

Ekspresi fenotipe gen *APETALA1* kakao (*TcAPI*) pada eksplan tembakau

Phenotypic expression of cacao APETALA1 (TcAPI) in tobacco explant

Tetty CHAIDAMSARI¹⁾, SAMANHUDI²⁾, Asmini BUDIANI¹⁾,
Roedhy POERWANTO³⁾ & Djoko SANTOSO^{1*)}

¹⁾Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Bogor 16151, Indonesia

²⁾Fakultas Pertanian - Universitas Sebelas Maret, Surakarta 57126, Indonesia

³⁾Fakultas Pertanian – Institut Pertanian Bogor, Bogor, Indonesia

Summary

APETALA1 (AP1) is one of flowering identity genes that determines the formation of sepal and petal tissues. An AP1 homologue was cloned from cacao flowers by bio-techniques coupled with bio-informatics. Examination of phenotypic expression was conducted with transgenesis of the 35S-TcAPI construct using leaf disk technique of tobacco leaf explants mediated by Agrobacterium tumefaciens. PCR specific to TcAPI demonstrated that the technique is effective in introducing the 35S-TcAPI construct into tobacco plant cells. RT-PCR with total RNA from the leaves of transgenic tobacco plantlets showed that expression levels of the TcAPI events varied. The variation of the transcript levels was comparable to the morphological phenotype of the tobacco plantlets grown in vitro. The cultures expressing TcAPI at moderate levels, have developed into intact plantlets and set up flowers in vitro.

[Key words: Early flowering, *in vitro*, tobacco, *Theobroma cacao* L]

*) Penulis korespondensi, Tel.+62-251-324048
E-mail:djsantoso@yahoo.com

Ringkasan

APETALA1 (AP1) diketahui merupakan salah satu gen identitas pembungaan yang mengendalikan terbentuknya jaringan sepal dan petal. Homolog *AP1* telah diklon dari organ bunga kakao (*TcAPI*) dengan kombinasi *bio-techniques* dan *bio-informatics*. Pengujian ekspresi fenotipe *TcAPI* dilakukan dengan transgenesis konstruk konstitutif 35S-*TcAPI* menggunakan teknik *leaf disk* eksplan daun tembakau dan mediasi *Agrobacterium tumefaciens*. Pengujian PCR spesifik *TcAPI* menunjukkan bahwa teknik tersebut cukup efektif dalam mengintroduksi konstruk 35S-*TcAPI* ke dalam sel tanaman tembakau. RT-PCR dari daun planlet tembakau trangenik membuktikan bahwa tingkat ekspresi *TcAPI* tersebut bervariasi. Perbedaan level ekspresi *TcAPI* ini memberikan pengaruh yang nampak sebanding terhadap perkembangan morfologis planlet tembakau *in vitro*. Kultur yang mengekspresikan *TcAPI* pada level sedang mampu beregenerasi menjadi planlet sempurna dan membentuk bunga *in vitro*.

Pendahuluan

APETALAI adalah gen penyandi faktor transkripsi yang dengan atau tanpa gen pembungaan lainnya, berperan dalam transisi perkembangan vegetatif ke pembungaan (Pelaz *et al.*, 2001; Pena *et al.*, 2001; Putterill *et al.*, 2004). Homolog gen *APETALAI* telah berhasil diklon dari organ bunga kakao. Pendekatan bioinformatika yang dikombinasikan dengan beberapa teknik biologi molekuler terbukti dapat digunakan untuk mengisolasi gen pembungaan kakao *full length APETALAI*. Pendekatan kloning gen relatif lebih sederhana daripada cara yang umumnya digunakan, misalnya melalui penapisan (*screening* pustaka cDNA). Dengan primer heterologous yang dirancang berdasarkan sekuen homolog gen *APETALAI* dari berbagai spesies yang dapat diakses dari bank gen (*genebank*) melalui situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> atau <http://www.ebi.uk>, cDNA homolog *APETALAI* dapat disintesa dari RNA total bunga kakao dan diamplifikasi dengan teknik RT-PCR (Santoso, 2004).

DNA amplikon hasil RT-PCR tersebut terbukti merupakan homolog *APETALAI*. Setelah diklon dengan vektor-T, sekuen keseluruhan dari DNA hasil PCR tersebut, sekitar 900 pb, dapat ditentukan dengan primer universal M13. Analisis Blast (*Basic Local Alignment Search Tool*) menunjukkan bahwa sekuen cDNA tersebut memiliki tingkat homologi yang tinggi dengan gen *APETALAI* dari beberapa spesies tanaman (Claveri & Notredame, 2003; Santoso, 2004). Untuk lebih memastikan identitas dan fungsinya, homolog gen *APETALAI* dari kakao tersebut (*TcAPI*), perlu diuji ekspresi dan pengaruhnya terhadap perkembangan

organ reproduktif tanaman. Pengujian semacam ini biasanya dilakukan menggunakan tanaman model *Arabidopsis* (Chaidamsari *et al.*, 2006). Namun karena menumbuhkan tanaman *Arabidopsis* di daerah atau lingkungan tropis sangat sulit, maka pengujian dilakukan dengan menggunakan eksplan tanaman tembakau *in vitro*.

Dengan teknik transformasi standar *leaf disk*, konstruk ekspresi gen *TcAPI* di introduksikan ke dalam sel tanaman tembakau melalui *Agrobacterium tumefaciens*. Setelah inokulasi, kultur eksplan diseleksi pada media padat yang mengandung dua antibiotika penyeleksi dan anti *A. tumefaciens*, lalu dilanjutkan dengan regenerasi pada medium yang sama dengan antibiotika penyeleksi yang sama. Pengamatan terhadap perkembangan eksplan menunjukkan bahwa eksplan transgenik yang membawa konstruk *TcAPI* secara morfologi berbeda dengan eksplan kontrol non-transgenik.

Bahan dan Metode

Modifikasi dan transformasi genetik

Konstruk ekspresi pada tanaman dari gen *TcAPI* dibuat dengan meligasikan promoter konstitutif 35S CaMV di ujung 5' dan terminator Nos di ujung 3' dari gen tersebut. DNA untuk ligasi ini sebelumnya dipotong dengan enzim endonuklease restriksi yang sesuai. Untuk keperluan transformasi, secara umum konstruk tersebut diposisikan di antara batas kanan (RB) dan batas kiri (LB) dari vektor transformasi biner. Vektor rekombinan yang diperoleh dimasukkan ke dalam sel *A. tumefaciens*, galur AGL0 kompeten dengan cara elektroforasi (Chaidamsari, 2006). Untuk menye-

Ekspresi fenotipe gen APETALAI kakao...

leksi dan mengkonfirmasi *A. tumefaciens* yang positif membawa konstruk ekspresi *TcAPI* dilakukan PCR koloni dengan primer spesifik *TcAPI* pada beberapa koloni bakteri yang tumbuh pada medium seleksi.

Transformasi genetik *TcAPI* ke dalam sel tanaman model dilakukan dengan teknik *leaf disk* yang dimodifikasi dari Saint *et al.* (1994) sebagaimana diuraikan dalam Santoso *et al.* (2000). *A. tumefaciens* yang membawa konstruk 35S-*TcAPI* ditumbuhkan dalam medium cair Luria-Bertani (LB) yang mengandung kanamisin 25 ppm selama 24 – 48 jam pada suhu 28°C dengan pengocokan 150 rpm dalam keadaan gelap. Setelah diencerkan 100 – 1000 kali dengan medium yang sama, *A. tumefaciens* tersebut dikulturkan kembali selama sekitar tiga jam pada kondisi yang sama. Potongan-potongan eksplan daun tembakau, (diameter 0,5 – 1,0 cm) diinkubasi selama 15 menit dengan kultur cair *A. tumefaciens* dengan pengenceran sepuluh kali. Ko-kultivasi pada medium MS padat yang mengandung acetosyringon 100 ppm dilakukan selama dua hari. Setelah itu dilakukan seleksi pada medium MS padat dengan timentin 100 ppm atau cefotaxime 250 ppm dan 25 ppm kanamisin.

Kultur jaringan

Kultur jaringan untuk regenerasi planlet tembakau dilakukan dengan metode standar melalui organogenesis. Potongan eksplan daun steril dikulturkan pada medium MS padat yang mengandung BAP 0,5 ppm (Murashige & Skoog, 1962). Kultur diinkubasi pada suhu 26 – 28°C dengan lama penyinaran 16 jam per hari. Subkultur ke medium segar dilakukan setiap 4 – 6 minggu sekali. Kultur eksplan transgenik dilakukan

dengan metode dan kondisi yang sama dengan non-transgenik kecuali komposisi medium. Untuk seleksi dan kultur eksplan transgenik, ke dalam medium tumbuhnya ditambahkan antibiotika penyeleksi yang sesuai, yaitu kanamisin 25 ppm dan cefotaxime 250 ppm. Perkembangan morfologi planlet diamati dua kali seminggu selama masa percobaan.

Polymerase chain reaction (PCR)

PCR dilakukan untuk mengetahui keberadaan gen target. Dalam hal ini untuk mengetahui apakah planlet transgenik yang diregenerasikan dari eksplan yang telah diinokulasi dengan *A. tumefaciens* pembawa konstruk 35S-*TcAPI*. Campuran pereaksi PCR mengandung DNA cetakan (*template*) sebanyak 1 – 10 ng, keempat dNTP masing-masing 0,2 µM, sepasang primer DNA spesifik *TcAPI* masing-masing sebanyak 20 – 100 nM, Polimerase DNA Taq 1 – 2,5 Unit. Reaksi dilakukan dengan volume 25 atau 50 µL dan program termal sebagai berikut: denaturasi pada suhu 94 °C selama 30 detik, pemasangan (*annealing*) pada suhu 50 °C selama 30 detik, pemanjangan pada suhu 72 °C selama dua menit, dan ulangan 35 siklus. Hasil PCR diperiksa menggunakan gel agarosa konsentrasi 0,7 – 1% yang telah diberi etidium bromida (Sambrook *et al.*, 1989).

Reverse Transcriptase (RT)-PCR

Untuk analisis RT-PCR dilakukan satu rangkaian percobaan yang terdiri dari preparasi mini RNA total, sintesis utas pertama cDNA dan PCR menggunakan utas tunggal cDNA sebagai cetakan. RNA total diisolasi dari daun tembakau dengan kit

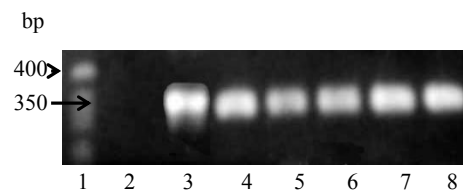
RNeasy dari QIAGEN GmbH (Hilden, Germany) menggunakan 100 mg contoh daun dari kultur *in vitro*. Kualitas dan kuantitas RNA total yang diperoleh ditentukan dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 230, 260 dan 280 nm, juga dengan elektroforesis gel agarosa.

Sintesis utas pertama cDNA dilakukan dengan kit dari Invitrogen (CA, USA). Reaksi berlangsung dengan volume 50 μ L pada suhu 42 °C selama 50 menit dan dengan RNA total sebanyak 1 μ g. Tahapan lainnya dilakukan sebagaimana diuraikan dalam *Instruction Manual* yang diberikan bersama dengan kit. Sebanyak 1 μ L hasil sintesis utas pertama cDNA ini digunakan sebagai *template* dalam reaksi PCR. Reaksi PCR dilakukan dengan kondisi dan cara sebagaimana diuraikan di atas. Sedangkan primer yang digunakan dirancang dari sekuen *TcAPI* dengan ukuran amplicon sekitar 400 pb.

Hasil dan Pembahasan

Pengalaman sebelumnya membuktikan bahwa metode transformasi genetik tanaman sebagaimana diuraikan dalam Bahan dan Metode, memiliki efektivitas yang baik pada tanaman tembakau. Pada percobaan ini, sekali lagi transfer DNA ke dalam sel tanaman tembakau terbukti. Hasil pengujian PCR spesifik *TcAPI* menggunakan cetakan DNA genomik plantlet tembakau transgenik, memberikan amplicon DNA dengan ukuran sesuai dengan jarak kedua primer spesifik yang digunakan. Adapun ketebalan amplicon tersebut bervariasi dan secara umum tidak setebal kontrol positifnya yaitu plasmid rekombinan yang membawa konstruk 35S-*TcAPI* (Gambar 1). Variasi

intensitas amplicon ini kemungkinan terkait dengan kualitas ataupun kuantitas DNA cetakan. Kemungkinan masih adanya kontaminan yang dapat menghambat reaksi PCR menyebabkan amplifikasi tidak berlangsung optimal. Kemungkinan lainnya adalah di dalam larutan DNA template, terutama yang dari tanaman tembakau, terdapat kontaminan RNA dalam jumlah yang bervariasi. Dengan demikian plantlet tembakau transgenik yang mengekspresikan RNA *TcAPI* memberikan amplicon yang lebih banyak dari pada yang ekspresinya lemah. Apapun kemungkinannya, data ini jelas menunjukkan bahwa dengan cara transformasi sebagaimana diuraikan dalam Bahan dan Metode, konstruk *TcAPI* telah masuk ke dalam menjadi plantlet. Setelah konstruk 35S-*TcAPI* terakuisisi masuk ke dalam genom tembakau, pemeriksaan selanjutnya adalah menguji apakah gen



Gambar 1. Pengujian PCR spesifik *TcAPI* terhadap DNA genomik plantlet tembakau. Lajur 1, 2, 3 dan 4-8 secara berurutan adalah marker DNA, DNA tembakau non-transgenik, plasmid rekombinan dan DNA tembakau transgenik.

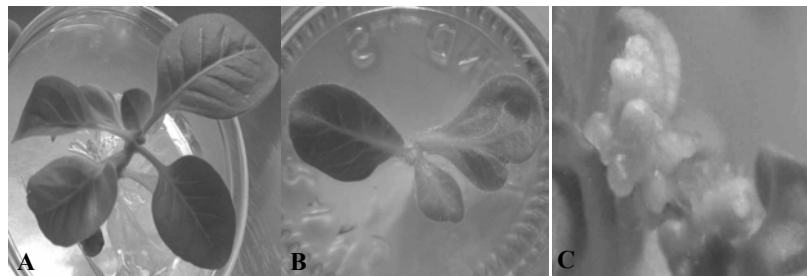
Figure 1. PCR examination of transgenic tobacco using TcAP-specific primers. Lanes 1,2,3 and 4-8 are DNA ladder, non transgenic control, recombinant plasmid and transgenic tobacco respectively.

Ekspresi fenotipe gen APETALA1 kakao...

tersebut terekspresi di dalam sistem inang yang baru. Pengujian ini bisa dilakukan di tingkat molekuler, morfologis, atau kombinasinya. Ekspresi gen *TcAPI* dalam sel tanaman tembakau diharapkan dapat menghasilkan protein faktor transkripsi yang aktif sehingga memberikan pengaruh positif terhadap perkembangan morfologis dari planlet yang mengekspresikannya. Hasil pengamatan perkembangan tembakau transgenik, dua-tiga bulan setelah transformasi disajikan pada Gambar 2. Paling tidak ada dua fenotipe morfologis yang penampakan-nya berbeda dengan adanya transgen *TcAPI*. Pertama adalah planlet transgenik yang memiliki daun terbelah (Panel B). Tipe yang kedua memiliki struktur seperti kuntum bunga yang bergerombol (Panel C). Pada *Arabidopsis*, aktivitas *API* dalam mempengaruhi perkembangan tanaman terjadi

melalui proses prenilisasi (Yalovsky *et al.*, 2000).

Penampakan fenotipe yang bervariasi ini kemungkinan terkait dengan level ekspresi transgen *TcAPI*. Hal semacam ini terjadi dengan ekspresi ektopik dari *AGAMOUS* pada tanaman model *Arabidopsis thaliana* (Kitahara *et al.*, 2004; Chaidamsari *et al.*, 2006). Planlet tembakau yang memiliki daun terbelah kemungkinan mengekspresikan *TcAPI* pada level sedang, atau yang cukup sekedar memberikan dampak perubahan morfologis yang sedang-sedang saja. Sementara pada kultur transgenik yang menghasilkan struktur seperti “dompokan” kuntum bunga, kemungkinan karena ekspresi yang tinggi dari *TcAPI*. Sebagaimana disebutkan bahwa gen pembungaan *API* menginduksi ekspresi gen *LEAFY* (Putterill *et al.*, 2004). Overekspresi



Gambar 2. Morfologi kultur planlet tembakau setelah transformasi genetik. Panel A, B dan C masing-masing adalah planlet kontrol non-trangenik, transgenik umur 2,5 bulan dengan helai daun terbelah (perubahan ringan), dan struktur mirip kuncup bunga (perubahan berat).

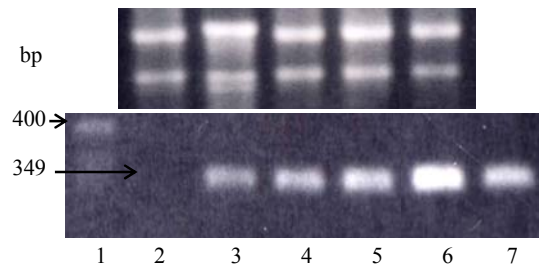
Figure 2. Tobacco plantlets regenerated after the genetic transformation. Panels A, B and C are non-transgenic plantlet, 2.5-month-old transgenic plantlets with splitted leaf (minor change), and with inflorescence like structure (severe change) respectively.

TcAPI menyebabkan ekspresi *NtLFY* terinduksi yang pada akhirnya memberikan perkembangan morfologis yang unik tersebut. Sementara itu, percobaan ekspresi ektopik dari gen *AtLFY* mampu menginduksi terbentuknya struktur seperti bunga pada kultur eksplan *in vitro* (Wagner *et al.*, 2004). Sementara itu *LEAFY* yang merupakan pengendali transisi dari perkembangan vegetatif ke pembungaan juga menginduksi gen *API* (Wagner *et al.*, 1999). Saling induksi inilah yang mungkin menjadi pemicu terbentuknya struktur mirip bunga meskipun dalam kultur *in vitro*.

Untuk membuktikan bahwa perubahan morfologis tersebut terkait dengan tingkat ekspresi transgen *TcAPI*, dilakukan pengujian RT-PCR menggunakan primer spesifik *TcAPI* terhadap transkrip masing-masing kultur planlet tersebut. Hasil pengujian ekspresi (Gambar 3) mengindikasikan bahwa terdapat hubungan positif antara tingkat perubahan morfologis planlet transgenik dengan tingkat ekspresi transgen *TcAPI*. Pada sample dari tembakau non-

transgenik, tidak diperoleh pita DNA hasil RT-PCR. Sementara itu pada sampel planlet transgenik dan kontrol positif, PCR menggunakan template rekombinan 35S-*TcAPI*, diperoleh hasil RT-PCR yang relatif kuat. Adanya diferensiasi intensitas pita DNA hasil PCR diduga kuat terkait dengan perbedaan level transkrip gen target, *TcAPI*. Dalam beberapa hal, RT-PCR termasuk cara yang mudah untuk menguji tingkat ekspresi gen yang telah diketahui sekuen nukleotidanya, misalnya gen *TcAG* (Chaidamsari *et al.*, 2006) dan gen *LEAFY COTYLEDON2 (LEC2)* *Arabidopsis* (Stone *et al.*, 2001).

Berfungsinya *TcAPI* di dalam sistem interaksi dan ekspresi di tembakau, dapat dijelaskan secara empiris maupun melalui analisis kemiripan sekuen gen pembungaan antar spesies tanaman. Sebagai salah satu keluarga gen *MADS-BOX*, *API* dari berbagai spesies tanaman, memiliki tingkat kemiripan sekuen yang tinggi, termasuk antara *TcAPI* dengan *NtAPI*. Secara empiris, fungsionalitas ini dapat dikaitkan dengan ekspresi transgen di dalam inang



Gambar 3. Hasil RT-PCR spesifik *TcAPI* dengan RNA total daun planlet tembakau. Lajur 1, 2 dan 7 adalah penanda bobot molekul control negatif planlet non-transgenik, dan kontrol positif rekombinan 35S-*TcAPI*. Lajur 3-6 adalah dari tembakau transgenik dengan perubahan morfologis ke kanan semakin kuat

Figure 3. Result of RT-PCR specific to *TcAPI* using total RNA from tobacco leaves. Lanes 1, 2 and 7 are DNA ladder, negative control of non-transgenic, and positive control of 35S-*TcAPI* DNA. Lanes 3-6 are from transgenic plantlets with morphological changes more severe to the right.

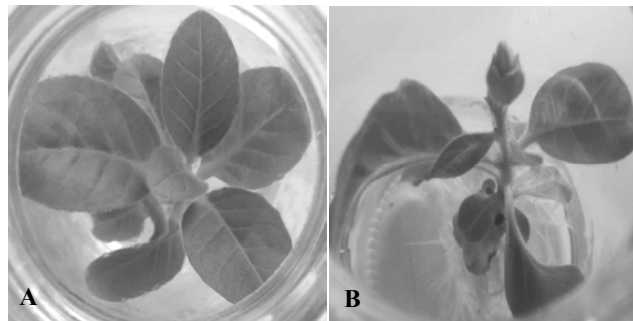
Ekspresi fenotipe gen APETALA1 kakao...

yang baru. Ekspresi gen pembungaan *API* dan *LEAFY* dari *Arabidopsis* pada tanaman yang secara kekerabatan cukup jauh, jeruk, memberikan pengaruh terhadap perkembangan bunganya (Pena *et al.*, 2001).

Tanaman jeruk memiliki masa TBM (*juvenile*) yang panjang. Organ reproduktifnya tidak terbentuk hingga tanaman berumur antara 6 dan 20 tahun, tergantung spesiesnya. Konstruksi konstitutif dari gen *AtLEAFY* atau *AtAPI*, yang merupakan penginduksi pembungaan pada *Arabidopsis*, telah ditransformasikan dan diekspresikan di kecambah jeruk. Kedua jenis jeruk transgenik menghasilkan bunga *fertile* dan buah dini pada tahun pertama. Selanjutnya, ekspresi *API* tersebut sama efisiensinya dengan *LFY* dalam inisiasi bunga, tidak berdampak abnormalitas pada perkembangannya. Kedua jenis tanaman transgenik tersebut juga tetap berbunga pada tahun-tahun berikutnya, dan respons pembungaannya dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Selain itu, bibit biji yang berasal dari tanaman transgenik memiliki masa TBM

yang sangat pendek, membuktikan bahwa fenotipe yang terekspresi tersebut bersifat stabil dan menurun (*inheritance*). Hasil-hasil ini membuka peluang baru dalam pemuliaan (*genetic improvement*) tanaman tahunan (Pena *et al.*, 2001).

Perkembangan *in vitro* selanjutnya dari planlet tembakau transgenik menegaskan bahwa *TcAPI* yang diekspresikan secara konstitutif pada level sedang (yang sesuai) mempercepat pembungaan pada planlet uji tersebut. Pada subkultur yang kedua atau pada umur planlet sekitar 3,5 bulan, pada ujung planlet terbentuk kuncup bunga tembakau (Gambar 4). Pembungaan dini ini terjadi pada planlet yang daunnya nampak sedikit terbelah atau yang ekspresi *TcAPI* terjadi pada level yang sedang. Sementara itu, pada kultur transgenik yang ekspresinya *TcAPI* tinggi belum terjadi perubahan pertumbuhan lanjutan. Dalam keadaan dan cara subkultur yang baku, pembungaan tembakau *in vitro* ini hampir tidak pernah terjadi. Atas dasar hasil pengamatan ini dan apa yang dilaporkan oleh Pena *et al.* (2001),



Gambar 4. Planlet tembakau 3,5 bulan *in vitro*. Panel A adalah tembakau kontrol non-transgenik, dan B adalah tembakau transgenik 35S-*TcAPI* yang berbunga secara dini.

Figure 4. Tobacco plantlet of 3.5-month-old *in vitro*. Panel A is non-transgenic tobacco, and B is early flowering transgenic tobacco of 35S-*TcAPI*

dapat dikatakan bahwa interaksi antara faktor transkripsi *API* dengan faktor atau protein pembungaan terkait lainnya, memiliki spesifisitas yang relatif luas. *API* dari spesies tanaman tingkat rendah *Arabidopsis* dapat berfungsi menginduksi pembungaan pada spesies tanaman tahunan seperti jeruk, demikian sebaliknya *API* dari spesies tanaman tahunan kakao dapat berfungsi pada spesies yang lebih kecil seperti tembakau. Sementara itu kultur yang mengoverekspresikan *TcAPI* secara konstitutif, level ekspresinya terlalu tinggi, tidak dapat beregenerasi menjadi planlet sempurna (gambar tidak ditunjukkan).

Hasil penelitian molekuler tentang gen *TcAPI* dan pengujian fungsinya ini membuka peluang perbaikan sifat agronomis tanaman tahunan. Dengan mengoverekspresikan gen *APETALA 1* pada tanaman tahunan target, diharapkan dapat membuat tanaman tersebut berbunga lebih cepat. Dengan demikian masa TBM (tanaman belum menghasilkan) tanaman tersebut menjadi lebih pendek. Overekspresi dapat dilakukan melalui transgenesis dengan gen *API* dari spesies tanaman model seperti *Arabidopsis thaliana* (Pena *et al.*, 2001) ataupun tanaman tahunan seperti *Theobroma cacao* sebagaimana dilaporkan melalui tulisan ini.

Kesimpulan

Transformasi eksplan daun tembakau dengan konstruk 35S-*TcAPI* melalui *Agrobacterium tumefaciens*, memberikan tingkat ekspresi *TcAPI* dan perubahan morfologis yang bervariasi. Ekspresi konstitutif *TcAPI* pada level sedang mampu menginduksi pembungaan *in vitro* pada planlet tembakau transgeniknya. Sedangkan

ekspresinya yang terlalu tinggi menyebabkan proses regenerasi terganggu sehingga planlet sempurna tidak terbentuk.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini dibiayai oleh Proyek Riset Unggulan Terpadu Internasional (RUTi) dari Kementerian Negara Riset dan Teknologi – Indonesia, tahun anggaran 2003 – 2005.

Daftar Pustaka

- Chaidamsari, T., Samanhudi, H. Sugiarti, D. Santoso, G.C. Angenent & R.A. de Maagd (2006). Isolation and characterization of an *AGAMOUS* homologue from cocoa. *Plant Sci.*, **170**, 968-975.
- Claveri, J.M. & C. Notredame (2003). *Bioinformatics For Dummies*. 2nd ed., Wiley Publishing, Inc., New York, pp 215-238.
- Kitahara K., Y. Hibino, R. Aida, S. Matsumoto (2004). Ectopic expression of the rose *AGAMOUS-like MADS-box* genes 'MASAKO C1 and D1' causes similar homeotic transformation of sepal and petal in *Arabidopsis* and sepal in *Torenia*. *Plant Sci.*, **166**, 1245-1252.
- Murashige, T. & F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, **15**, 473-497.
- Pelaz, S., C. Gustafson-Brown, S.E. Kohalmi, W.L. Crosby & M. F. Yanofsky (2001) *APETALA1* and *SEPALLATA3* interact to promote flower development. *The Plant Journal*, **26**, 385-394.
- Pena, L., M. Martín-Trillo, J. Juárez¹, J.A. Pina, L. Navarro & J.M. Martínez-Zapater (2001).

Ekspresi fenotipe gen APETALAI kakao...

- Constitutive expression of *Arabidopsis LEAFY* or *APETALAI* genes in citrus reduces their generation time. *Nature Biotechnol.*, **19**, 263-267.
- Putterill, J., R. Laurie & R. Macknight (2004). It's time to flower: the genetic control of flowering time. *BioEssays*, **26**, 1-11.
- Saint, S.L., K.K. Oduro & D.B. Furtak (1994) Genetic transformation of cocoa leaf cells using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Tiss. & Org. Cult.*, **37**, 243-251.
- Sambrook J, EF Fritsch & T Maniatis (1989) *Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Book 1 and 2*, 2nd ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Santoso, D., F.I. Cugito & H. Minarsih (2000). Development of tobacco plant cells in the presence of kanamycin at various levels for transgenesis. *Menara Perkebunan*, **68**, (1), 21-28.
- Santoso, D. (2004). Molecular and genetic engineering studies toward improvement of cacao bean production. *RUTi Annual Report 2004*. IBRIEC, Bogor, 54p.
- Stone, S.L., L.W. Kwong, K.M. Yee, J. Pelletier, L.C. Lepiniec, R.L. Fischer, R.B. Goldberg & J.J. Harada (2001). *LEAFY COTYLEDON2* encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *PNAS*, **98**, 11806-11811.
- Wagner, D., R.W. M. Sablowski & M. Meyerowitz (1999). Transcriptional activation of *APETALAI* by *LEAFY*. *Science*, **285**, 582-584.
- Wagner, D., F. Wellmer, K. Dilks, D. William, M.R. Smith, P.P. Kumar, J.L. Riechmann, A.J. Greeland & E.M. Meyerowitz (2004). Floral induction in tissue culture: a system for the analysis of *LEAFY*-dependent gene regulation. *The Plant J.*, **39**, 273-282.
- Yalovsky, S., M. Rodríguez-Concepción, K. Bracha, G. Toledo-Ortiz & W. Gruissem (2000). Prenylation of the floral transcription factor *APETALAI* modulates its function. *Plant Cell*, **12**, 1257-1266.