

Induksi dan Perkembangan Mikrospora Embriogenik Padi (*Oryza sativa* L.
'Segreng')

Siti Nurbaiti
18/436429/SBI/00156

Intisari

Kebutuhan padi sebagai sumber makanan pokok terus mengalami peningkatan seiring dengan bertambahnya populasi penduduk. Budidaya padi dikembangkan untuk memperoleh tanaman unggul secara kualitas dan kuantitas sehingga mampu memenuhi kebutuhan tersebut. Secara *in vitro*, mikrospora yang diberi perlakuan cekaman pelaparan atau starvasi dan suhu, dapat dibelokan dari arah perkembangan gametofit normal ke arah sporofit sehingga menghasilkan embrio dan selanjutnya dapat dikembangkan menjadi tanaman bersifat homozigot atau disebut galur murni, yang bermanfaat dalam pemuliaan tanaman dan studi genetika.

Padi 'Segreng' merupakan kultivar padi lokal berpigmen merah dengan kandungan β -karoten tinggi, tahan kekeringan, dan berumur genjah. Eksplorasi lebih lanjut dapat meningkatkan peluang padi 'Segreng' untuk dijadikan sebagai pangan fungsional dan sumber genetik dalam pemuliaan tanaman padi lainnya. Penelitian ini bertujuan untuk menginduksi embriogenesis mikrospora padi 'Segreng' dengan perlakuan cekaman starvasi karbohidrat menggunakan medium B dan suhu, menganalisis perubahan morfologi dan molekuler terkait ekspresi gen *OsRKD* selama induksi embriogenesis mikrospora, serta menganalisis perkembangan mikrospora embriogenik dalam medium A2 dengan penambahan ZPT. Studi awal dilakukan untuk mendapatkan karakter floret yang mengandung mikrospora tahapan uninukleat untuk sampel kultur *in vitro* yaitu melalui pengamatan preparat basah dengan pewarnaan acetocarmin dan iodin serta melalui preparat awetan yang mewakili bagian pangkal hingga ujung malai. Tahap berikutnya, dilakukan induksi embriogenesis mikrospora. Tiler padi dipanen pada masa bunting dan disimpan pada suhu 4 °C selama 4-7 hari, kemudian antera diisolasi ke medium B sebagai perlakuan starvasi karbohidrat dengan memotong bagian pangkal floret kemudian diinkubasi pada suhu 33 °C selama 4 hari. Respons induksi embriogenesis dihitung berdasarkan persentase mikrospora embriogenik dan non-embriogenik dari mikrospora yang keluar dari antera ke medium B. Selama masa induksi diamati perubahan morfologi mikrospora yang menunjukkan potensi embriogenik. Selain itu, dilakukan deteksi dan analisis ekspresi gen *OsRKD* dengan mengisolasi genom DNA dan isolasi RNA dari mikrospora selama empat hari masa induksi. cDNA disintesis dari RNA kemudian dilakukan analisis ekspresi gen *OsRKD* menggunakan qPCR. Setelah masa induksi, mikrospora embriogenik diisolasi dari antera dan dikultur pada medium A2 dengan variasi ZPT berupa NAA-BA, dan TDZ untuk perkembangan lebih lanjut.

Dari penelitian ini diperoleh hasil respons induksi embriogenesis mikrospora tertinggi dari mikrospora tahap uninukleat tengah-akhir yaitu 80,94%, yang berasal dari floret kelompok U2 dengan warna lemma-palea hijau kuning muda, tinggi stamen setengah dari tinggi lemma-palea, dan memiliki antera berwarna kuning terang. Mikrospora embriogenik tampak seperti tahapan



uninukleat akhir dengan vakuola atau menunjukkan adanya fragmentasi vakuola dan memiliki ukuran sel yang lebih besar dibandingkan mikrospora non-embriogenik. Hasil analisis ekspresi gen *OsRKD* menunjukkan peningkatan dari hari pertama sampai hari ketiga induksi dan menurun pada hari keempat. Mikrospora embriogenik berkembang menjadi struktur multiseluler yang masih diselubungi eksin (proembrio) setelah dipindah ke medium A2. Struktur multiseluler tersebut kemudian keluar setelah eksin pecah dan menghasilkan struktur mirip embrio (ELS) tahap globuler. Penambahan ZPT pada medium A2 berupa NAA-BA 1:3 ppm menghasilkan struktur ELS tahap globuler paling banyak setelah 15 hari inkubasi yaitu mencapai 28%. Namun, ELS tersebut tidak menunjukkan perkembangan lebih lanjut menjadi struktur embrio yang lengkap dan makroskopis yang dapat diregenerasikan.

Kata kunci: Ekspresi gen *OsRKD*, induksi embriogenik, mikrospora, padi 'Segreng', struktur multiseluler

Induction and Development of Embryogenic Microspore in Rice (*Oryza sativa* L. 'Segreng')

Siti Nurbaiti

18/436429/SBI/00156

Abstract

The demand for rice as a staple food will continuously increase along with population growth. Intensive development of rice breeding is conducted to meet these needs. *In vitro* culture of young pollen or microspore with stress treatments could switch gametophytic development pathway into sporophytic pathway producing embryos and homozygous plants which is important for plant breeding and genetic studies.

Rice 'Segreng' is a local cultivar of pigmented rice having high content of β -carotene, tolerance to drought, and a short time of vegetative phase. Exploration on its potential could be an option of functional food and can act as genetic resources for another breeding program of rice. This study aims to induce microspores embryogenesis in rice 'Segreng' with stress treatment which were carbohydrate starvation using medium B and temperature treatment. The changes during microspore embryogenesis induction were analyzed based on morphological characters and early embryogenesis-related gene of *OsRKD*. Previously, the developmental stage of microspore was observed to get characteristics of floret containing uninucleate microspore. It was done by observation in a fresh sample and by acetocarmine and iodine staining. Thereafter, microspore embryogenesis induction was conducted in cold-treated tiller at 4 °C for 4-7 days. Anthers were isolated from the floret and cultured in medium B at 33 °C for 4 days. The response of embryogenesis induction was calculated based on the percentage of embryogenic and non-embryogenic microspores. During stress treatment, RNA was isolated from microspore and synthesized into cDNA to analyze *OsRKD* expression. Gene detection was previously conducted from the DNA genome of rice 'Segreng'. Embryogenic microspores then were isolated from anther and transferred into medium A2 supplemented with NAA-BA, and TDZ for further embryo development.

The result showed that high percentage of embryogenic microspore was resulted from microspore in mid-late uninucleate stage which come from the transparent light yellow green color of lemma-palea, with stamen length less equal to half of lemma-palea length, and bright yellow of anthers. It was 80,94%. Embryogenic microspore showed a big vacuole likely in late uninucleate stage or fragmentation of vacuole and it was bigger than non-embryogenic microspore. Parallel with that characteristic of embryogenic acquisition, the expression of *OsRKD* gene showed an upregulated pattern from the first day until the third day of time induction. Embryogenic microspore developed into multicellular structure inside the exine called proembryo, and then produced embryo-like structure (ELS) after the ruptured exine, which was a globular structure. Medium A2 with NAA-BA 1:3 ppm produced the highest percentage of globular structure after 15 days



incubation up to 28%. However, that globular structure of ELS did not show further development to be a fully develop macroscopic embryo structure which could be regenerated into a plantlet.

Keywords: Embryogenic induction, expression of *OsRKD*, microspore, multicellular structure, rice 'Segreng'