

## Penyisipan Gen *Hd3a* pada Padi Hitam (*Oryza sativa* L. ‘Cempo Ireng’) melalui *Agrobacterium tumefaciens* untuk Percepatan Pembungaan

Raden Roro Rifka Annisa

Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 55231

### INTISARI

Padi hitam (*Oryza sativa* L. ‘Cempo Ireng’) merupakan salah satu kultivar padi dari Daerah Istimewa Yogyakarta yang memiliki potensi menjadi pangan unggul dengan nilai nutrisi yang tinggi. Waktu panen yang lama (5-6 bulan) membuat produktivitas beras menjadi rendah, sehingga upaya percepatan pembungaan menjadi penting untuk dilakukan. Salah satu upaya yang dapat dilakukan yaitu introduksi gen pembungaan *Hd3a* ke dalam tanaman. Pada penelitian ini, penyisipan gen *Hd3a* dilakukan dengan mediasi *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 pembawa konstruksi *RPP16::Hd3a-GFP*. Selain itu, dilakukan pula optimasi konsentrasi 2,4-d serta sukrosa untuk medium induksi kalus, optimasi medium regenerasi kalus, serta umur kalus dan konsentrasi Cefotaxime terbaik untuk mendukung transformasi genetik.

Optimasi medium induksi kalus dilakukan pada konsentrasi 2,4-d sebesar 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; dan 3 mg/L dan konsentrasi sukrosa sebesar 0, 10, 20, 30, dan 40 g/l. Tahapan transformasi yang dilakukan antara lain: 1) Inisiasi kalus dari biji padi pada medium 2N6 + 2,4-d; 2) Perendaman kalus pada kultur cair *Agrobacterium tumefaciens*; 3) Ko-kultivasi kalus dengan *Agrobacterium* pada medium 2N6 dengan penambahan asetosiringon; 4) Eliminasi *Agrobacterium* dengan Cefotaxime; 5) Seleksi kandidat transforman pada medium seleksi dengan penambahan Higromisin; dan 6) Konfirmasi integrasi gen pada kalus dilakukan menggunakan primer spesifik gen *Hd3a* dan *HPT*. Umur kalus 1 dan 2 minggu dipelajari untuk mengetahui umur optimum kalus untuk transformasi. Konsentrasi Cefotaxime 400 dan 500 mg/l juga dipelajari untuk mengetahui konsentrasi optimum untuk eliminasi *Agrobacterium*.

Berdasarkan hasil yang diperoleh, konsentrasi 2,4-d 2 mg/l dan sukrosa 30 g/l merupakan konsentrasi optimum untuk medium induksi kalus karena menghasilkan frekuensi induksi kalus dan berat kalus tertinggi. Kalus berumur 1 minggu lebih baik digunakan untuk transformasi karena dapat memfasilitasi integrasi gen sisipan, memiliki survivabilitas yang lebih tinggi pada medium seleksi, serta memiliki waktu yang lebih pendek untuk induksi. Konsentrasi Cefotaxime 400 mg/l lebih baik digunakan untuk eliminasi *Agrobacterium* karena dapat menekan pertumbuhan *Agrobacterium* dengan baik, mampu memfasilitasi integrasi gen sisipan, serta lebih mendukung survivabilitas kalus pada medium seleksi. Media MS + 3 mg/l BAP + 1 mg/l Kin + 0,5 mg/l NAA dapat digunakan untuk regenerasi kalus, namun kombinasi dan konsentrasi ZPT lain perlu dieksplorasi untuk mendapatkan frekuensi regenerasi yang tinggi.

Kata Kunci: *Agrobacterium tumefaciens*, Cempo Ireng, *Hd3a*, Transformasi Genetik

## ***Hd3a* Gene Insertion in Black Rice (*Oryza sativa* L. 'Cempo Ireng') through *Agrobacterium tumefaciens* to Accelerate Flowering**

Raden Roro Rifka Annisa

Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 55231

### ABSTRACT

Black rice (*Oryza sativa* L. 'Cempo Ireng') is a rice cultivar from the Special Region of Yogyakarta, Indonesia that has the potential to become a superior food source due to its high nutritional value. However, its long harvest period (5-6 months) results in low rice productivity, thus, efforts to accelerate flowering become important. One approach to achieve this is the introduction of the *Hd3a* flowering gene into the plant. In this study, the insertion of the *Hd3a* gene was mediated by *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 carrying the *RPP16::Hd3a-GFP* construct. Additionally, optimization of 2,4-d and sucrose concentrations for callus induction medium, optimization of callus regeneration medium, and determination of the best callus age and Cefotaxime concentration to support genetic transformation were conducted.

For callus induction medium optimization, 2,4-d concentrations of 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, and 3 mg/L and sucrose concentrations of 0, 10, 20, 30, and 40 g/L were studied. The transformation steps included: 1) Callus initiation from rice seeds on 2N6 + 2,4-d medium; 2) Immersion of callus in *Agrobacterium* liquid culture; 3) Co-cultivation of callus with *Agrobacterium* on 2N6 medium with acetosyringone addition; 4) Elimination of *Agrobacterium* with Cefotaxime; 5) Selection of transformant candidates on selection medium with Hygromycin addition; and 6) Confirmation of gene integration in callus using specific primers for the *Hd3a* and *HPT* genes. Callus ages of 1 and 2 weeks were studied to determine the optimal age for transformation. Cefotaxime concentrations of 400 and 500 mg/L were also studied to determine the optimal concentration for *Agrobacterium* elimination.

Based on the results, the optimal concentrations for callus induction medium were 2 mg/L of 2,4-d and 30 g/L of sucrose, as these concentrations yielded the highest callus induction frequency and callus weight. One-week-old callus was better suited for transformation because it facilitated gene insert integration, had higher survivability on selection medium, and required a shorter time for induction. Cefotaxime concentration of 400 mg/L was more effective for *Agrobacterium* elimination as it effectively suppressed *Agrobacterium* growth, facilitated gene insert integration, and better supported callus survivability on selection medium. The medium MS + 3 mg/L BAP + 1 mg/L Kin + 0.5 mg/L NAA could be used for the callus regeneration though other combinations and concentrations of plant growth regulators should be explored to achieve high regeneration frequency.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*, Cempo Ireng, *Hd3a*, Genetic Transformation