Induksi Mutasi Gen GAI dengan Sistem CRISPR/Cas9 Genome Editing untuk Pembuatan Anggrek Vanda
tricolor Lindl. Mini
Aviesta Linggabuwana, Prof. Dr. Endang Semiarti, M.S., M.Sc.; Prof. Dr. Yekti Asih Purwestri, S.Si., M.Si.
Universitas Gadjah Mada, 2026 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

INDUKSI MUTASI GEN *GAI* DENGAN SISTEM CRISPR/*Cas9* *GENOME EDITING* UNTUK PEMBUATAN ANGGREK *Vanda tricolor* Lindl. MINI

Intisari

Vanda tricolor merupakan spesies anggrek yang memiliki nilai estetika dan ekonomi tinggi, tetapi ukuran tanamannya yang besar membatasi efisiensi penanganan, transportasi, dan pemanfaatan ruang. Penyuntingan genom menggunakan sistem CRISPR/*Cas9* yang menargetkan gen *GAI* pada domain protein DELLA, sebagai regulator utama jalur pensinyalan hormon giberelin, merupakan strategi yang menjanjikan dengan tujuan untuk menghasilkan varietas anggrek kerdil tanpa menghilangkan karakter hortikultura unggulnya. Tahapan penelitian meliputi optimasi perkecambahan biji secara *in vitro*, karakterisasi gen *GAI*, desain dan konstruksi sgRNA ke dalam vektor pRGEB32, transformasi plasmid ke *A. tumefaciens* strain GV3101, serta transformasi genetik pada protokorm melalui metode perendaman. Keberhasilan transformasi dikonfirmasi melalui deteksi gen *Cas9* menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR), sedangkan mutasi pada gen *GAI* diverifikasi melalui analisis sekuens DNA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa media NP + ekstrak tomat 100 g/L merupakan media yang paling optimum untuk perkecambahan biji dan perkembangan protokorm. Penambahan asetosiringon konsentrasi 100 µM menghasilkan efisiensi transformasi tertinggi, yaitu 7.60%. Analisis molekuler mengonfirmasi integrasi konstruksi CRISPR/*Cas9* ke dalam genom *V. tricolor* serta mengidentifikasi mutasi berupa substitusi, insersi, dan pembentukan kodon stop awal pada gen *GAI* yang terbentuk melalui mekanisme perbaikan DNA *non-homologous end joining* (NHEJ). Tanaman transforman menunjukkan fenotip kerdil awal yang ditandai dengan ukuran tanaman lebih kecil dibandingkan tanaman *wild type*, sehingga mengindikasikan keberhasilan penyuntingan genom. Penelitian ini merupakan penelitian awal mengenai penyuntingan gen *GAI* menggunakan sistem CRISPR/*Cas9* pada *V. tricolor* untuk menghasilkan varietas anggrek mini. Hasil penelitian ini memberikan landasan yang kuat bagi pengembangan *precision breeding* pada anggrek serta menawarkan strategi untuk menghasilkan varietas anggrek hias mini yang diharapkan dapat meningkatkan efisiensi budidaya dan nilai komersial serta menekan biaya transportasi.

Kata kunci: Anggrek, CRISPR/*Cas9*, *GAI*, Kerdil, *Vanda tricolor*.

Induksi Mutasi Gen GAI dengan Sistem CRISPR/Cas9 Genome Editing untuk Pembuatan Anggrek Vanda
tricolor Lindl. Mini
Aviesta Linggabuwana, Prof. Dr. Endang Semiarti, M.S., M.Sc.; Prof. Dr. Yekti Asih Purwestri, S.Si., M.Si.
Universitas Gadjah Mada, 2026 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

INDUCTION OF *GAI* GENE MUTATION USING CRISPR/*Cas9* GENOME EDITING FOR GENERATE *Vanda tricolor* Lindl. MINI ORCHID

Abstract

Vanda tricolor is an orchid species with high ornamental and economic value; however, its large plant size limits handling efficiency, transportation, and space utilization. Genome editing using the CRISPR/*Cas9* system targeting the DELLA domain of the *GAI* gene, a key regulator of the gibberellin signaling pathway, represents a promising strategy with the aim of generating dwarf orchid varieties while preserving their desirable horticultural characteristics. The experimental workflow included in vitro seed germination optimization, *GAI* gene characterization, sgRNA design and construction into the pRGEB32 vector, plasmid transformation into *A. tumefaciens* strain GV3101, and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of protocorms using the immersion method. Successful transformation was confirmed by detecting the *Cas9* gene using polymerase chain reaction (PCR), whereas targeted mutations in the *GAI* gene were verified by DNA sequence analysis. The results demonstrated that NP medium supplemented with 100 g L^{-1} tomato extract provided the optimal conditions for seed germination and protocorm development. Supplementation with 100 µM acetosyringone achieved the highest transformation efficiency, reaching 7.60%. Molecular analysis confirmed the integration of the CRISPR/*Cas9* construct into the *V. tricolor* genome and identified targeted mutations, including substitutions, insertions, and premature stop codon formation, in the *GAI* gene generated through the non-homologous end joining (NHEJ) DNA repair pathway. Transformed plants exhibited an early dwarf phenotype, characterized by a smaller plant size than the wild type, indicating successful genome editing. This study presents the first investigation of *GAI* gene editing using the CRISPR/*Cas9* system in *V. tricolor* for miniature orchid development. The findings provide a solid foundation for precision breeding in orchids and propose a promising strategy for developing compact ornamental orchid varieties that are expected to improve cultivation efficiency, enhance commercial value, and reduce transportation costs.

Keywords: CRISPR/Cas9, Dwarf, *GAI*, Orchid, *Vanda tricolor*