

DETEKSI STABILITAS INTEGRASI T-DNA 35S::GR::AtRKD4 PADA GENOM TANAMAN *Dendrobium lineale* Rolfe TRANSGENIK UNTUK INDUKSI EMBRIOGENESIS SOMATIK

Gde Cahyadi Wirajagat
19/447338/PBI/01617

ABSTRAK

Dendrobium lineale Rolfe merupakan salah satu anggrek endemik Papua yang terancam punah dikarenakan overeksploitasi dan degradasi habitatnya akibat aktivitas pembukaan lahan. Status konservasi *D. lineale* berada pada status Appendix II yang berarti populasinya secara alami akan terus menurun jika tetap dieksploitasi. Oleh karena itu tindakan konservasi secara *in situ* maupun *ex situ* perlu dilakukan sebagai upaya menjaga eksistensi *D. lineale*. Propagasi secara massal *D. lineale* dengan kultur *in vitro* merupakan cara yang efektif untuk menjaga kelestariannya di alam. Sejauh ini salah satu metode kultur *in vitro* yang menjanjikan hasil yang optimal adalah melalui embriogenesis somatik. Embriogenesis somatik dapat lebih optimal apabila dikombinasikan dengan insersi gen embrio *AtRKD4* pada genom protokorm tanaman anggrek *D. lineale* dengan menggunakan metode *Agrobacterium-mediated transformation* yang membawa plasmid pTA7002 yang membawa T-DNA pembawa 35S::GR::AtRKD4. Tujuan penelitian ini adalah : 1) mendeteksi integrasi T-DNA pembawa 35S::GR::AtRKD4 pada genom anggrek *D. lineale* transgenik, 2) mengetahui pengaruh pemberian TDZ terhadap induksi embrio somatik pada anggrek *D. lineale* transgenik, 3) mendapatkan organ terbaik sebagai eksplan untuk induksi embrio somatik tanaman anggrek *D. lineale* transgenik pembawa T-DNA 35S::GR::AtRKD4. Metode penelitian meliputi konfirmasi integrasi transgen *AtRKD4* pada genom tanaman transgenik dengan metode PCR, analisis sekuen DNA hasil PCR untuk mendapatkan urutan nukleotida dari transgen *AtRKD4*, kemudian induksi pembentukan embrio somatik pada eksplan daun dan akar anggrek *D. lineale* dengan penambahan TDZ (0, 1, 2, 3 mg. L⁻¹) dan DEX (0, 10, 15, 20 µM) pada medium NP cair selama 5 hari kemudian dipindahkan ke medium NP0 untuk diamati perkembangannya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa transgen *AtRKD4* tetap terintegrasi secara stabil pada genom tanaman *D. lineale* transgenik yang berumur 2 tahun 8 bulan yang didukung dengan hasil analisis sekuen urutan basa transgen *AtRKD4* yang menunjukkan similaritas dengan data urutan sekuen nukleotida gen *RKD4* pada *A. thaliana*. Embrio somatik yang optimal ditunjukkan pada eksplan akar yang diinduksi dengan 2 mg. L⁻¹ TDZ dengan kombinasi 10µM DEX dengan rerata jumlah embrio yang terbentuk adalah 1,39±0,89. Kesimpulan dari penelitian ini adalah T-DNA tetap terintegrasi secara stabil pada genom tanaman *D. lineale* dan mampu menginduksi proses embriogenesis somatik pada akar dengan penambahan kombinasi 2 mg. L⁻¹ TDZ dan 10µM DEX pada medium.

Kata kunci: *Dendrobium lineale*, *AtRKD4*, TDZ, embriogenesis somatik

DETECTION OF INTEGRATION STABILITY OF T-DNA CARRYING 35S::GR::AtRKD4 IN *Denbrobium lineale* Rolfe TRANSGENIC ORCHID GENOME FOR INDUCTION OF SOMATIC EMBRYOGENESIS

Gde Cahyadi Wirajagat
19/447338/PBI/01617

ABSTRACT

Dendrobium lineale Rolfe is one of endemic orchids from Papua which is threatened to be extinct due to overexploitation and degradation of its habitat due to land clearing activities. The conservation status of *D. lineale* is in Appendix II status, which means its population will continue to decline if it is still exploited. Therefore, *in situ* and *ex situ* conservation need to be conducted to maintain the existence of *D. lineale*. Mass propagation of *D. lineale* by *in vitro* culture is an effective way to maintain its sustainability in nature. So far, one of the *in vitro* culture methods that promises optimal results is through somatic embryogenesis. Somatic embryogenesis can be optimized when combined with the insertion of the *AtRKD4* embryo gene into the genome of *D. lineale* orchid's protocorms using Agrobacterium-mediated transformation method carrying the plasmid pTA7002 carrying the T-DNA carrying 35S::GR::AtRKD4. The aims of this study were: 1) to detect the integration of T-DNA carrying 35S::GR::AtRKD4 in the genome of *D. lineale* orchids transgenic, 2) determine the effect of TDZ on somatic embryo induction in *D. lineale* transgenic, and 3) to obtain the best explant which use to induction of somatic embryogenesis from transgenic *D. lineale* orchid carrying T-DNA 35S::GR::AtRKD4. The methods are confirmation of the stable integration of the *AtRKD4* in the transgenic genome using PCR method, Analyses of DNA sequences from PCR results using *AtRKD4* primers, induction of somatic embryogenesis in leaf and root explants of *D. lineale* orchid with the addition of TDZ (0, 1, 2, 3 mg. L⁻¹) and DEX (0, 10, 15, 20 M) in liquid NP medium for 5 days, then transferred to NP0 medium and observed the development within 14 weeks. The results showed that the T-DNA carrying *AtRKD4* gene were stably integrated in the genome of 2 years and 8 months-old *D. lineale* transgenic plants, that supported by the results of the PCR and sequence data which show similarity with the sequence of *RKD4* gene. Induction of somatic embryogenesis as optimally shown in root explants, that induced by a combination between 2 mg. L⁻¹ TDZ and 10µM DEX that induced an average number of embryos of 1.39±0.89. In conclusion, T-DNA remained stably integrated in the *D. lineale* plant genome and was able to induce somatic embryogenesis in roots with the addition of a combination of 2 mg L⁻¹ TDZ and 10µM DEX on medium.

Keywords: *Dendrobium lineale*, TDZ, Somatic Embryogenesis