

**TRANSFORMASI GEN *SOSUT1* PADA TANAMAN TEBU MENGGUNAKAN  
*AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*  
STRAIN GV 3101 DAN PANGKAL TUNAS TEBU *IN VITRO*  
(TRANSFORMATION OF *SOSUT1* GENE IN SUGARCANE USING *AGROBACTERIUM*  
*TUMEFACIENS* STRAIN GV 3101 AND *IN VITRO* SUGARCANE BASAL SHOOT)**

Edia F.D, Bambang Sugiharto, Esti Utarti  
Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember (UNEJ)  
Jln. Kalimantan 37, Jember 68121  
E-mail: bbsghrt@yahoo.com

### Abstrak

Gen *SoSUT1* merupakan gen pengkode protein *sucrose transporter* yang memfasilitasi proses transportasi sukrosa dari jaringan fotosintetik (*source*) ke jaringan pengguna (*sink*) pada tanaman tebu. Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan tanaman tebu transforman melalui transformasi genetik menggunakan vektor *Agrobacterium tumefaciens* yang membawa gen *SoSUT1*. Eksplan pangkal tunas tebu *in vitro* diinfeksi dengan *A. tumefaciens* yang membawa konstruk *pAct-SoSUT1* dan dilakukan seleksi pada media MS dengan penambahan antibiotik *hygromycin*. Tanaman putatif transforman yang telah berhasil melewati proses seleksi dan diaklimatisasi, dilakukan isolasi DNA genom kemudian dianalisis PCR. Hasil analisis PCR dengan pasangan primer 1F/1R *hpt II* menunjukkan bahwa dari 24 tanaman tebu putatif transforman, didapatkan 15 tanaman tebu positif mengandung gen *SoSUT1*. Efektifitas rata-rata transformasi gen *SoSUT1* menggunakan eksplan pangkal tunas tebu *in vitro* sebesar 6,8%.

**Kata Kunci:** *Agrobacterium tumefaciens*, *SoSUT1*, sukrosa.

### Abstract

*SoSUT1* is a gene encoding the sucrose transporter proteins that facilitate the transportation of sucrose from photosynthetic tissues (*source*) to the network users (*sinks*) in sugarcane. The purpose of this study is to get sugarcane transformants through genetic transformation using *Agrobacterium tumefaciens* vector carrying the gene *SoSUT1*. The explants *in vitro* of sugarcane basal shoots infected with *A. tumefaciens* carrying the construct *pAct-SoSUT1* and be selected on MS medium with the addition of the antibiotic *hygromycin*. Putative plant transformants that have successfully passed the selection process and acclimatized, isolation of genomic DNA and then PCR analyzed. Results of PCR analysis with primer pairs 1F/1R *hpt II* shows that of the 24 putative transformants sugarcane, sugarcane obtained 15 positive for gene *SoSUT1*. Average effectiveness *SoSUT1* gene transformation using base explants *in vitro* shoots of sugarcane by 6.8%.

**Keywords:** *Agrobacterium tumefaciens*, *SoSUT1*, sucrose

## PENDAHULUAN

Sukrosa merupakan produk akhir asimilasi karbon selama proses fotosintesis yang terjadi pada organ daun tanaman [1]. Sukrosa sebagai produk akhir asimilasi karbon ditranslokasikan dari daun (*source*) ke organ penyimpanan (*sink*) untuk mendukung pertumbuhan dan perkembangan tanaman [2]. Proses translokasi sukrosa pada tanaman dari *source* ke *sink* difasilitasi oleh protein transport yang dikenal sebagai *sucrose transporter* (SUT)[3]. Beberapa penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa overekspresi gen SUT dapat meningkatkan transportasi sukrosa pada tanaman. Sedangkan penghambatan ekspresi gen SUT pada tanaman dengan RNA *antisense* dapat menghambat proses translokasi sukrosa.

Tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.) merupakan tanaman yang mengakumulasi sukrosa pada organ batang. Proses akumulasi sukrosa dari organ daun menuju

organ batang tanaman tebu membutuhkan peran protein *sucrose transporter*. Telah dilakukan kloning cDNA SUT pada tanaman tebu yaitu *SoSUT1* yang memiliki afinitas tinggi terhadap sukrosa [4]. Gen *SoSUT1* sebagai *gene of interest* yang ditransformasikan pada tanaman tebu. Proses transformasi menggunakan vektor *A. tumefaciens* merupakan metode yang umum digunakan dalam rekayasa genetik tanaman tebu. Keuntungan menggunakan *A. tumefaciens* sebagai vektor transformasi tanaman adalah relatif murah, efisien dan jumlah *copy* gen yang terintegrasi ke dalam kromosom tanaman lebih rendah [5]. Transformasi genetik pada tanaman tebu dengan vektor *Agrobacterium tumefaciens* dapat menggunakan eksplan berupa kalus maupun eksplan hasil regenerasi dari tunas *axilar* dan tunas apikal. Berdasarkan penelitian sebelumnya transformasi gen *SoSUT1* pada tanaman tebu dengan menggunakan eksplan kalus keberhasilan transformasi hanya berkisar 1% [6]. Selain itu, penggunaan kalus rentan

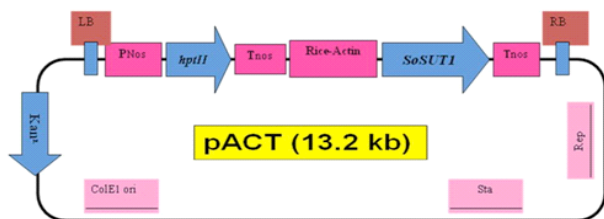
terhadap variasi somaklonal [7]. Sedangkan penggunaan pangkal tunas tebu *in vitro* sebagai eksplan transformasi mampu meminimalisasi tingkat variasi somaklonal dan mampu langsung membentuk tunas baru tanpa fase pengkalusan [8]. Berdasarkan uraian tersebut, maka penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan tanaman tebu transforman melalui transformasi genetik menggunakan vektor *A. tumefaciens* yang membawa gen *SoSUT1*. Hasil penelitian ini diharapkan bermanfaat sebagai sumber informasi mengenai transformasi gen *SoSUT1* menggunakan eksplan pangkal tunas tebu *in vitro*.

## METODE PENELITIAN

### Persiapan Eksplan Transformasi

Planlet tebu (*Saccharum officinarum* L.) var. Bulu Lawang (BL) *in vitro* disubkultur setiap 4 minggu sekali dan dipindahkan planlet ke media MS yang baru. Planlet ditempatkan pada ruang inkubasi dan diberi penyinaran dengan lampu TL dengan intensitas cahaya antara  $\pm 2000$  lux. Planlet hasil kultur, bagian basalnya digunakan sebagai eksplan untuk transformasi.

Kultur *Agrobacterium tumefaciens* dan Isolasi DNA Plasmid. Bakteri *A. tumefaciens* yang sebelumnya sudah diinsersi gen *SoSUT1* dalam plasmid *pAct-SoSUT1* diambil 50  $\mu$ l dari gliserol stock untuk diinokulasi ke dalam media YEP selektif (kanamycin 50 mgL<sup>-1</sup>, rifampicin 100 mgL<sup>-1</sup>, streptomycin 30 mgL<sup>-1</sup>) cair 2 ml dan diinkubasi shaker 150 rpm, suhu 28<sup>o</sup>C selama 24 jam. Biakan bakteri diinokulasi sebanyak satu ose dengan cara streak kuadran pada media YEP selektif padat dan diinkubasi pada suhu 28<sup>o</sup>C selama 48 jam.



Gambar 1. Konstruk plasmid pAct-*SoSUT1* LB: left border, RB: right border, P-Nos: promoter nopaline synthetase, hptII: hygromycin phospho transferase gene, T-Nos: terminator nopaline synthetase, Promoter Rice actin, *SoSUT1*: *Saccharum officinarum* sucrose transporter [9].

Konfirmasi keberadaan gen target pada plasmid yang diinsersikan pada *A. tumefaciens* dilakukan dengan teknik isolasi DNA plasmid Rujukan [10]. Pellet DNA yang didapatkan dilarutkan dalam 20  $\mu$ l buffer TE dan diukur konsentrasinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 dan 280 nm. DNA plasmid hasil isolasi digunakan sebagai *template* untuk analisis dengan PCR dan divisualisasi pada 1% gel elektroforesis.

Transformasi Pada Tanaman Tebu Menggunakan Vektor *Agrobacterium tumefaciens*

Eksplan pangkal tunas tebu *in vitro* yang telah dipotong dengan ukuran panjang  $\pm 5$  mm diinfeksi dengan *A. tumefaciens* yang membawa konstruk plasmid *pAct-SoSUT1* dalam media YEP cair 50 ml dengan penambahan *acetosyringone* 100 mgL<sup>-1</sup>. Eksplan ditumbuhkan pada media kokultivasi (MS padat mengandung *acetosyringone* 100 mgL<sup>-1</sup>), diinkubasi pada suhu 25<sup>o</sup>C dalam kondisi gelap selama 3 hari. Eksplan dari media kokultivasi dicuci dengan larutan *cefotaxime* 500 mgL<sup>-1</sup> sebanyak 3 kali dan dibilas dengan akuades steril. Kemudian ditumbuhkan pada media MS padat yang mengandung *cefotaxime* 500 mgL<sup>-1</sup> selama 7 hari pada kondisi terang untuk mengeliminasi *Agrobacterium*. Tahapan seleksi eksplan transforman dilakukan sebanyak 5 kali. Seleksi 1 ditumbuhkan pada media (MS + *cefotaxime* 500 mgL<sup>-1</sup> + *hygromycin* 10 mgL<sup>-1</sup>), seleksi 2-3 pada media (MS + *cefotaxime* 500 mgL<sup>-1</sup> + *hygromycin* 20 mgL<sup>-1</sup>) dan seleksi 4-5 pada (MS + *cefotaxime* 500 mgL<sup>-1</sup> + *hygromycin* 25 mgL<sup>-1</sup>) masing-masing tahapan seleksi membutuhkan waktu selama 21 hari dalam kondisi terang. Selanjutnya planlet putatif transforman diaklimatisasi.

### Isolasi DNA Genom Tanaman

Isolasi DNA genom tanaman dilakukan dengan menggerus 0,5 gram daun tebu menggunakan N<sub>2</sub> cair. Serbuk yang didapatkan ditambahkan 1 ml buffer ekstraksi DNA, 50  $\mu$ l SDS 20% dan 1,25  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol, dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu 65<sup>o</sup>C selama 10 menit. Campuran ditambahkan dengan 500  $\mu$ l Kalium acetat 5M, diinkubasi dalam es selama 10 menit kemudian disentrifugasi 12.000 rpm suhu 4<sup>o</sup>C selama 10 menit. Supernatan yang dihasilkan ditambah dengan 625  $\mu$ l isopropanol, dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu -20<sup>o</sup>C selama 1 jam. Selanjutnya disentrifugasi ulang, supernatan dibuang, pellet yang dihasilkan ditambah dengan 500  $\mu$ l buffer TE dan 15  $\mu$ l RNA-ase (purifikasi DNA), diinkubasi pada suhu 37<sup>o</sup>C selama 1 jam. Campuran ditambah dengan PCI 500  $\mu$ l kemudian disentrifugasi 12.000 rpm suhu 4<sup>o</sup>C selama 10 menit. Supernatan yang dihasilkan ditambahkan chloroform (*equal volume*), divortex lalu disentrifugasi kembali. Supernatan ditambahkan isopropanol dan NaAC, diinkubasi pada suhu -20<sup>o</sup>C selama 1 jam. Kemudian disentrifugasi 12.000 rpm, 4<sup>o</sup>C, selama 10 menit. Pellet dicuci dengan ethanol 70 % 1 ml dan disentrifugasi 12.000 rpm, 4<sup>o</sup>C, selama 10 menit. Supernatan dibuang, pellet dikeringkan dengan *vacuum dry* selama 10 menit. Pellet yang didapatkan dilarutkan dengan 50  $\mu$ l buffer TE. DNA hasil pemurnian diukur konsentrasinya dengan menggunakan spektrophotometer pada panjang gelombang 260 nm dan digunakan untuk analisis PCR.

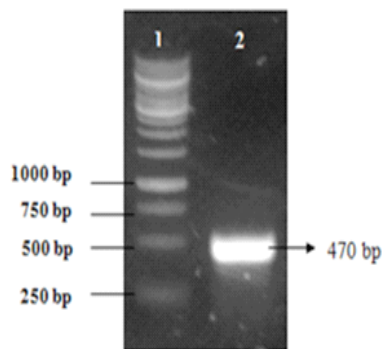
### Analisis PCR (Polymerase Chain Reaction)

Analisis PCR dilakukan dengan menggunakan *Intron Master Mix* yang terdiri dari 2X PCR Master Mix 10  $\mu$ l, primer *forward* dan *reverse* masing-masing 1  $\mu$ l, DNA *template* 2  $\mu$ l dan ddH<sub>2</sub>O 6  $\mu$ l. PCR dilakukan menggunakan primer *forward* (5'-CCGCAAGGAATCG

GTC AATA-3') dan *reverse* (5'-CCCAAGCTGCATC ATCGAAA-3') dari *hptII* (*hygromycin phosphotransferase*) berukuran 470 bp. Proses PCR dilakukan sebanyak 30 siklus yang meliputi tahapan *predenaturation* 94°C selama 2 menit, *denaturation* 94°C selama 20 detik, *annealing* 59°C selama 10 detik, *elongation* 72°C selama 50 detik dan *final elongation* 72°C selama 5 menit. DNA yang telah teramplifikasi oleh PCR dipisahkan dengan 1% agarose gel elektroforesis yang mengandung 3 µl *ethidium bromide* dengan tegangan 100V selama 25 menit. Marker DNA yang digunakan adalah marker 1 Kb *Ladder* (iNtRON BIOTECHNOLOGY) sebanyak 4 µl untuk melihat pita DNA yang telah teramplifikasi. Hasil elektroforesis dilihat di *UV mini transiluminator* dan didokumentasikan.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini didapatkan 24 tanaman tebu putatif transforman dari transformasi pertama sampai ketiga. Proses transformasi dilakukan menggunakan vektor *A. tumefaciens strain* GV 3101 yang membawa konstruk plasmid *pAct-SoSUT1*. Konfirmasi keberadaan plasmid *pAct-SoSUT1* dilakukan melalui analisis PCR dengan menggunakan template DNA plasmid dan primer 1F/1R *hptII*. Berdasarkan hasil elektroforesis DNA plasmid pAct dibandingkan dengan Marker 1 kb DNA Ladder, terlihat pita DNA berukuran 470 bp sesuai dengan panjang DNA *hpt II* yang teramplifikasi dengan primer *forward* dan *reverse hpt II* (Gambar 2.). Hasil tersebut menunjukkan bahwa konstruk *pAct-SoSUT1* telah terinsersi di dalam sel *A. tumefaciens strain* GV 3101.



Gambar 2. Elektroforesis DNA plasmid *A. tumefaciens* GV 3101 *pAct-SoSUT1* menggunakan primer 1F/1R *hptII*. Baris 1 Marker 1 kb Ladder; 2 DNA plasmid

*A. tumefaciens* yang telah membawa konstruk *pAct-SoSUT1* digunakan sebagai vektor transformasi pada tanaman tebu menggunakan pangkal tunas tebu *in vitro* sebagai eksplan transformasi. Penggunaan eksplan tersebut mampu meminimalisasi tingkat variasi somaklonal dan pangkal tunas tebu *in vitro* mampu langsung membentuk tunas baru tanpa fase pengkalusan [8]. Proses transformasi genetik menggunakan *A. tumefaciens* meliputi beberapa tahapan yaitu infeksi, kokultivasi, eliminasi dan seleksi. Eksplan yang telah diinfeksi dengan *A. tumefaciens*

ditumbuhkan pada media kokultivasi yang bertujuan untuk menumbuhkan bersama eksplan dan *A. tumefaciens*. Selama tahapan kokultivasi terjadi integrasi T-DNA ke dalam genom tanaman. *A. tumefaciens* yang telah ditumbuhkan bersama eksplan pada tahap kokultivasi harus dihilangkan agar tidak menghambat pertumbuhan eksplan yang tertransformasi dengan menumbuhkan pada media yang mengandung antibiotik cefotaxime. Pada penelitian ini, eksplan transformasi mampu tumbuh pada media eliminasi yang mengandung antibiotik *cefotaxime* 500 mgL<sup>-1</sup> dan tidak terjadi pertumbuhan berlebih (*overgrowth*) *A. tumefaciens* disekitar eksplan.

Seleksi tanaman transforman dan non transforman dilakukan dengan menumbuhkan eksplan pada media yang mengandung antibiotik *hygromycin* sebagai *selectable marker*. Proses seleksi dilakukan 5 kali untuk meminimalisasi chimera dan escape [11]. Konsentrasi *hygromycin* digunakan secara bertingkat yaitu 10, 20 dan 25 mgL<sup>-1</sup> untuk meningkatkan efektifitas antibiotik *hygromycin* dalam menyeleksi tanaman yang telah ditransformasi. Eksplan yang telah terintegrasi gen *hpt II* yang merupakan gen ketahanan antibiotik *hygromycin* akan mampu bertahan pada media seleksi. Sedangkan eksplan non transforman yang tidak terintegrasi gen ketahanan antibiotik *hygromycin* mengalami pencoklatan (*browning*) dan mati. *Hygromycin* dapat menghambat pertumbuhan tanaman dengan menghambat proses sintesis protein yaitu pada proses translokasi tRNA dan mRNA dengan berikatan dengan faktor elongasi. Sehingga menyebabkan jaringan tanaman mengalami gejala *browning* dan mati [12].

Proses transformasi pada penelitian ini dilakukan sebanyak 3 kali sebagai ulangan. Tiap tahapan transformasi dihitung jumlah eksplan yang mampu tumbuh pada media kokultivasi, eliminasi dan media seleksi untuk mengetahui persentase tanaman yang mampu tumbuh sampai akhir seleksi 5.

Pada transformasi pertama dihasilkan 11,49% sebanyak 10 planlet, transformasi kedua 15,38% sebanyak 10 planlet dan pada transformasi ketiga dihasilkan 10,9% sebanyak 6 planlet. Jumlah eksplan awal 87 pada transformasi pertama, 65 pada transformasi kedua dan 55 pada transformasi ketiga dinyatakan dalam 100%. Berdasarkan persentase jumlah planlet dari masing-masing transformasi tersebut, penggunaan eksplan pangkal tunas tebu *in vitro* menghasilkan efektifitas transformasi yang lebih tinggi dibanding menggunakan eksplan kalus yaitu hanya 1% [6]. Planlet tebu yang telah berhasil melewati seleksi 5 merupakan tanaman putatif transforman dan dilakukan aklimatisasi.

Aklimatisasi bertujuan untuk mengkondisikan tanaman dari kondisi *in vitro* ke lingkungan *in vivo*. Tanaman putatif transforman yang didapatkan dari transformasi pertama dan kedua seluruhnya berhasil diaklimatisasi, masing-masing sebanyak 10 tanaman. Sedangkan pada transformasi ketiga tidak semua tanaman berhasil diaklimatisasi, hanya 4 tanaman yang berhasil diaklimatisasi.



Gambar 3. Aklimatisasi tanaman putatif transforman pada media tanah

Tanaman putatif transforman yang berumur  $\pm$  1 bulan (Gambar 3.) diambil bagian daunnya untuk dilakukan isolasi DNA genom untuk dianalisis.

Keberhasilan transformasi genetik ditentukan oleh terintegrasinya gen target ke dalam genom tanaman dan salah satu metode yang digunakan untuk mengetahui terintegrasinya gen target dapat dilakukan dengan analisis PCR. Berdasarkan elektroforesis DNA hasil PCR, dari 24 tanaman putatif transforman didapatkan 15 tanaman tebu transforman yang positif mengandung mengandung gen *hptIII*, sehingga dapat dikatakan juga mengandung gen target *SoSUTI*. Efektifitas rata-rata transformasi gen *SoSUTI* menggunakan eksplan pangkal tunas tebu *in vitro* adalah sebesar 6,8%. Pada transformasi pertama didapatkan 9 tanaman positif transforman, transformasi kedua didapatkan 3 tanaman positif transforman dan transformasi ketiga didapatkan 3 tanaman. Efektifitas pada masing-masing transformasi berturut-turut sebesar 10,34%, 4,6% dan 5,45%. Kode T1.1, T1.2, T1.3, T1.4, T1.6, T1.7, T1.8, T1.9, T1.10 dari transformasi pertama; kode T2.1, T2.2, T2.4 dari transformasi kedua dan kode T3.2, T3.5, T3.6 dari transformasi ketiga merupakan tanaman tebu positif transforman. Dari 24 tanaman putatif transforman yang dianalisis, terdapat 9 tanaman yang dinyatakan sebagai tebu non transforman dengan tidak terdeteksi adanya pita DNA *hptIII*. Hal ini disebabkan karena adanya perlindungan sel non transforman (*escape*) oleh sel transforman sehingga tanaman tersebut bersifat *chimera* (belum homogen) [13].

## KESIMPULAN DAN SARAN

Hasil analisis PCR menunjukkan bahwa dari 24 tanaman putatif transforman dari transformasi pertama sampai ketiga, didapatkan 15 tanaman positif transforman mengandung gen *hpt II* dan gen *SoSUTI* dengan efektifitas rata-rata transformasi gen *SoSUTI* dalam konstruk plasmid *pAct-SoSUTI* menggunakan eksplan pangkal tunas tebu *in vitro* sebesar 6,8%. Proses analisis tanaman transforman hanya berdasarkan analisis PCR, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai analisis biokimia.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada MP3EI tahun 2012 dan PT. Perkebunan Nusantara XI atas nama

Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc. yang telah membiayai penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- [1] B. B. Buchanan, W. Gruissem and R. L. Jones, "Biochemistry and Molecular Biology of Plants," USA: American Society of plant physiologist (2000).
- [2] N. A. Campbell, J. B. Reece, dan L. G. Mitchell, "Biologi," Jakarta: Erlangga (2000).
- [3] E. Truernit, "Plant Physiology: The Importance of Sucrose transporters," *Current Biology*. Vol. 11 (2001). 169-171.
- [4] Sugiharto, B., Slameto dan Dewanti, P, "Peningkatan Produksi Gula Melalui Overekspresi Gen SPS dan SUT Pada Tanaman Tebu,'. *Laporan Penelitian Hibah Kompetensi*. Jember: Pusat Penelitian Biologi Molekul UNEJ (2008).
- [5] Lessard, Kulaveerasingam, York, Strong , and Sinskey, "Manipulating Gene Expression for The Metabolic Engineering of Plants," *Metabolic Engineering*. Vol. 4 (2004). 67-79.
- [6] A.I. Purnamasari, "Transformasi Tanaman Tebu Tebu (*Saccharum officinarum* L. var BL) Dengan Gen *SoSUTI* Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 dan Eksplan Kalus," *Skripsi*. FMIPA Universitas Jember. Jember (2011).
- [7] M. Hazmi, "Pengembangan Metode Transformasi Melalui *Agrobacterium tumefaciens* Pada Eksplan Pangkal Tunas Tebu *In Vitro*," *Disertasi*. FAPERTA Universitas Brawijaya Malang. (2009).
- [8] H. M. Nadar and D.J. Heinz, "Root and Shoot Development from Sugarcane Callus Tissue," *Crop Sci*. Vol. 17 (1977). 814-816.
- [9] B. Sugiharto, "Peningkatan Produksi Gula Melalui Overekspresi Gen *Sucrose Phosphat Synthase* dan *Sucrose Transporter Protein* Pada Tanaman Tebu," *Laporan Penelitian Hibah Kompetensi*. Jember: Pusat Penelitian Biologi Molekuler UNEJ (2010).
- [10] J. Sambrook, E.F Fritsch and T. Maniatis, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour (1989).
- [11] Manickavasagam, Ganapathi, Anbazhagan, Sudhakar, Selvaraj, Vasudevan and Kasthuriangan, "Agrobacterium Mediated Genetic Transformation and Development of Herbicide Resistant Sugarcane (*Saccharum Species Hybrids*) Using Axillary Buds," *Plant Cell Rep*. Vol. 23 (2004). 134-143.
- [12] L. Gritz, and J. Davies, "Plasmid-encoded Hygromycin B Resistance: The Sequence of Hygromycin B Phosphotransferase Gene and Its Expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*," *Gene*. Vol. 25 (1983). 179-188.
- [12] J. Dong and A. McHughen, "Transgenic Flax Plants from *Agrobacterium* Mediated Transformation" Incidence of Chimeric Regenerants and Inheritance of Transgenic Plants. *Plant Science*, Vol. 91 (1993). 139-148.