

**FUNCTIONAL ANALYSIS OF
Phalaenopsis aphrodite Flowering locus T1 FLOWERING GENE
ON TOBACCO PLANT (*Nicotiana tabacum* L.)**

ABSTRACT

Flowering gene *Phalaenopsis aphrodite* Flowering locus T1 (*PaFT1*) is an *FT* homologous gene isolated from *Phalaenopsis aphrodite* orchid that originally from Taiwan. This gene is predicted as the key genes for flowering initiation in orchids. This research was carried out to get more informations about the function of *PaFT1* gene in accelerating flowering time, so it can be used to induce early flowering on orchid plants and other horticultural plants and shorten the long vegetative.

The methods of this study include 7 steps as follows: 1) Isolation of p35S::PaFT1-35S::GFP from transformant cells of *E. coli* containing the 35S::PaFT1-35S::GFP construct harboring *PaFT1*, *GFP*, and *NPT II* gene; 2) Confirmation of *PaFT1*, *GFP*, and *NPT II* genes on p35S::PaFT1-35S::GFP from *E. coli*; 3) Insertion of 35S::PaFT1-35S::GFP DNA construct into T-DNA of Ti plasmid of *A. tumefaciens* EHA 101; 4) Confirmation of the insertion result of plasmid carrying 35S::PaFT1-35S::GFP from transformation result at *A. tumefaciens*. 5) Resistancy analysis of tobacco plant to kanamycin antibiotics; and 6) Infection of *A. tumefaciens* EHA 101 carrying 35S::PaFT1-35S::GFP into tobacco plant's leaves. 7) Analysis the phenotype and molecular of positive transformant plants that harbor 35S::PaFT1-35S::GFP in its genomes. The resistance of plants to kanamycin, determined by lethal doses (LD₅₀) using kanamycin variations of 0, 25, 50, 75, 100, 150 mg.L⁻¹. Growth and development of transformant plant containing *PaFT1* gene were analyzed for their phenotype (morphology and anatomic structure) and molecular (gene expression, cell's fluorescency/glowing, and protein profile) to determine the function of *PaFT1* gene in tobacco.

The results showed that non tobacco plants derived from *in vitro* leaf culture on MS medium and flowered after 178 days, while the transformant plant of T-DNA carrier with 35S :: PaFT1 :: GFP flowered at 154 days after inoculation of explant. The T-DNA construct carrying 35S::PaFT1-35S::GFP has been integrated into the DNA of the tobacco plant genomes by the presence of 600 bp *PaFT1*, 350 bp *GFP*, and 200 bp *NPT II* bands. LD₅₀ was obtained at concentration of 50 mg.L⁻¹ and used for selection of plants of transformant candidates. Based on the amplification of genomic DNA of transformant plants by using specific primers for *PaFT1*, *GFP*, *NPT II* gene, and based on the fluorescent visualization analysis of transformants plant with UV light, it was detected that frequency of transformation was 16 %. GFP gene expression on a transformant plant carrying 35S::PaFT1-35S::GFP indicates that overexpression of *PaFT1* flowering gene was occurred. This was also proofed by the evidence that flowering rate of transformant plants carrying

35S::PaFT1-35S::GFP was 24 days faster/ earlier than that of non-transformant plants. The *PaFT1* transgene has been integrated into tobacco genome and has functionally shown the acceleration of flowering.

Keywords: *PaFT1*, *GFP*, *Agrobacterium tumefaciens*, flowering, *Nicotiana tabacum* L.

**ANALISIS FUNGSI GEN PEMBUNGAAN
Phalaenopsis aphrodite Flowering locus T1 PADA TANAMAN
TEMBAKAU (*Nicotiana tabacum* L.)**

INTISARI

Gen pembungaan *Phalaenopsis aphrodite* Flowering locus T1 (*PaFT1*) merupakan gen homolog *FT* yang diisolasi dari *Phalaenopsis aphrodite* asal Taiwan. Gen ini diprediksi sebagai gen kunci dalam inisiasi pembungaan pada anggrek. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan informasi tentang fungsi gen *PaFT1* dalam peningkatan kecepatan pembungaan, sehingga dapat digunakan untuk menginduksi pembungaan secara cepat pada tanaman anggrek dan tanaman hortikultura lainnya yang memiliki masa vegetatif yang panjang.

Metode penelitian ini meliputi 7 tahapan, yaitu: 1) Isolasi p35S::*PaFT1*-35S::*GFP* dari sel-sel transforman *E. coli* DH5 α yang mengandung gen *PaFT1*, *GFP*, dan *NPT II*; 2) Konfirmasi keberadaan gen *PaFT1*, *GFP*, dan *NPT II* pada p35S::*PaFT1*-35S::*GFP* dari *E. coli* DH5 α ; 3) Penyisipan konstruksi DNA 35S::*PaFT1*-35S::*GFP* ke dalam T-DNA pada Ti plasmid *Agrobacterium tumefaciens* EHA 101; 4) Konfirmasi hasil penyisipan plasmid pembawa 35S::*PaFT1*-35S::*GFP* hasil transformasi pada *A. tumefaciens*; 5) Analisis resistensi tanaman tembakau terhadap antibiotik kanamisin; 6) Infeksi *A. tumefaciens* EHA 101 pembawa 35S::*PaFT1*-35S::*GFP* ke dalam tanaman tembakau; 7) Analisis fenotip dan molekular tanaman transforman yang positif pembawa 35S::*PaFT1*-35S::*GFP* pada genomnya. Analisis resistensi tanaman terhadap kanamisin, yang ditentukan berdasarkan *lethal doses* (LD₅₀) menggunakan variasi konsentrasi kanamisin 0, 25, 50, 75, 100, 150 mg.L⁻¹. Pertumbuhan dan perkembangan tanaman transforman pembawa gen *PaFT1* dianalisis fenotipnya (morfologi dan struktur anatomis) maupun molekularnya (ekspresi gen, analisis fluoresen) untuk mengetahui fungsi gen *PaFT1* tersebut pada tanaman tembakau.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa tanaman tembakau non transforman yang berasal dari kultur *in vitro* daun pada medium MS dan dapat berbunga setelah 178 hari, sedangkan tanaman transforman pembawa T-DNA dengan 35S::*PaFT1*::*GFP* berbunga pada umur 154 hari setelah inokulasi eksplan. T-DNA pembawa konstruksi DNA 35S::*PaFT1*-35S::*GFP* telah terintegrasi ke dalam DNA genom tanaman tembakau dengan terdeteksinya keberadaan pita *PaFT1* sebesar 600 bp, *GFP* 350 bp, dan *NPT II* 200 bp pada genom tembakau. LD₅₀ diperoleh pada konsentrasi 50 mg.L⁻¹ dan digunakan untuk seleksi tanaman kandidat transforman. Berdasarkan amplifikasi DNA genom tanaman tembakau transforman dengan primer spesifik untuk gen *PaFT1*, *GFP*, *NPT II*, dan analisis visualisasi fluoresen tanaman transforman dengan sinar UV, dideteksi frekuensi transformasinya sebesar 16 %. Ekspresi gen *GFP* pada tanaman transforman

pembawa 35S::PaFT1-35S::GFP menunjukkan telah terjadi overekspresi gen pembungaan *PaFT1*. Hal ini dibuktikan dengan kecepatan pembungaan pada tanaman transforman 35S::PaFT1-35S::GFP 24 hari lebih cepat/awal dibandingkan tanaman non transforman. Transgen *PaFT1* yang telah terintegrasi ke dalam DNA genom tembakau secara fungsional telah menunjukkan percepatan pembungaan.

Kata Kunci: *PaFT1*, *GFP*, *Agrobacterium tumefaciens*, pembungaan, *Nicotiana tabacum* L.



UNIVERSITAS
GADJAH MADA

**ANALISIS FUNGSI GEN PEMBUNGAAN *Phalaenopsis aphrodite* Flowering locus T1 PADA
TANAMAN TEMBAKAU
(*Nicotiana tabacum* L.)**

Sri Wahyuningsih, Dr. Endang Semiarti, M.S., M.Sc.; Prof. Dr. Sukarti Moeljopawiro, M.App.Sc.; Dr. Budi Setiadi Dary
Universitas Gadjah Mada, 2018 | Diunduh dari <http://etd.repository.ugm.ac.id/>



UNIVERSITAS
GADJAH MADA

**ANALISIS FUNGSI GEN PEMBUNGAAN *Phalaenopsis aphrodite* Flowering locus T1 PADA
TANAMAN TEMBAKAU
(*Nicotiana tabacum* L.)**

Sri Wahyuningsih, Dr. Endang Semiarti, M.S., M.Sc.; Prof. Dr. Sukarti Moeljopawiro, M.App.Sc.; Dr. Budi Setiadi Dary
Universitas Gadjah Mada, 2018 | Diunduh dari <http://etd.repository.ugm.ac.id/>