

**INDUKSI EMBRIOGENESIS SOMATIK TANAMAN ANGGREK
Phalaenopsis "Sogo Vivien" MELALUI PENYISIPAN GEN *AtRKD4*
DENGAN *Agrobacterium tumefaciens***

INTISARI

Phalaenopsis "Sogo Vivien" merupakan anggrek hibrida unggul dengan ukuran mini dan memiliki bunga yang indah dengan percabangan infloresensia yang banyak sehingga memenuhi kriteria sebagai tanaman hias dalam pot. Produksi massal yang identik dengan induknya dalam waktu yang cepat, dibutuhkan untuk memenuhi permintaan pasar. Perbanyakan anggrek melalui penyisipan gen telah banyak dilakukan. Tujuan penelitian ini adalah untuk menginduksi pembentukan embrio somatik dengan cara menyisipkan gen *RWP-RK Domain-containing4 (RKD4)* yang diisolasi dari *Arabidopsis thaliana* (gen *AtRKD4*) ke genom Anggrek *Phalaenopsis* "Sogo Vivien".

Penelitian dengan menggunakan sistem ekspresi yang diinduksi dengan glukokortikoid *dexamethasone* (DEX) ini dilakukan dalam beberapa tahap penelitian, yaitu 1) Penentuan target transformasi genetik pada *P. "Sogo Vivien"*; 2) Resistensi protokorm terhadap higromisin; 3) Penentuan waktu inokulasi *Agrobacterium tumefaciens* pembawa *pTA7002-35S::GR::AtRKD4* pada protokorm; 4) Penentuan efisiensi transformasi *35S::GR::AtRKD4* pada *P. "Sogo Vivien"*; 5) Penentuan konsentrasi DEX yang tepat dan respon organ tanaman transforman yang terbaik untuk induksi embriogenesis somatik. Protokorm yang berasal dari biji hasil *self-pollination* maupun *backcross pollination* ditanam pada variasi medium NP, MS dan VW. *Plb* diinduksi dari eksplan daun dan akar dari *plantlet* hasil pertumbuhan tunas pada nodus tangkai bunga. Uji resistensi dilakukan pada protokorm umur 21 hari yang ditanam pada medium seleksi dengan variasi konsentrasi higromisin. Transformasi genetik dilakukan dengan variasi waktu inokulasi, yaitu 0,5; 1;2; dan 3 jam. Overekspresi gen dilakukan dengan sistem ekspresi yang diinduksi oleh glukokortikoid DEX pada potongan daun, batang dan akar *plantlet* transforman. Selanjutnya dilakukan analisis terhadap struktur anatomi, keberadaan mRNA *AtRKD4* dengan PCR, maupun perkembangan embrio somatik yang terbentuk.

Berdasarkan hasil yang diperoleh protokorm pada medium NP memberikan respon pertumbuhan yang terbaik, dan memperlihatkan 6 fase perkembangan embrio. Eksplan daun hanya menghasilkan kalus non embriogenik, sedangkan akar menghasilkan embrio somatik dengan persentase yang rendah, sehingga protokorm dipilih sebagai target transformasi. Uji resistensi menunjukkan bahwa higromisin 10 mg.L⁻¹ menyebabkan persentase kematian protokorm mendekati LD₅₀, maka konsentrasi ini dipakai untuk tahap seleksi tanaman transforman. Waktu inokulasi 1 jam merupakan perlakuan yang optimum untuk transformasi protokorm *P. "Sogo Vivien"*. Penyisipan gen *AtRKD4* dalam konstruksi *35S::GR::AtRKD4* menghasilkan efisiensi transformasi rata-rata sebesar 0,63%. Sebanyak 34 protokorm kandidat transforman yang bertunas, 20 diantaranya mampu beregenerasi menjadi *plantlet*. Konfirmasi keberhasilan

integrasi gen *At-RKD4* dengan metode PCR menunjukkan bahwa 100% kandidat transforman positif membawa transgen *AtRKD4* dengan ukuran pita ± 380 bp dan *HPT* yang berukuran ± 500 bp. Overekspresi gen ditunjukkan dengan adanya pembentukan embrio somatik maupun akumulasi mRNA *AtRKD4* pada potongan daun dan batang tanaman transforman setelah diinduksi dengan DEX. Konsentrasi DEX yang optimum adalah 15 μM , dengan respon organ terbaik untuk induksi embrio somatik adalah daun. Pembentukan embrio somatik dimulai dengan adanya pembengkakan pada potongan daun pada hari ke 8, diikuti dengan pembentukan embrio somatik pada hari ke 18 dan pembentukan *Shoot Apical Meristem* (SAM) yang dimulai pada hari ke 53. Hasil analisis anatomi memperlihatkan adanya pembentukan embrio pada daun transforman. Berdasarkan hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa overekspresi gen *AtRKD4* dapat menginduksi pembentukan embrio somatik pada anggrek *Phalaenopsis* “Sogo Vivien”

Keywords: embriogenesis, overekspresi, *AtRKD4*, glukokortikoid, *Phalaenopsis* “Sogo Vivien”

**INDUCTION OF SOMATIC EMBRYOGENESIS
IN *Phalaenopsis* “Sogo Vivien” ORCHID THROUGH *AtRKD4* GENES
INSERTION MEDIATED BY *Agrobacterium tumefaciens***

ABSTRACT

Phalaenopsis “Sogo Vivien” is a mini orchid hybrid with beautiful flowers and numerous inflorescences. Mass propagation of this orchid is needed to meet the market demand. Propagation of orchids through gene insertion had been carried out. The purpose of this study was to induce somatic embryogenesis of *P.* “Sogo Vivien” through insertion of *RWP-RK Domain-containing4 (RKD4)* gene isolated from *Arabidopsis thaliana* (*AtRKD4* gene) into the genome of *Phalaenopsis* “Sogo Vivien”.

A studies using an expression system induced by glucocorticoid *dexamethasone* (DEX) was carried out in several steps including 1) Determination of genetic transformation target of *P.* “Sogo Vivien”; 2) Study of protocorm resistance to hygromycin; 4) Determination inoculation time of *Agrobacterium tumefaciens* carrying pTA7002-35S :: *GR:: AtRKD4* on protocorm; 4) Determination of transformation efficiency 35S :: *GR:: AtRKD4* on *P.* “Sogo Vivien”; 5) Determination of the appropriate DEX concentration and the best response organ of transformant plants to induce somatic embryogenesis. Protocorms derived from seeds resulted from self-pollination or backcross pollination were planted on varied media of NP, MS and VW. *Plb* was induced from explants of leaves and roots of plantlets resulted from the growth of buds on the flower stalk nodes. Resistance tests were conducted on protocorms at 21th days, which were planted on the selection medium of varied hygromycin concentration. Genetic transformation was carried out in the varied inoculation time of 0.5; 1; 2; and 3 hours. Overexpression of *AtRKD4* was carried out using the gene expression system induced by glucocorticoid DEX on pieces of leaves, stems and roots of transformant plantlets. Further analysis was carried out on the anatomical structure, the presence of mRNA *AtRKD4* by PCR, as well as the development of the formed somatic embryos.

Based on the obtained results, protocorms grown on NP medium provided the best growth response, and showed 6 different developmental phases of embryo. Leaf explants only produced non embryogenic callus, while roots produced somatic embryos at low percentage. Hence, protocorms were selected as the target transformation. Results of resistance tests showed that hygromicine 10 mg.L⁻¹ could cause the death percentage of protocorm nearly LD₅₀, therefore this concentration was used in the selection of the transformant plant. One-hour inoculation period was the optimum treatment for the transformation *P.* “Sogo Vivien” protocorms. *AtRKD4* insertion in 35S::*GR::AtRKD4* construction could produced transformation efficiency of 0.63% in average. From a total of 34 transformant candidates that capable of forming shoot, 20 were able to regenerate into plantlets. Confirmation test of the successful integration of *At-RKD4* showed

that 100% transformant candidates positively carried the *AtRKD4* transgene appearing as ± 380 -bp DNA band and the *HPT* appearing as ± 500 -bp DNA band. Overexpression of *AtRKD4* was shown by both their somatic embryo formation and mRNA *AtRKD4* accumulation on pieces of leaves and stems of the transformant plant after induction with DEX. The highest of somatic embryo formation on the leaves was resulting from the treatment with DEX 15 μ M. The best response of organ for somatic embryo induction was leaves. Somatic embryo formation started by the swelling on the leaf pieces on day 8, followed by the formation of somatic embryos on day 18 and the formation of Shoot Apical Meristem (SAM) on the beginning of day 53. Results of anatomical analysis showed the formation of the embryo on the transformant leaves. It could be concluded that overexpression of *AtRKD4* gene was able to induce somatic embryo formation in *P. "Sogo Vivien"* orchid.

Keywords: embryogenesis, overexpression, *AtRKD4*, glucocorticoid, *Phalaenopsis* "Sogo Vivien"