

Teknologi penyenyapan pengekspresan gen (Silencing of gene expression technology)

Rogayah Sekeli, Nazrul Hisham Nazaruddin dan
Amin Asyraf Tamizi

Pengenalan

Di Malaysia, betik merupakan salah satu komoditi buah-buahan yang penting dan mempunyai nilai komersial yang tinggi. Ia merupakan buah kedua terpenting untuk eksport selepas tembikai. Betik Eksotika (*Carica papaya* L. var. Eksotika) merupakan salah satu varieti betik popular yang ditanam di Malaysia untuk pasaran eksport. Varieti yang terhasil daripada kacukan antara varieti Subang 6 (tempatan) dan varieti Hawaiian Sunrise Solo (Hawaii, USA) telah diperkenalkan oleh MARDI pada tahun 1987. Rasanya yang manis dan saiznya yang kecil menjadikan betik Eksotika sangat diminati di peringkat antarabangsa, khususnya di negara China. Kemuncaknya, pasaran betik telah menjadi buah tempatan yang tertinggi nilai eksportnya pada tahun 2001 dan secara tidak langsung, peningkatan drastik pemasaran komoditi betik ini telah memberi keuntungan kepada pengusaha dan pengeluar betik tempatan, serta membantu memacu ekonomi negara.

Namun begitu, seperti kebanyakan buah-buahan tropika yang lain, industri betik berhadapan dengan masalah jangka hayat buah yang agak singkat dan menyumbang kepada masalah lepas tuai yang serius serta boleh menghadkan potensi eksport ke destinasi yang lebih jauh. Untuk pasaran tempatan, betik Eksotika akan dipetik pada indeks kemasakan 4 atau 5 yang hanya memerlukan tempoh 1 – 2 hari sahaja untuk mencapai indeks kemasakan penuh (indeks 6). Manakala untuk pasaran eksport, betik Eksotika dipetik pada indeks 2 dan mampu bertahan selama 14 hari sekiranya disimpan pada suhu sejuk (14 °C). Terdapat pelbagai kaedah lepas tuai telah diaplikasi untuk melambatkan proses kemasakan buah seperti penyimpanan pada suhu yang rendah, atmosfera terubah suai atau terkawal, kaedah sinaran, penyalutan kulit buah dan rawatan dengan kalsium.

Secara teknikalnya, penyimpanan buah pada suhu sejuk boleh mengurangkan penghasilan gas etilena dan mampu memperlambatkan proses respirasi, lalu melambatkan proses kemasakan buah. Walau bagaimanapun, penyimpanan buah betik pada suhu yang terlalu sejuk boleh menyebabkan masalah kecederaan dingin (*chilling injury*) yang boleh merosakkan ciri, nutrisi dan kualiti buah. Kecederaan ini semakin ketara diperhatikan selepas ia dipindahkan ke suhu ambien.

Oleh itu, terdapat keperluan mendesak untuk mengaplikasikan teknologi terkini dalam usaha meningkatkan kualiti dan pengeluaran tanaman serta mengurangkan kerugian lepas tuai. Di samping kaedah kacukan konvensional dan teknik penyimpanan sedia ada, aplikasi kejuruteraan genetik tumbuhan

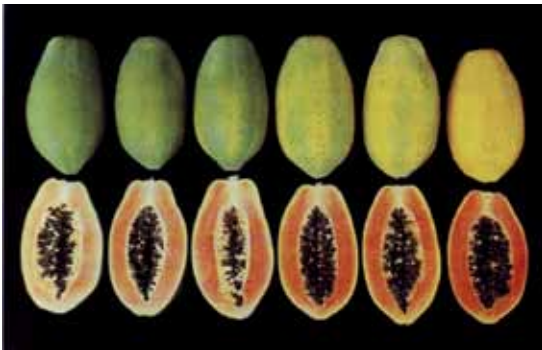
merupakan satu kaedah alternatif yang berpotensi besar untuk memenuhi hasrat pemanjangan jangka hayat buah ini. Pendekatan kejuruteraan genetik perlu dipelopori khasnya untuk membaiki mutu dan kualiti tanaman.

Proses kemasakan buah klimakterik

Kemasakan buah merupakan satu proses semula jadi buah-buahan yang dipelopori oleh gas etilena (C_2H_4). Gas etilena ialah hidrokarbon ringkas yang merupakan sejenis hormon dan memainkan peranan penting dalam proses kemasakan buah, terutamanya untuk buah klimakterik. Betik diklasifikasikan sebagai buah klimakterik yang sangat bergantung kepada gas etilena untuk memulakan proses kemasakan. Kehadiran gas etilena yang sedikit sudah mampu untuk menginduksi proses kemasakan dan kematangan buah betik, diikuti dengan proses penuaan yang menukarkan ciri dan kualiti buah tersebut.

Semasa proses kemasakan, beberapa siri peristiwa akan berlaku di mana molekul yang mempunyai jisim yang berat seperti kanji akan terdegradasi membentuk molekul ringan seperti gula dan asid organik. Klorofil juga akan didegradasi dan

menyebabkan warna kulit buah bertukar daripada warna hijau ke warna kuning atau oren, mengikut jenis varieti betik. Sejurus itu, buah betik akan menjadi manis, teksturnya berubah menjadi lebih lembut dan mengeluarkan aroma yang menarik hasil daripada tindak balas enzim yang berbeza semasa proses kemasakan. Enzim yang terlibat dalam proses kemasakan ialah enzim β -galaktosidase, polygalacturonase dan pectinesterase yang berfungsi mengubah komponen dinding sel. Proses kemasakan buah betik terbahagi kepada enam peringkat mengikut perkembangan indeks warna seperti dalam *Gambar 1*.



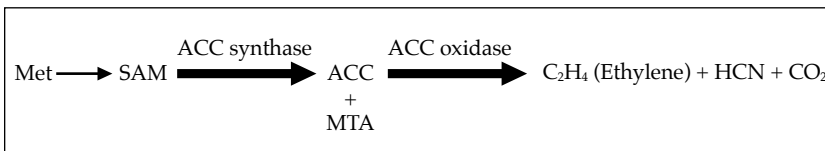
Gambar 1. Indeks warna yang berbeza mengikut peringkat kemasakan betik Eksotika. Indeks warna 1: hijau penuh; Indeks warna 2: hijau dengan kesan kuningan; Indeks warna 3: lebih hijau daripada kuning; Indeks warna 4: lebih kuning daripada hijau; Indeks warna 5: kuning dengan kesan hijau; Indeks warna 6: kekuningan

Teknologi kejuruteraan genetik untuk mengawal proses kemasakan

Secara semula jadinya, setiap buah klimakterik akan menghasilkan gas etilena untuk memulakan proses kemasakan buah. Dua enzim yang memainkan peranan penting dalam tapak jalan biosintesis gas etilena dikenal pasti sebagai enzim ACC synthase dan ACC oxidase dan kedua-dua enzim inilah yang bertanggungjawab dalam proses kemasakan kebanyakan buah-buahan klimakterik. Hasil kajian terhadap betik Eksotika menunjukkan kadar pengekspresan gen ACC oxidase adalah lebih tinggi berbanding

dengan ACC synthase semasa proses kemasakan buah. Ini membuktikan bahawa ACC oxidase memainkan peranan yang lebih penting berbanding dengan ACC synthase semasa proses kemasakan betik Eksotika (*Persamaan 1*).

Bagi mencapai hasrat pemanjangan jangka hayat buah ini, manipulasi gen yang terlibat dalam biosintesis gas etilena perlu dijalankan. Dengan memanipulasi gen yang terlibat dalam biosintesis gas etilena, pengeluaran gas etilena secara semula jadi boleh dikurangkan atau direncatkan sama sekali untuk memperlambatkan proses kemasakan buah. Secara tidak langsung, teknik ini boleh memanjangkan jangka hayat betik Eksotika. Dua pendekatan yang sering digunakan untuk mengurangkan aktiviti pengekspresan gen ialah teknologi RNA antierti (*antisense RNA technology*) dan teknologi gangguan RNA (*RNA interference technology*).



Persamaan 1. Tapak laluan biosintesis gas etilena

Teknologi RNA antierti

Teknik penyenyapan gen yang paling banyak diaplikasikan dalam bidang kejuruteraan genetik dan telah berjaya menghasilkan beberapa varieti tanaman transgenik yang mempunyai jangka hayat yang lebih panjang adalah teknik RNA antierti. Berdasarkan Kamus Sains Dewan Bahasa dan Pustaka, RNA antierti bermaksud RNA komplementari yang dihasilkan secara kejuruteraan genetik untuk mengikat mRNA gen tertentu bagi merendahkan pengekspresian gen tersebut. Secara asasnya, teknik ini bersandarkan kepada fenomena semula jadi dalam proses pengekspresan gen. Semasa proses transkripsi iaitu informasi DNA kepada mRNA, rantai berganda DNA yang berkomplementari akan berpisah dan menghasilkan rantai tunggal erti dan antierti. Rantai antierti yang mempunyai jujukan 3' – 5' akan memainkan peranan penting dalam proses cetakan untuk penghasilan mRNA yang berjujukan 5' – 3' dengan jujukan yang berkomplimentari dan proses ini berlaku dalam nukleas tumbuhan. Seterusnya mRNA ini akan bermigrasi daripada nukleas ke sitoplasma dan akan bergabung pula dengan kompleks ribosom dan mRNA tadi untuk diterjemahkan kepada protein yang berfungsi. Proses ini pula dikenali sebagai translasi.

Teknik penyenyapan gen dengan kaedah antierti adalah dengan menggunakan konsep di mana mRNA antierti buatan akan bergabung dengan cetakan mRNA yang baru keluar daripada nukleus sehingga tidak dikenali oleh kompleks ribosom dan seterusnya menyebabkan produk atau protein yang bersangkutan dengan gen tersebut tidak dapat ditranslasi. Hasilnya, pengekspresian gen dapat dikurangkan ataupun disenyapkan.

Perencatan proses translasi boleh berlaku dengan komplimentari jujukan DNA sependek 18 jujukan nukleotida. Aplikasi teknologi RNA antierti telah banyak digunakan dalam pembaikan mutu pelbagai varieti tanaman. Dalam kajian perencatan penghasilan gas etilena, ianya pertama kali berjaya dilakukan di dalam buah transgenik tomato dengan menggunakan teknik antierti untuk merencat penghasilan gen *ACC oxidase*. Teknik ini juga telah berjaya diaplikasi dalam pelbagai tanaman seperti pisang, tembikai, epal dan juga betik.

Teknologi gangguan RNA (*RNA interference technology – RNAi*)

Teknik gangguan RNA merupakan teknik terkini yang semakin meluas digunakan untuk mengurang atau merencat pengekspresan gen sasaran. Ia merupakan teknik yang ringkas dan berkesan untuk memahami fungsi dan pengekspresan sesuatu gen. *RNAi* adalah proses penyenyapan atau perencatan gen yang didorong oleh molekul kecil RNA berantai dua yang dikenali sebagai *small interference RNA* (siRNA) yang bersaiz pendek antara 21 – 25 jujukan nukleotida. siRNA terhasil melalui potongan rantai berganda *hairpin RNA* oleh enzim pemotong semula jadi dalam sel tumbuhan yang dikenali sebagai *dicer* dan saiz potongan RNA bergantung kepada jenis *dicer* dalam sistem alami pokok tersebut.

Potongan-potongan kecil siRNA ini akan mencari pasangan mRNA yang mempunyai jujukan nukleotida yang berlawanan untuk berhibridasi. Kesannya, hibridasi ini menjadikan mRNA sasaran menjadi berantai dua. Keadaan ini menyebabkan enzim pemotong (*slicer*) yang sedia ada dalam tumbuhan mengenal pasti dan memotong mRNA berantai dua tersebut. Ini kerana hibridasi mRNA dengan siRNA menghasilkan mRNA yang tidak normal dan dianggap sebagai satu ancaman kepada sistem pertahanan. Akibat daripada pemotong tersebut, mRNA yang sepatutnya ditranslasi menjadi protein berfungsi tidak akan berlaku dan aktivitiya berjaya direncatkan.

Teknik RNAi ini telah digunakan dengan meluas untuk manipulasi tanaman bagi tujuan peningkatan kualiti seperti meningkatkan kerintangan terhadap penyakit dan serangga perosak, meningkatkan nilai nutrien, meningkatkan jangka hayat dan banyak lagi. Teknologi RNAi dianggap paling berkesan untuk menghalang pengekspresan gen *ACC oxidase* kerana ia lebih spesifik dan mempunyai keupayaan khusus untuk menasaskan gen yang dikehendaki. Pengekspresan gen yang terpilih mampu dikurangkan atau disenyapkan sekiranya gen sasaran dipilih dengan teliti dan teknik juga berkemampuan untuk menasaskan beberapa isoform gen.

Di Malaysia, teknologi RNAi ini masih belum diaplikasi untuk penambahbaikan tanaman secara komersial melalui kaedah kejuruteraan genetik. Walau bagaimanapun, kajian penggunaan teknik RNAi ini semakin banyak dijalankan terhadap beberapa varieti tanaman tempatan untuk penambahbaikan trait termasuk pokok betik, padi dan kelapa sawit.

Pembangunan tanaman transgenik betik untuk pemanjangan jangka hayat

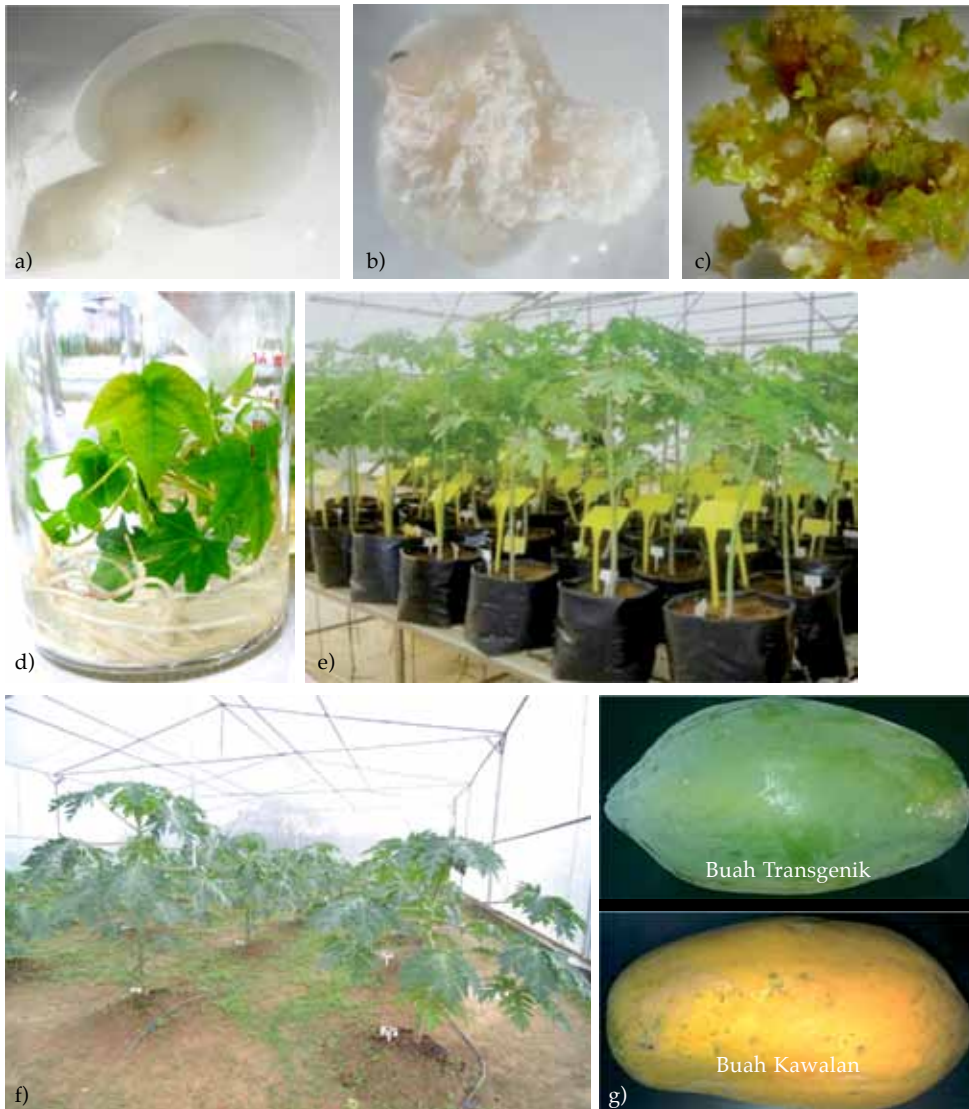
Ketika ini, MARDI sedang membangunkan teknologi kejuruteraan genetik bagi tanaman betik untuk penambahbaikan ciri pemanjangan jangka hayat buah. Manipulasi gen *ACC oxidase* dengan dua teknik penyenyapan gen iaitu teknologi RNAi dan teknologi antierti RNA telah berjaya dijalankan. Transformasi gen ini ke dalam kalus embriogenik betik Eksotika telah dijalankan dengan menggunakan kaedah transformasi berperantara bakteria *Agrobacterium*. Analisis molekul menunjukkan keputusan integrasi gen yang positif di dalam genom betik Eksotika. Pengekspresan gen menggunakan teknik *Real-time* PCR pula menunjukkan penurunan kadar *ACC oxidase* dalam beberapa titisan betik transgenik yang diperolehi. Ini membuktikan aktiviti gen yang terlibat dalam biosintesis gas etilena telah berjaya dikurangkan.

Kajian lanjut di lapangan tertutup dan dalam keadaan terkawal iaitu di dalam rumah jaring mengesahkan bahawa kedua-dua teknik RNAi dan pembalikan antisense mampu mengurangkan pengekspresan gas etilena. Ini terbukti dengan pemanjangan jangka hayat buah yang diperolehi hasil transformasi gen dengan kedua-dua teknik ini. Jika dibandingkan teknik RNAi dan antisense, teknik RNAi mempunyai kelebihan kerana mampu mengurangkan kadar penghasilan gas etilena jauh lebih rendah berbanding dengan teknik antierti RNA. Selain itu, analisis pemanjangan jangka hayat buah juga membuktikan teknik RNAi telah menghasilkan buah betik yang mempunyai jangka hayat yang lebih panjang berbanding dengan antierti RNA. Berdasarkan hasil kajian, prestasi pertumbuhan pokok transgenik dan pokok kawalan yang tidak ditransformasi tidak menunjukkan perbezaan yang signifikan.

Di samping itu, pokok transgenik tidak menunjukkan sebarang keabnormalan berbanding dengan pokok kawalan. Analisis jangka hayat, kadar respirasi dan tahap pengeluaran gas etilena membuktikan kedua-dua teknik berjaya menurunkan kadar pengeluaran gas etilena. Perbandingan jumlah pepejal larut antara buah transgenik dan buah kawalan adalah serupa dan ini membuktikan transformasi gen ke dalam genom betik tidak mempengaruhi jumlah asal pepejal larut buah tersebut. Hasil keseluruhan kajian menunjukkan pengeluaran gas etilena berjaya diturunkan melalui transformasi gen *ACC oxidase* ke dalam genom betik Eksotika dengan menggunakan kedua-dua teknik ini. Ini juga membuktikan penghasilan betik Eksotika yang mempunyai jangka hayat yang lebih panjang boleh diperolehi sama ada dengan menggunakan teknik RNAi ataupun antisense (*Gambar 2*).

Hala tuju penyelidikan tanaman transgenik

Bioteknologi moden atau khususnya kejuruteraan genetik merupakan satu teknologi yang berpotensi besar untuk menjamin kelestarian bekalan makanan yang mencukupi dan mentransformasi ekonomi sosial terutama di negara membangun



Gambar 2. Proses kejuruteraan genetik betik Eksotika untuk pemanjangan jangka hayat buah. a) Embrio belum matang; b) Kalus embriogenik berusia sebulan untuk proses transformasi; c) Kalus putatif yang berjaya hidup selepas proses penyaringan dalam antibiotik; d) Pokok transgenik in vitro; e) Pokok transgenik dalam polibeg sebelum dipindah ke ladang; f) kajian lapangan tertutup betik Eksotika transgenik; g) Analisis jangka hayat buah transgenik pada hari ke-4

pada masa akan datang. Terdapat banyak kajian intensif telah dan sedang dijalankan oleh saintis untuk membangunkan tanaman transgenik dengan sifat yang berkualiti bagi membantu petani amnya, serta memberi manfaat secara langsung kepada pengguna. Walaupun kajian dalam bidang kejuruteraan genetik tumbuhan memerlukan jangka masa yang panjang, namun kesan dan faedah di sebalik teknologi ini tidak boleh disangkal lagi.

Bagi meningkatkan penerimaan orang awam terhadap produk hasil transgenik, kesedaran awam berkaitan produk transgenik perlu diperluaskan lagi. Komunikasi yang tidak cekap dan informasi yang tidak tepat menyebabkan kurangnya penerimaan dan pemahaman masyarakat terhadap kepentingan produk bioteknologi moden ini. Informasi yang tidak tepat kepada orang awam boleh memberi kesan negatif serta menjejaskan penerimaan dan penggunaan bioteknologi moden. Dengan itu, media berperanan penting dalam menyampaikan maklumat yang tepat kepada orang awam berkaitan kebaikan hasil produk bioteknologi moden ini.

Penghargaan

Penulis ingin merakamkan setinggi penghargaan kepada Kementerian Sains, Teknologi dan Inovasi (MOSTI) dan MARDI atas penganugerahan geran penyelidikan Sciencefund RB1151SF10 dan dana pembangunan MARDI TP-RB-0024. Sekalung budi dan ucapan penghargaan juga ditujukan kepada semua kolaborator dan kakitangan sokongan di Pusat Penyelidikan Bioteknologi dan Nanoteknologi khususnya Pn. Nora'ini Abdullah, En. Zaiful Farizal Zulkifli, En. Yahya Hashim serta kakitangan MARDI Pontian khususnya En. Khairul Anuar yang telah memberi nasihat dan membekalkan biji betik Eksotika untuk tujuan penyelidikan.

Bibliografi

- Abu Bakar, U.K., Vilasini, V., Muda, P., Fatt, L.P., Kwok, C.Y. dan Daud, H.M. (2001). Molecular and biochemical characterizations of Eksotika papaya plants transformed with antisense *ACC oxidase* gene. Papaya Biotechnology Network of SEAsia Coordination Meeting, 24 – 26 Oktober 2001, Hanoi, Vietnam
- Barry, C. dan Giovannoni, J. (2007). Ethylene and Fruit Ripening. *Journal of Plant Growth Regulation* 26: 143 – 159
- Chan, L.K. dan Teo, C.K.H. (1994). Culture of papaya explant in solid-liquid media sequence as a rapid method of producing multiple shoots. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science* 17: 103 – 106
- Fabi, J.P., Cordenunsi, B.R., Barreto, G.P.M., Mercadante, A.Z., Lajolo, F.M. dan Nascimento, J.R.O. (2007). Papaya fruit ripening: response to ethylene and 1-Methylcyclopropane (1-MCP). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 6118 – 6123
- Lazan, H., Kasim, M. dan Ali, Z.M. (1995). β -galactosidase, polygalacturonase and pectinesterase in differential softening and cell wall modification during papaya fruit ripening. *Physiologia Plantarum* 95: 106 – 112
- Mohd Salleh, P., Pauziah, M., Ahmad, T.S. dan Zaipun, M.Z. (2007). Quality of papaya in modified atmosphere packages under simulated storage condition for export by sea. *Journal of Tropical Agriculture and Food Science* 35: 71 – 77
- Rodolfo, L.G., Jose, L.C.P., Luis, J.S.A., Lorena, C.M., Ramon, V.A., Juan, C.D.P., Miguel, A.G.L. dan Luis, H.E. (2009). Ripening in papaya fruit is altered by *ACC oxidase* co-suppression. *Transgenic Research*, 18: 89 – 97
- Rogayah S., Janna O.A., Parameswari, N., Pauziah, M. dan Umi Kalsom, A.B. (2013). *1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Oxidase* 2 reduction effects on physical and physiological responses of Eksotika papaya. *Journal of Crop Improvement* Vol. 27: 487 – 506

Ringkasan

Betik (*Carica papaya* L.) merupakan salah satu buah-buahan yang penting dalam industri eksport negara kerana mempunyai nilai komersial yang tinggi di peringkat antarabangsa. Tambahan pula, Malaysia pernah tersenarai di tangga keenam sebagai pengeksport utama betik pada tahun 2008. Betik Eksotika merupakan varieti betik tempatan yang popular dalam pasaran eksport antarabangsa. Namun, buah klimakterik ini mempunyai jangka hayat yang singkat disebabkan proses kemasakan yang cepat, seterusnya menyumbang kepada terhadnya pasaran eksport. Bagi mengatasi masalah lepas tuai ini, pendekatan kejuruteraan genetik tumbuhan telah dipelopori untuk melambatkan proses kemasakan buah. Pendekatan bioteknologi moden ini berfungsi dengan menghalang proses penghasilan gas etilena (C_2H_4) secara semula jadi. Secara amnya, gas etilena merupakan hormon yang bertanggungjawab menyebabkan kemasakan buah klimakterik seperti betik. Dua enzim utama yang terlibat dalam penghasilan gas etilena ialah ACC oxidase dan ACC syntase. Dengan menghalang pengekspresan gen yang mengekod enzim tersebut, penghasilan gas etilena boleh dikurangkan atau direncatkan. Dua teknologi penyenyapan gen yang diimplementasikan di MARDI ialah teknologi RNA antierti (*antisense* RNA) dan teknologi gangguan RNA (RNA *interference*-RNAi). Betik transgenik Eksotika dengan ciri pemanjangan tempoh kemasakan buah telah berjaya dihasilkan menggunakan kedua-dua teknologi ini dengan menghalang pengekspresan gen ACC oxidase. Berdasarkan kajian lapangan tertutup, penyenyapan gen ini tidak mengubah keadaan asal pokok selain hanya melambatkan proses kemasakan buah. Pokok betik transgenik Eksotika juga tidak menunjukkan sebarang keabnormalan berbanding dengan pokok kawalan.

Summary

Papaya (*Carica papaya* L.) is one of the important national commodities for export and has a high commercial value in the international market. In fact, Malaysia was once listed as the sixth main exporter of papaya in 2008. Among Malaysian papaya varieties, Eksotika is a well-known variety for export. However, this climacteric fruit has a short shelf life due to fast ripening process which consequently contributed to the limitation of export market. To address this postharvest problem, genetic engineering approach has been applied to delay the ripening of the fruits. This modern biotechnology approach helps to reduce the normal production of ethylene gas (C_2H_4) inside the fruit. Generally, ethylene gas acts as a hormone responsible for ripening induction of climacteric fruits such as papaya. There are two enzymes that play a major role in ethylene production pathway: ACC oxidase and ACC syntase. By silencing the expression of gene encoding the enzyme, the production of ethylene gas can be reduced or blocked. At MARDI, two silencing technologies, antisense RNA and RNA interference (RNAi), have been implemented. Transgenic Eksotika papaya with delayed ripening characteristic has been successfully developed by silencing the expression of *ACC oxidase* gene using both approaches. Based on confined field trial results, silencing of *ACC oxidase* does not affect the normal growth of the transgenic plant other than delaying the ripening process. Transgenic plants also did not show any abnormalities compared to the control.

Pengarang

Rogayah Sekeli

Pusat Penyelidikan Bioteknologi dan Nanoteknologi,
Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM,

43400 Serdang, Selangor

E-mel: lynn@mardi.gov.my

Nazrul Hisham Nazaruddin dan Amin Asyraf Tamizi

Pusat Penyelidikan Bioteknologi dan Nanoteknologi,
Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM,

43400 Serdang, Selangor