 Semangka (Citrullus lanatus Thunb.) Adalah tanaman musim panas yang penting di seluruh dunia dan rentan terhadap beberapa infeksi virus, seperti Virus mosaik mentimun (CMV), virus mosaik kuning Zucchini (ZYMV), virus mosaik semangka (WMV), dan virus mosaik bintik hijau Ketimun ( CGMMV). CMV, sejenis spesies dari genus Cucumovirus, famili Bromoviridae, adalah virus RNA sensifikan dengan genom tripartit.

 *Respon eksplan terhadap konsentrasi Fe-EDTA yang berbeda dalam media MS*. Fe-EDTA adalah komponen kunci dalam media MS karena memasok besi untuk pertumbuhan dan perkembangan tanaman. anpa suplai Fe-EDTA, kotiledon menjadi agak coklat dan kehilangan kekuatannya saat dikultur. penyediaan konsentrasi Fe-EDTA yang optimal penting untuk regenerasi pucuk semangka.

 *Pengaruh waktu prekultur dan kokultur pada transformasi semangka*. waktu prekultur yang optimal penting untuk transformasi semangka, waktu prekultur yang lebih pendek dan lebih lama secara signifikan akan menekan regenerasi tunas yang menguntungkan dalam transformasi semangka. Waktu pra-budidaya dan masa kultur dapat secara signifikan mempengaruhi frekuensi regenerasi tunas adventif selama transformasi semangka. hkan ke dalam gelas plastik berisi vermikulit untuk menyesuaikan diri.

 *Regenerasi tanaman semangka transgenik*. Lebih dari 60 planlet tahan kanamisin diperoleh setelah aklimatisasi. Pada saat tanam, planlet ini sangat sulit dipulihkan karena akarnya yang lemah. Pencangkokan dilakukan untuk mengatasi masalah ini. Planlet hasil cangkok tumbuh dengan baik, mirip dengan semangka normal (Gambar 2D). Tujuh belas planlet yang tahan terhadap kanamisin ditemukan melalui pencangkokan dan pengakaran sendiri.

 *Konfirmasi transgen pada tanaman semangka transgenik putatif.* Tujuh belas individu pucuk semangka tahan kanamisin ditemukan, tetapi hanya tujuh dari mereka yang berhasil mendapatkan bibit generasi T1 karena kesulitan teknik penyerbukan sendiri dari galur semangka transgenik. Untuk memastikan bahwa gen target dipindahkan ke tanaman semangka trans-genik yang diduga, dilakukan uji PCR dengan primer spesifik-fragmen NPTII. Hasil pengujian menunjukkan bahwa hanya tiga dari tujuh garis yang memiliki produk PCR 500 bp dari gen NPTII yang diharapkan. gen target berhasil diintegrasikan ke dalam genom garis,

 *Evaluasi resistensi virus pada semangka transgenik*. Resistensi CMV dari ketiga baris ini dievaluasi dengan inokulasi mekanis dari strain CMV dengan tanaman generasi T1. CMV dapat dideteksi pada garis transgenik tetapi tidak pada garis transgenik.

1. **An efficient method for the production of transgenic plants of peanut (*Arachis hypogaea* L.) through *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation**.

(Metode yang efisien untuk produksi tanaman transgenik kacang tanah (Arachis hypogaea L.) melalui transformasi genetik yang dimediasi oleh Agrobacterium tumefaciens)

 Kacang tanah (Arachis hypogaea L.) adalah tanaman kaya minyak dan protein yang penting secara ekonomi, yang bijinya mengandung sekitar 43% minyak dan 25% protein yang berdampak signifikan di daerah tropis dan sub-tropis di Asia, Afrika, dan Utara dan Amerika Selatan. Protokol transformasi yang dilaporkan di sini adalah awalnya dioptimalkan dengan menggunakan gen penanda (nptII; uidA) dan kemudian digunakan untuk transformasi dengan gen protein mantel dari virus rumpun kacang India (IPCVcp) untuk menginduksi resistensi terhadap virus ini. Virus rumpun kacang tanah India (IPCV; Pecluvirus) tersebar luas di India, di mana ia menyebabkan penyakit rumpun pada tanaman kacang tanah. Studi ini menjelaskan protokol regenerasi yang efisien dari beberapa tunas tunas adventif dari eksplan kotiledon kacang tanah dan produksi tanaman transgenik subur dengan transformasi yang dimediasi A. Tumefaciens.

 Metode yang dilaporkan di sini adalah peningkatan yang signifikan dibandingkan hasil yang dilaporkan sebelumnya pada transformasi kacang tanah di mana setidaknya 55% dari eksplan yang diberi perlakuan menghasilkan satu atau lebih pucuk yang ditransformasikan secara independen. Nilai transformasi tanaman yang dimediasi Agrobakterium diukur terutama dengan jumlah tanaman yang ditransformasikan secara mandiri yang membawa gen yang diinginkan per eksplan yang digunakan. Prosedur transformasi yang menggunakan eksplan kotiledon yang dilaporkan di sini sangat rentan terhadap transfer gen yang dimediasi oleh Agrobacterium dan juga menunjukkan tingkat regenerasi yang sangat tinggi di berbagai varietas A. hypogaea, seringkali dengan banyak tunas yang ditransformasikan secara independen per eksplan.

 Eksplan kotiledon telah terbukti menjadi eksplan yang sangat baik untuk transformasi dan regenerasi tanaman subur tahap awal penyaringan. Dalam penelitian ini juga, seleksi kanamisin bermanfaat dalam memproduksi tanaman transgenik dari eksplan kotiledon bila diterapkan setelah 2 minggu kokultivasi. Kesimpulannya, sistem regenerasi kotiledon terbukti menjadi sarana yang sangat baik untuk produksi sejumlah besar tanaman kacang tanah transgenik dalam waktu yang relatif singkat. Selain itu, eksplan ini memungkinkan transformasi yang dimediasi Agrobacterium untuk ditargetkan ke jaringan kompeten regenerasi.

1. **Efficient production of transgenic potato (S. tuberosum L. ssp. andigena) plants via Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation.**

Produksi tanaman kentang transgenik (S. tuberosum L. ssp. Andigena) yang efisien melalui transformasi yang dimediasi oleh Agrobacterium tumefaciens

 Kentang merupakan tanaman sasaran penting untuk aplikasi bioteknologi dan merupakan sistem model yang berharga untuk mempelajari proses pensinyalan. Transformasi yang efisien sangat penting untuk analisis genetik yang cepat. Produksi pucuk kentang transgenik dalam waktu 4 minggu sejak inokulasi awal eksplan daun oleh Agrobacterium tumefaciens telah dilakukan dengan subspesies Solanum tuberosum andigena. Untuk menghasilkan kalus dari eksplan daun dalam waktu 7 hari, media basal dilengkapi dengan konsentrasi benzyl-aminopurine dan asam asetat napthalene yang dioptimalkan. Inkubasi pada media basal ditambah dengan kombinasi zeatin ribosida, asam asetat napthalene, dan asam giberelat menginduksi pembentukan tunas dari kalus setelah inkubasi selama 28 hari. Dalam protokol yang ditingkatkan ini, pra-kultur eksplan dengan media nutrisi yang biasa digunakan dihilangkan dan media inokulasi Agrobacterium tidak dilengkapi dengan fitohormon. Induksi akar dari pucuk yang ditransformasikan dapat dicapai dalam media basal bebas hormon yang dilengkapi dengan kanamisin. Pembentukan akar yang normal dan sehat diamati dalam 5 hari dan 91% dari tunas terpilih berakar pada kanamisin. Dengan menggunakan analisis RT-PCR dengan primer spesifik gen, semua tunas berakar dari 20 tunas yang dipilih dari lima garis berbeda menunjukkan ekspresi transgen StBEL5 panjang penuh yang digerakkan oleh promotor CaMV 35S. Protokol yang dijelaskan di sini sederhana, efisien, dan menghasilkan tunas transgenik hanya dalam 4 minggu setelah inokulasi dengan Agrobacterium.

1. **Transgenic plants: Types, benefits, public concerns and future.**

 Tumbuhan transgenik adalah tumbuhan yang DNA-nya dimodifikasi menggunakan teknik rekayasa genetika. Tujuannya adalah untuk memperkenalkan sifat baru pada tumbuhan yang tidak terdapat secara alami pada spesies tersebut. Urutan gen yang disisipkan dikenal sebagai transgen, mungkin berasal dari tumbuhan yang tidak terkait atau dari spesies yang sama sekali berbeda. Tanaman transgenik pertama dilaporkan pada tahun 1983. Sejak saat itu, banyak protein rekombinan telah diekspresikan di beberapa spesies tanaman agronomi penting termasuk tembakau, jagung, tomat, kentang, pisang, alfalfa dan kanola.

 Sebagian besar tanaman yang dimodifikasi secara genetik dihasilkan dengan metode biolistik (metode pistol partikel) atau dengan metode transformasi yang dimediasi oleh Agrobacterium tumefaciens. penggunaan bakteri penghuni tanah, yang dikenal sebagai Agrobacterium tumefaciens. Ia memiliki kemampuan untuk menginfeksi sel tumbuhan dengan sepotong DNA-nya. Sepotong DNA, yang menginfeksi tumbuhan, diintegrasikan ke dalam kromosom tumbuhan, melalui plasmid penginduksi tumor (Ti plasmid). Plasmid Ti dapat mengontrol mesin seluler tanaman dan menggunakannya untuk membuat banyak salinan DNA bakterinya sendiri. Plasmid Ti adalah partikel DNA melingkar besar yang bereplikasi secara independen dari kromosom bakteri. "Agrobacterium" mampu mentransfer fragmen besar DNA dengan sangat efisien. Salah satu keterbatasan terbesar Agrobacterium adalah tidak semua tanaman pangan penting dapat terinfeksi oleh bakteri ini.

 Keuntungan tanaman transgenik. 1) tanaman tahan herbisida, 2) Tanaman resisten serangga, 3) tanaman resisten virus, 4) tanaman resisten hama, 5) tanaman kaya nutrisi, 6) pemanfaatan lahan marginal, 7) mengurangi dampak lingkunagan, 8) meningkatkan produksi dan menghemat biaya.

1. **Production of transgenic plants of the Liliaceous ornamental plant *Agapanthus praecox* ssp. *orientalis* (Leighton) Leighton via *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic** **calli.**

Produksi tanaman transgenik dari tanaman hias Liliaceous Agapanthus praecox ssp. orientalis (Leighton) Leighton melalui transformasi yang dimediasi oleh Agrobacterium dari kalus embriogenik.

 Sebuah sistem untuk memproduksi tanaman transgenik dikembangkan untuk Liliaceous hias Agapanthus praecox ssp. orientalis (Leighton) Leighton melalui transformasi genetik yang dimediasi Agrobacterium. Kalus embriogenik yang berasal dari daun diinokulasi dengan A. tumefaciens strain EHA101 / pIG121Hm atau LBA4404 / pTOK233, keduanya mengandung vektor biner pembawa neomycin phosphotransferase II (NPTII), hygromycin phosphotransferase (HPT) dan intron-contains glukuronidase (GUS-intronidase). ) gen di wilayah T-DNA. Strain agrobakterium, masa ko-kultivasi dan perlakuan asetosiringon (AS) selama ko kultivasi mempengaruhi jumlah galur kalus Hygr yang dihasilkan: Embrio somatik yang diperoleh berkembang menjadi planlet lengkap setelah dipindahkan ke media tanpa PIC dan antibiotik. Semuanya diverifikasi sebagai transforman stabil dengan uji histokimia GUS, analisis PCR dan Southern blot.

1. **Agrobacterium-mediated genetic transformation of pigeon pea (Cajanus cajan (L.) Millsp.) using embryonal segments and development of transgenic plants for resistance against Spodoptera**

Transformasi genetik pigeon pea yang dimediasi agrobakterium (Cajanus cajan (L.) Millsp.) Menggunakan segmen embrional dan pengembangan tanaman transgenik untuk ketahanan terhadap Spodoptera.

 Transformasi yang efisien dari segmen embrional kacang merpati (Cajanus cajan (L.) Millsp.) Diperoleh dengan menggunakan Agrobacterium tumefaciens strain GV2260 yang menyimpan vektor biner pPK202 termodifikasi yang membawa gen penanda neomisin fosfotransferase II (npt II) dan gen cry I EC sintetis di bawah promotor konstitutif 35 S. Integrasi T-DNA ke dalam genom inti tanaman yang ditransformasikan dan transmisi seksualnya ke keturunan tanaman transgenik dikonfirmasi dengan amplifikasi PCR dari fragmen 700 bp npt II dan analisis hibridisasi Southern blot menggunakan fragmen npt II yang diperkuat PCR sebagai probe. Bioassay serangga in vitro menggunakan larva Spodoptera litura tahap instar pertama dan kedua pada tanaman T1 dan T2 menunjukkan bahwa ekspresi tangisan sintetis I E-C pada tanaman kacang merpati transgenik memberikan perlindungan terhadap larva serangga. Analisis barat menunjukkan pita 71,5 kDa yang mengkonfirmasi keberadaan protein cry I E-C di tanaman transgenik T1 dan T2. Protokol ini memungkinkan transformasi yang efektif dan regenerasi cepat tanaman transgenik tahan serangga kacang polong.

**RANGKUMAN HASIL REVIU ARTIKEL TANAMAN TRANSGENIK**

**(SUBSTANSI MATERI)**

1. **Pendahuluan**

 Tumbuhan transgenik adalah tumbuhan yang DNA-nya dimodifikasi menggunakan teknik rekayasa genetika. Tujuannya adalah untuk memperkenalkan sifat baru pada tumbuhan yang tidak terdapat secara alami pada spesies tersebut. Urutan gen yang disisipkan dikenal sebagai transgen, mungkin berasal dari tumbuhan yang tidak terkait atau dari spesies yang sama sekali berbeda. Tanaman transgenik pertama dilaporkan pada tahun 1983. Sejak saat itu, banyak protein rekombinan telah diekspresikan di beberapa spesies tanaman agronomi penting termasuk tembakau, jagung, tomat, kentang, pisang, alfalfa dan kanola.

 Sebagian besar tanaman yang dimodifikasi secara genetik dihasilkan dengan metode biolistik (metode pistol partikel) atau dengan metode transformasi yang dimediasi oleh Agrobacterium tumefaciens. penggunaan bakteri penghuni tanah, yang dikenal sebagai Agrobacterium tumefaciens. Ia memiliki kemampuan untuk menginfeksi sel tumbuhan dengan sepotong DNA-nya. Keuntungan tanaman transgenik. 1) tanaman tahan herbisida, 2) Tanaman resisten serangga, 3) tanaman resisten virus, 4) tanaman resisten hama, 5) tanaman kaya nutrisi, 6) pemanfaatan lahan marginal, 7) mengurangi dampak lingkunagan, 8) meningkatkan produksi dan menghemat biaya (Jhansi Rani & Usha, 2013).

1. **Metode Transformasi DNA dengan *Agrobacterium tumefaciens***

 Sepotong DNA, yang menginfeksi tumbuhan, diintegrasikan ke dalam kromosom tumbuhan, melalui plasmid penginduksi tumor (Ti plasmid). Plasmid Ti dapat mengontrol mesin seluler tanaman dan menggunakannya untuk membuat banyak salinan DNA bakterinya sendiri. Plasmid Ti adalah partikel DNA melingkar besar yang bereplikasi secara independen dari kromosom bakteri. "Agrobacterium" mampu mentransfer fragmen besar DNA dengan sangat efisien. Salah satu keterbatasan terbesar Agrobacterium adalah tidak semua tanaman pangan penting dapat terinfeksi oleh bakteri ini (Jhansi Rani & Usha, 2013). Berikut skema transformasi DNA yang dimediasi oleh *Agrobacterium tumefaciens* (LI et al., 2018)



Gambar. Diagram proses transformasi dengan Agrobacterium tumefaciens

1. **Penggunaan Agrobacterium tumefaciens dalam Produksi Berbagai Tanaman Transgenik.**

Penggunaan Agrobacterium pada produksi tanaman transgenik telah dilakukan sejak dulu, karena bakteri ini memiliki keunggulan dalam melakukan transformasi DNA ke sel inang (Jhansi Rani & Usha, 2013; LV et al., 2017). Penelitian pemanfaatan Agrobecterium dalam proses pembuatan tanaman transgenik telah banyak dilakukan pada berbagai tanaman pangan. Berikut ringkasan beberapa penelitian penggunaan *Agrobacterium tumefaciens* dalam produksi berbagai tanaman pangan.

1. Transformasi benih dengan mediasi *Agrobacterium tumefaciens* pada *Hibiscus cannabinus* L. Kenaf (*Hibiscus cannabinus L*.) merupakan tanaman serat dari famili Malvaceae yang memiliki potensi besar dalam pembuatan kertas, media penyerapan dan pakan ternak. Serat tanaman kenaf sangat bergantung pada kondisi lngkungan seperti kekeringan dan salinitis. Apabila kondisi lingkungan tidak mendukung maka hasil serat tidak maksimal. Solusi untuk mengatasi permasalahan tersebut adalah dengan rekayasa genetika untuk memproduksi tanaman kenaf yang toleransi terhadap cekaman lingkungan. Gen yang digunakan yautu gen kandidat faktor transkripsi VvWRKY2 dengan media transformasi genetik *Agrobacterium tumifaciens.* Plasmid vektor yang digunakan adalah plasmid pGreen-VvWRKY2 dimobilisasi ke dalam Agrobacterium tumefaciens (strain GV3010) dengan elektroporasi. Analisis molekuler tanaman F0 dari tiga galur transgenik menunjukkan adanya integrasi nyata dari gen VvWRKY2 ke dalam genom kenaf. Sehingga dapat disimpulkan bahwa metode yang digunakann adalah prosedur yang efisien, cepat, dan andal dimana tanaman berbunga transgenik stabil diperoleh dalam waktu singkat 3 bulan dengan efisiensi transformasi 6% (Hanana et al., 2018).
2. Optimalisasi Transformasi yang dimediasi *Agrobacterium tumefaciens* di Tanaman Teh (*Camellia sinensis*). Tanaman teh [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] adalah salah satu tanaman kayu abadi dari keluarga Theaceae, Untuk mempromosikan studi pemuliaan genetik tanaman teh dan meningkatkan laju penggunaan teh, maka menggunakan bioteknologi untuk mengubah gen yang bermanfaat bagi kesehatan manusia serta dengan ekspresi yang efektif pada tanaman teh, atau menghambat ekspresi gen yang merugikan dalam teh dengan memanfaatkan *Agrobecterium tumefaciens.* Kalus kotiledon C. sinensis digunakan sebagai reseptor untuk transformasi oleh *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 yang mengandung PS1aG-3. Sistem optimum transformasi yang dimediasi Agrobacterium adalah kalus kotiledon dipra-kultur selama 3 hari, kemudian diinfeksi. dengan EHA105 selama 15 menit diikuti dengan 3 hari kultur bersama dalam gelap pada media YEB yang mengandung 150 µmol l − 1 acetosyringone (AS) (LV et al., 2017).
3. Tanaman transgenik *Brassica rapa* dengan mediasi Agrobakterium. Gen yang bertanggung jawab atas virus mosaik lobak (TuMV), penyakit akar gada dan jamur berbulu halus serta warna ungu dapat dimasukkan ke dalam galur bawaan berkualitas tinggi oleh pemulia menggunakan teknologi transgenik dengan bantuan Agrobakterium. Dari tiga strain Agrobacterium tumefaciens yang diuji (C58C1, EHA105 dan LBA4404), hasil terbaik telah diperoleh dengan menggunakan strain LBA4404. Pada penggunaan Agrobakterium hal yang perlu diperhatikan adalah sterilisasi benih permukaan, ko-kultivasi dengan A. tumefaciens, induksi pembentukan kalus / pucuk / akar, dan konfirmasi tanaman transgenik. Selain itu, faktor-faktor seperti galur Agrobacterium, genotipe tanaman, umur eksplan, efisiensi transformasi dari galur hibrida atau kawin, dan konsentrasi N6-benzil amino purin dan asam asetat naftalen juga dapat menjadi pertimbangan dalam penggunaan A. tumefaciens (LI et al., 2018).
4. Produksi tanaman Tomat Transgenikyang dimediasi oleh Agrobacterium. Tomat (*Lycopersicon esculentum*) merupakan salah satu tanaman sayuran terpenting dan model genetik untuk memperbaiki tanaman tanaman dikotil lainnya. Tomat sangat diminati karena variasi jalur biosintetik karotenoid dapat dengan mudah diamati dengan akumulasi berbagai zat antara biosintetik karotenoid. Protokol yang ditingkatkan untuk transformasi yang dimediasi Agrobacterium dari tomat (Lycopersicon esculentum) Micro-Tom dikembangkan untuk digunakan bersama gen biosintetik karotenoid CsZCD (Crocus zeaxanthin 7,8-cleavage dioxygenase). Protokol berhasil digunakan dalam produksi tomat Micro-Tom transgenik yang mengandung biosintesis karotenoid CsZCD di bawah promotor konstruktif. Prosedur ini merupakan cara yang sederhana, efisien dan umum untuk mengubah tomat (Qiu et al., 2007).
5. Semangka transgenik tahan Cucumber mosaicvirus. Semangka (*Citrullus lanatus Thunb*.) adalah tanaman musim panas yang rentan terhadap beberapa infeksi virus, seperti Virus mosaik mentimun (CMV), virus mosaik kuning Zucchini (ZYMV), virus mosaik semangka (WMV), dan virus mosaik bintik hijau Ketimun ( CGMMV). CMV, sejenis spesies dari genus Cucumovirus, famili Bromoviridae, adalah virus RNA sensifikan dengan genom tripartit. Analisis PCR dan Southern blot menegaskan bahwa fragmen yang ditransfer berhasil diimpor dan diintegrasikan ke dalam genom tiga dari tujuh garis transgenik ini. Uji DAS-ELISA menunjukkan bahwa CMV dapat dideteksi pada garis nontransgenik tetapi tidak pada garis transgenik, dan garis transgenik menunjukkan resistensi terhadap infeksi CMV (Liu et al., 2016).
6. Produksi Tanaman Kacang Tanah Transgenik (*Arachis hypogaea L*.) melalui transformasi genetik yang dimediasi oleh Agrobacterium tumefaciens). Kacang tanah (*Arachis hypogaea* L.) adalah tanaman kaya minyak dan protein yang bijinya mengandung sekitar 43% minyak dan 25% protein. Kacang tanah rentan terhadap serangan virus. Virus rumpun kacang tanah India (IPCV; Pecluvirus) tersebar luas di India, di mana ia menyebabkan penyakit rumpun pada tanaman kacang tanah. Transformasi yang efisien dari kotiledon ini dengan menggunakan Agrobacterium tumefaciens strain C 58 yang membawa neomisin fosfotransferase II (nptII) dan ß-glukuronidase (GUS; uidA), atau gen protein mantel dari virus rumpun kacang India (IPCVcp) dan nptII pada vektor biner (pBI121; pROKII: IPCVcp) menyebabkan produksi sebagian besar (55%) tanaman transgenik. Sistem regenerasi kotiledon terbukti menjadi sarana yang sangat baik untuk produksi sejumlah besar tanaman kacang tanah. Pembentukan tunas berlangsung cepat dan subur, dan sebagian besar tunas tersebut berkembang menjadi tanaman subur (Sharma & Anjaiah, 2000).
7. Produksi tanaman kentang transgenik (*S. tuberosum L. ssp. Andigena*) yang efisien melalui transformasi yang dimediasi oleh Agrobacterium tumefaciens. Kentang merupakan tanaman sasaran penting untuk aplikasi bioteknologi Produksi pucuk kentang transgenik dalam waktu 4 minggu sejak inokulasi awal eksplan daun oleh Agrobacterium tumefaciens telah dilakukan dengan subspesies Solanum tuberosum andigena (Banerjee et al., 2006).
8. Produksi tanaman transgenik dari tanaman hias *Liliaceous Agapanthus praecox ssp. orientalis (Leighton) Leighton* melalui transformasi yang dimediasi oleh Agrobacterium dari kalus embriogenik. Agapanthus praecox ssp. orientalis (Leighton) Leighton, yang termasuk dalam famili Liliaceae, biasa disebut agapanthus atau lily dari sungai Nil. Peningkatan kualitas tanaman termasuk bunga dengan transgenik yang dimediasi Agrobacterium. Kalus embriogenik yang berasal dari daun diinokulasi dengan A. tumefaciens strain EHA101 / pIG121Hm atau LBA4404 / pTOK233, keduanya mengandung vektor biner pembawa neomycin phosphotransferase II (NPTII), hygromycin phosphotransferase (HPT) dan intron-contains glukuronidase (GUS-intronidase). Embrio somatik yang diperoleh berkembang menjadi planlet lengkap setelah dipindahkan ke media tanpa PIC dan antibiotik. Semuanya diverifikasi sebagai transforman stabil dengan uji histokimia GUS, analisis PCR dan Southern blot (Suzuki, Supaibulwatana, Mii, & Nakano, 2001).
9. Kacang Pigeon transgenik yang dimediasi agrobakterium yang tahan terhadap Spodoptera. Transformasi menggunakan Agrobacterium tumefaciens strain GV2260 yang menyimpan vektor biner pPK202 termodifikasi yang membawa gen penanda neomisin fosfotransferase II (npt II) dan gen cry I EC sintetis di bawah promotor konstitutif 35 S. Integrasi T-DNA ke dalam genom inti tanaman yang ditransformasikan dan transmisi seksualnya ke keturunan tanaman transgenik dikonfirmasi dengan amplifikasi PCR dari fragmen 700 bp npt II dan analisis hibridisasi Southern blot menggunakan fragmen npt II yang diperkuat PCR sebagai probe. Bioassay serangga in vitro menggunakan larva Spodoptera litura tahap instar pertama dan kedua pada tanaman T1 dan T2 menunjukkan bahwa ekspresi sintetis *cry* I E-C pada tanaman kacang merpati transgenik memberikan perlindungan terhadap larva serangga.

Rencana Judul Artikel :

**“Optimalisasi Penggunaan *Agrobacterium tumefaciens* Sebagai Mediator dalam Produksi Tanaman Pangan Trangenik”**

**REFERENSI**

Banerjee, A. K., Prat, S., & Hannapel, D. J. (2006). Efficient production of transgenic potato (S. tuberosum L. ssp. andigena) plants via Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation. *Plant Science*, *170*(4), 732–738. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.11.007

Che, Y., Zhang, N., Zhu, X., Li, S., Wang, S., & Si, H. (2020). Enhanced tolerance of the transgenic potato plants overexpressing Cu/Zn superoxide dismutase to low temperature. *Scientia Horticulturae*, *261*(October 2019), 108949. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108949

Hanana, M., Ayadi, R., Mzid, R., Khouja, M. L., Hanachi, A. S., & Hamrouni, L. (2018). Efficient method of seed transformation via Agrobacterium tumefaciens for obtaining transgenic plants of Hibiscus cannabinus L. *Industrial Crops and Products*, *113*(October 2017), 274–282. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.01.050

Jhansi Rani, S., & Usha, R. (2013). Transgenic plants: Types, benefits, public concerns and future. *Journal of Pharmacy Research*, *6*(8), 879–883. https://doi.org/10.1016/j.jopr.2013.08.008

LI, G., YUE, L., LI, F., ZHANG, S., ZHANG, H., QIAN, W., … SUN, R. (2018). Research Progress on Agrobacterium tumefaciens-based Transgenic Technology in Brassica rapa. *Horticultural Plant Journal*, *4*(3), 126–132. https://doi.org/10.1016/j.hpj.2018.03.006

Liu, L., Gu, Q., Ijaz, R., Zhang, J., & Ye, Z. (2016). Generation of transgenic watermelon resistance to Cucumber mosaic virus facilitated by an effective Agrobacterium-mediated transformation method. *Scientia Horticulturae*, *205*, 32–38. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.04.013

LIU, M. min, LI, Y. lun, LI, G. cun, DONG, T. tian, LIU, S. yang, LIU, P., & WANG, Q. guo. (2020). Overexpression of StCYS1 gene enhances tolerance to salt stress in the transgenic potato (Solanum tuberosum L.) plant. *Journal of Integrative Agriculture*, *19*(9), 2239–2246. https://doi.org/10.1016/S2095-3119(20)63262-2

LV, Q., CHEN, C., XU, Y., HU, S., WANG, L., SUN, K., … LI, X. (2017). Optimization of Agrobacterium tumefaciens -Mediated Transformation Systems in Tea Plant ( Camellia sinensis ). *Horticultural Plant Journal*, *3*(3), 105–109. https://doi.org/10.1016/j.hpj.2017.03.001

Mi, X., Liu, X., Yan, H., Liang, L., Zhou, X., Yang, J., … Zhang, N. (2017). Expression of the Galanthus nivalis agglutinin (GNA) gene in transgenic potato plants confers resistance to aphids. *Comptes Rendus - Biologies*, *340*(1), 7–12. https://doi.org/10.1016/j.crvi.2016.10.003

Qiao, L., Jiang, P., Tang, Y., Pan, L., Ji, H., Zhou, W., … Wang, J. (2020). Characterization of AhLea-3 and its enhancement of salt tolerance in transgenic peanut plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, *49*, 42–49. https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2020.10.006

Qiu, D., Diretto, G., Tavarza, R., & Giuliano, G. (2007). Improved protocol for Agrobacterium mediated transformation of tomato and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic gene CsZCD. *Scientia Horticulturae*, *112*(2), 172–175. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.12.015

Sharma, K. K., & Anjaiah, V. (2000). An efficient method for the production of transgenic plants of peanut (Arachis hypogaea L.) through Agrobacterium tumefaciens-mediated genetic transformation. *Plant Science*, *159*(1), 7–19. https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00294-6

Surekha, C., Beena, M. R., Arundhati, A., Singh, P. K., Tuli, R., Dutta-Gupta, A., & Kirti, P. B. (2005). Agrobacterium-mediated genetic transformation of pigeon pea (Cajanus cajan (L.) Millsp.) using embryonal segments and development of transgenic plants for resistance against Spodoptera. *Plant Science*, *169*(6), 1074–1080. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.07.011

Suzuki, S., Supaibulwatana, K., Mii, M., & Nakano, M. (2001). Production of transgenic plants of the Liliaceous ornamental plant Agapanthus praecox ssp. orientalis (Leighton) Leighton via Agrobacterium-mediated transformation of embryogenic calli. *Plant Science*, *161*(1), 89–97. https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00393-4

Wijewardene, I., Mishra, N., Sun, L., Smith, J., Zhu, X., Payton, P., … Zhang, H. (2020). Improving drought-, salinity-, and heat-tolerance in transgenic plants by co-overexpressing Arabidopsis vacuolar pyrophosphatase gene AVP1 and Larrea Rubisco activase gene RCA. *Plant Science*, *296*(March), 110499. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110499

WU, G. ting, CHEN, J. qing, HU, Z. hua, LANG, C. xiu, CHEN, X. yun, WANG, F. lin, … ZHANG, Y. min. (2006). Production of Transgenic Tall Fescue Plants with Enhanced Stress Tolerances by Agrobacterium tumefaciens-Mediated Transformation. *Agricultural Sciences in China*, *5*(5), 330–338. https://doi.org/10.1016/S1671-2927(06)60058-8