

RINGKASAN

INDUKSI DAN PERKEMBANGAN MIKROSPORA EMBRIOGENIK PADA PADI HITAM TRANSGENIK (*Oryza sativa* L. ‘Cempo Ireng’) OVEREKSPRESI *OsRKD3*

Diajukan kepada Dewan Penguji
Sebagai Pemenuhan Sebagian Persyaratan Gelar Magister of Biotechnology



Meri Handayani
20/467732/PMU/10338

Kepada
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS GADJAH MADA
YOGYAKARTA
2023

disusun oleh:

**INDUKSI DAN PERKEMBANGAN MIKROSPORA EMBRIOGENIK
PADA PADI HITAM TRANSGENIK (*Oryza sativa* L. 'Cempo Ireng')
OVEREKSPRESI *OsRKD3***

Meri Handayani
20/467732/PMU/10338



Disetujui oleh:

Pembimbing Utama,



Dr. Yekti Asih Purwestri, M.Si
NIP.19710523 199803 2002

Pembimbing Pendamping,



Dr. Tri Rini Nuringtyas, S.Si., M.Sc
NIP. 19730327 199903 2002

RINGKASAN

Padi hitam (*Oryza sativa* L) atau ‘Cempo Ireng’ merupakan tanaman sereal yang berperan sebagai sumber bahan makanan pokok sekaligus sebagai pangan fungsional karena mengandung senyawa antosianin yang bermanfaat bagi kesehatan. Grup riset *Pigmented Rice* Universitas Gadjah Mada telah melakukan pemuliaan melalui overekspresi gen *OsRKD3* pada padi hitam ‘Cempo Ireng’. Menurut Nafisa (2021), ‘Cempo Ireng’ transgenik yang telah di overekspresikan gen *OsRKD3* memiliki jumlah *tiller* serta biji lebih banyak dan malai memiliki percabangan lebih banyak sehingga berpotensi memiliki hasil panen yang tinggi. Karakter agronomi ini dapat digunakan untuk seleksi tanaman galur murni. Selain itu, overekspresi gen *OsRKD3* juga menyebabkan sel-sel kalus lebih cepat mengalami embriogenesis somatik dan menghasilkan jumlah embrio somatik yang lebih banyak (Fauzia, 2017) serta terjadinya upregulasi beberapa faktor transkripsi kelompok gen *AP2/ERF* (*APETALA2/ ethylene-responsive elemen binding factors*) diantaranya yaitu *OsERF3* dan *OsAP2* (Purwestri *et al.* (*unpublished data*)). Menurut Chardin *et al.*, (2014) dan Kumar *et al.*, (2018) *RKD* mengatur ekspresi gen yang terlibat dalam gametogenesis atau embriogenesis. Oleh karena itu, menarik untuk dilakukan studi embriogenesis melalui kultur mikrospora untuk membedakan respon mikrospora pada ‘Cempo Ireng’ transgenik overekspresi *OsRKD3* (CI *OsRKD3*) dengan ‘Cempo Ireng’ *wildtype* (CIWT) pada proses embriogenesis mikrospora.

Embryogenesis mikrospora dilakukan dengan memberi cekaman mikrospora pada tahapan uninukleat akhir hingga binukleat awal pada medium starvasi karbohidrat yang mengandung mannitol (Medium B) pada suhu 33°C. Pada tahapan ini dilakukan perhitungan mikrospora embriogenik dan non embriogenik, pengukuran diameter mikrospora, serta analisis

OsERF3 dan *OsAP2*. Mikrospora embriogenik ditransfer ke medium A2 dengan variasi ZPT untuk perkembangan lebih lanjut. Penelitian ini juga melakukan studi awal untuk mengetahui bagaimana karakter spikelet yang mengandung mikrospora pada tahapan uninukleat akhir hingga binukleat awal, serta karakter tiller yang memiliki spikelet yang mengandung mikrospora pada tahapan tersebut.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa tahapan perkembangan mikrospora uninukleat akhir hingga binukleat awal terdapat pada spikelet yang relatif terletak di bagian tengah malai, kulit lemma dan palea tipis tapi lebih tebal dari spikelet level 1, spikelet masih terlihat terang dan transparan, warna spikelet kuning hingga hijau cerah, ukuran antera kecil, panjang stamen di dalam spikelet kurang dari setengah hingga setengah panjang spikelet. Tiller yang banyak memiliki karakter spikelet tersebut adalah kelompok tiller dengan panjang ruang kosong minimal seperti panjang jarak daun bendera dengan daun kedua. Mikrospora embriogenik tipe 3 terdapat banyak pada hari ke-3 inkubasi di medium B dengan persentase 31% pada CI *OsRKD3* dan 18% pada CIWT. Diameter mikrospora semakin membesar dari hari ke-1 hingga hari ke-4 inkubasi di medium B. Hari ke-4 di medium B, diameter pada CI *OsRKD3* sebesar 52,91 μm dan pada CIWT sebesar 55,01 μm . Mikrospora embriogenik CI *OsRKD3* dapat berkembang menjadi mikrokalus pada medium A2 dengan tambahan ZPT 1 ppm NAA: 3 ppm GA. Mikrospora embriogenik CIWT dapat berkembang menjadi struktur multiseluler yang masih dalam eksin (proembrio) dan embryo-like structures (ELS) yang sudah keluar dari dinding eksin mikrospora pada medium A2 dengan tambahan ZPT 1 ppm NAA: 0.1 ppm GA.

Analisis ekspresi gen dilakukan terhadap kelompok faktor transkripsi AP2/ERF yaitu *OsERF3* dan *OsAP2*. Hasil menunjukkan bahwa ekspresi gen *OsERF3* pada hari ke-4 inkubasi



UNIVERSITAS
GADJAH MADA

INDUKSI DAN PERKEMBANGAN MIKROSPORA EMBRIOGENIK PADA PADI HITAM TRANSGENIK (*Oryza sativa* L.

Ã¢ï¿½ï¿½Cempo

IrengÃ¢ï¿½ï¿½) OVEREKSPRESI *OsRKD3*

MERI HANDAYANI, Dr. Yekti Asih Purwestri, S.Si., M.Si; Dr. Tri Rini Nuringtyas, S.Si., M.Sc

Universitas Gadjah Mada, 2023 | Diunduh dari <http://etd.repository.ugm.ac.id/>

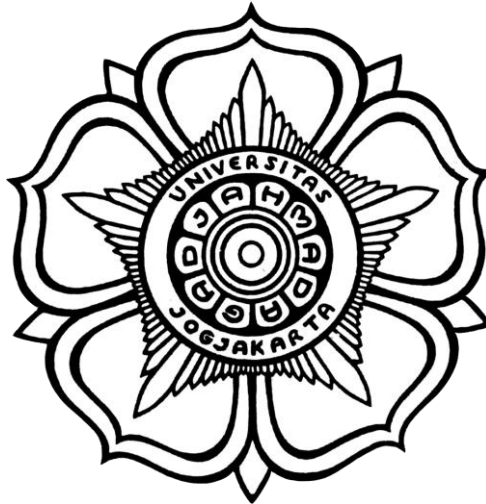
di medium B lebih tinggi 5,79 kali pada CI *OsRKD3* dibandingkan dengan CIWT. Ekspresi

gen *OsAP2* pada CI *OsRKD3* relatif rendah dibandingkan dengan CIWT pada hari ke-1 hingga hari ke-4 induksi embryogenesis di medium B. Belum ada penelitian sebelumnya mengenai keterlibatan *OsAP2* selama proses embryogenesis mikrospora yang diinduksi dengan cekaman sehingga diperlukan studi lebih lanjut untuk mengetahui peran *OsAP2* pada proses tersebut.

SUMMARY

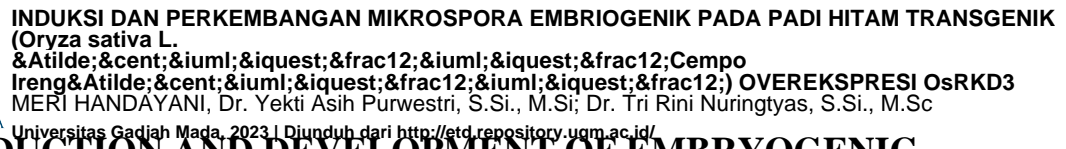
INDUCTION AND DEVELOPMENT OF EMBRYOGENIC MICROSPORES IN TRANSGENIC BLACK RICE (*Oryza Sativa* L. 'CEMPO IRENG') OVEREXPRESSION OF *OsRKD3*

Submitted to the Board of Examiners as Partial Fulfillment of
the Requirements for Master of Biotechnology



Meri Handayani
20/467732/PMU/10338

To:
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS GADJAH MADA
YOGYAKARTA
2023



Dr. Tri Rini Nuringtyas, S.Si., M.Sc
NIP. 19730327 199903 2002



SUMMARY

Black rice (*Oryza sativa* L) or 'Cempo Ireng' is a cereal plant that acts as a source of staple food as well as functional food because it contains anthocyanin compounds that are beneficial for health. Gadjah Mada University's Pigmented Rice research group has conducted breeding through overexpression of the *OsRKD3* gene in 'Cempo Ireng' black rice. According to Nafisa (2021), transgenic 'Cempo Ireng' that has been overexpressed by the *OsRKD3* gene has more tiller and seeds and panicles have more branching so that it has the potential to have high yields. These agronomic characters can be used for plant selection of pure strains. In addition, overexpression of the *OsRKD3* gene also causes callus cells to undergo somatic embryogenesis faster and produce more significant number of somatic embryos (Fauzia, 2017) and the upregulation of several transcription factors of the AP2/ERF gene group (APETALA2/ ethylene-responsive element binding factors) including *OsERF3* and *OsAP2* (Purwestri et al. (unpublished data)). According to Chardin et al. (2014) and Kumar et al. (2018) RKD regulates the expression of genes involved in gametogenesis or embryogenesis. Therefore, it is interesting to study embryogenesis through microspore culture to distinguish the response of microspores in 'Cempo Ireng' transgenic overexpression of *OsRKD3* (CI *OsRKD3*) with 'Cempo Ireng' wildtype (CIWT) in the process of microspore embryogenesis.

Microspore embryogenesis was performed by stressing microspores at the late uninucleate to early binucleate stages in carbohydrate starvation medium containing mannitol (Medium B) at 33°C. At this stage, embryogenic and non-embryogenic microspores were counted, microspore diameter was measured, and expression analysis of genes upregulated in 'Cempo Ireng' transgenic



UNIVERSITAS
GADJAH MADA

INDUKSI DAN PERKEMBANGAN MIKROSPORA EMBRIOGENIK PADA PADI HITAM TRANSGENIK
(*Oryza sativa* L.
Ã¢ï¿½ï¿½Cempo
IrengÃ¢ï¿½ï¿½) OVEREKSPRESI *OsRKD3*
MERI HANDAYANI, Dr. Yekti Asih Purwestri, S.Si., M.Si; Dr. Tri Rini Nuringtyas, S.Si., M.Sc
Universitas Gadjah Mada, 2023 | Diunduh dari <http://etd.repository.ugm.ac.id/>

overexpression of *OsRKD3*, namely *OsERF3* and *OsAP2*. Embryogenic microspores were transferred to A2 medium with various ZPT for further development. This research also conducted an initial study to determine how the character of spikelets containing microspores at the late uninucleate to early binucleate stages, as well as the character of tiller that has spikelets containing microspores at these stages.

The results showed that the developmental stages of late uninucleate to early binucleate microspores were observed in spikelets that were relatively located in the center of the panicle, thin lemma and palea skin but thicker than level 1 spikelets, spikelets still look bright and transparent, yellow to bright green spikelet color, small anther size, stamen length inside the spikelet less than half to half the spikelet length. The tiller that has many of these spikelet characters is the tiller group with a minimum empty space length such as the length of the distance between the flag leaf and the second leaf. Type 3 embryogenic microspores were abundant on day 3 of incubation in medium B with a percentage of 31% in CI *OsRKD3* and 18% in CIWT. The diameter of microspores increased from day 1 to day 4 of incubation in medium B. On day 4 in medium B, the diameter of CI *OsRKD3* was 52.91 μm and that of CIWT was 55.01 μm . Embryogenic microspores of CI *OsRKD3* can develop into microcallus on medium A2 with additional ZPT 1 ppm NAA: 3 ppm GA. CIWT embryogenic microspores can develop into multicellular structures that are still in the exine (proembryo) and embryo-like structures (ELS) that have come out of the microspore exine wall on medium A2 with the addition of ZPT 1 ppm NAA: 0.1 ppm GA.

Gene expression analysis was performed on the AP2/ERF transcription factor group, namely *OsERF3* and *OsAP2*. The results showed that *OsERF3* gene expression on the 4th day of incubation in medium B was 5.79 times higher in CI *OsRKD3* compared with CIWT. *OsAP2* gene



UNIVERSITAS
GADJAH MADA

INDUKSI DAN PERKEMBANGAN MIKROSPORA EMBRIOGENIK PADA PADI HITAM TRANSGENIK (*Oryza sativa* L.

Ã¢ï¿½ï¿½Cempo

IrengÃ¢ï¿½ï¿½) OVEREKSPRESI *OsRKD3*

MERI HANDAYANI, Dr. Yekti Asih Purwestri, S.Si., M.Si; Dr. Tri Rini Nuringtyas, S.Si., M.Sc

Universitas Gadjah Mada, 2023 | Diunduh dari <http://etd.repository.ugm.ac.id/>

expression in CI *OsRKD3* was relatively low compared to CIWT on day 1 to day 4 of embryogenesis induction in medium B. There has been no previous study on the involvement of *OsAP2* during the process of microspore embryogenesis induced by stress, so further studies are needed to determine the role of *OsAP2* in the process.