

Teknologi kejuruteraan genetik untuk meningkatkan kerintangan padi MR 219 terhadap penyakit hawar seludang

(Genetic engineering technology to enhance MR 219 rice resistance against sheath blight disease)

Rogayah Sekeli, Sanimah Simoh, Nazrul Hisham Nazaruddin, Amin Asyraf Tamizi, Nora'ini Abdullah, Zaifulfarizal Zulkifli, Izzati Sofia Mohd Dorani, Siti Norsuha Misman, Mohamad Ariff Asrofp Rahim, Rohaiza Ahmad Redzuan dan Sew Yun Shin

Pengenalan

Teknologi kejuruteraan genetik telah diaplikasi dan diterima pakai secara meluas di peringkat global dalam usaha menambah baik mutu dan kualiti tanaman dengan sasaran trait yang berbeza. Secara teknikalnya, teknologi kejuruteraan genetik membolehkan informasi genetik atau lebih dikenali sebagai gen, dipindah dan diperkenalkan ke dalam genom tumbuhan sasaran. Gen ini akan kekal stabil berada di dalam genom tumbuhan sasaran daripada satu generasi hingga ke generasi seterusnya. Kelebihan teknologi kejuruteraan genetik berbanding dengan pembiakbakaan konvensional adalah fleksibiliti sumber gen yang luas dan membolehkan pemilihan gen secara spesifik kepada tujuan serta ciri peningkatan trait yang diingini. Sumber gen ini boleh diperoleh daripada spesies tumbuhan yang sama mahupun yang berlainan dan juga daripada organisma asing seperti bakteria, kulat dan haiwan. Pengekspresan gen pula boleh dipertingkat atau disenyapkan bergantung kepada mod fungsi dan tapak jalan (*pathway*) gen tersebut dalam tumbuhan.

Produk tanaman yang terhasil melalui kaedah kejuruteraan genetik ini dikenali sebagai tanaman terubah suai genetik (*genetically modified crops*) atau lebih dikenali sebagai tanaman transgenik. Transgen atau gen asing yang dimasukkan ke dalam genom tanaman ini juga boleh diwarisi dan tersebar kepada tanaman lain melalui pendebungaan. Teknologi omik banyak membantu proses penelitian yang lebih komprehensif terhadap peranan gen-gen serta mekanisme biologi setiap gen dalam sesuatu organisme. Ini menjadikan proses pengubahsuaian genetik melalui kaedah kejuruteraan genetik dapat dijalankan dengan lebih sistematis dan bersasar kerana gen sasaran dapat dipilih dengan lebih tepat untuk mendapatkan ciri yang dihajati berdasarkan maklumat omik dan validasi secara *in silico* (simulasi komputer) mahupun *in vivo* (dalam tubuh organisma hidup).

Secara umumnya, tujuan utama tanaman transgenik dihasilkan adalah untuk memperbaiki ciri tanaman menjadikannya lebih baik yang boleh memberi manfaat kepada manusia seperti penghasilan varieti tanaman yang lebih produktif, rintang kepada serangan penyakit dan serangga, tinggi kandungan

nutrien serta tahan kepada cuaca ekstrem. Teknologi kejuruteraan genetik ini telah terbukti memberi banyak sumbangan bukan sahaja kepada pengeluar tanaman transgenik, tetapi juga kepada petani melalui pengkomersialan beberapa jenis tanaman terubah suai genetik dengan kadar kluasan penanaman yang semakin meningkat setiap tahun. Pada masa ini, Amerika Syarikat (USA) merupakan negara pengeluar terbesar untuk produk organisma terubah suai genetik [*Genetically modified organism (GMO)*] seperti kacang soya, kanola, betik, jagung dan sebagainya. Potensi masa depan teknologi GMO adalah sangat besar bukan sahaja dalam bidang pertanian, tetapi juga perubatan dan alam sekitar. Dalam bidang pertanian, teknologi GMO boleh digunakan untuk menangani isu keselamatan makanan dalam usaha untuk meningkatkan produktiviti tanaman serta menyediakan makanan yang mencukupi, selamat serta mengandungi nutrisi yang diperlukan. Pertambahan penduduk yang semakin meningkat menyebabkan permintaan terhadap bekalan makanan meningkat secara drastik di seluruh dunia. Tambahan pula dengan kawasan pengeluaran penanaman yang semakin terhad mengukuhkan lagi kepentingan penggunaan varieti yang berkualiti untuk penanaman.

Malaysia telah meluluskan pelbagai produk berdasarkan GMO untuk memasuki pasaran tempatan seperti kacang soya, jagung, kanola dan ubi kentang. Kebanyakan produk GMO import yang diluluskan adalah untuk pemprosesan makanan dan juga untuk makanan ternakan. Namun, kesedaran masyarakat Malaysia tentang wujudnya produk makanan berdasarkan GMO adalah masih rendah. Ramai yang tidak menyedari produk yang diubah suai secara genetik telah berada di pasaran Malaysia. Tambahan pula pelabelan produk yang terhasil melalui keedah ini masih belum dikuatkuasakan sepenuhnya, walaupun akta berkaitan pelabelan makanan berdasarkan GMO telah diwartakan. Oleh itu, pengguna tidak dapat mengenal pasti atau membezakan produk berdasarkan bioteknologi moden ataupun tidak. Teknologi GMO ini menerima maklum balas yang pelbagai daripada masyarakat. Oleh itu, isu dan cabaran berkaitan teknologi terubah suai genetik ini perlu ditangani supaya teknologi ini dapat diterima pakai dan menjadi satu solusi alternatif untuk kemajuan bidang pertanian.

Akta Biokeselamatan 2007

Penyelidikan dan pembangunan yang melibatkan organisma terubah suai secara hidup [*living modified organism (LMO)*] di Malaysia adalah dikawal bawah Akta Biokeselamatan Kebangsaan 2007. Akta ini terkandung dalam Undang-Undang Malaysia bawah Akta 678 yang telah digazetkan pada 29 Ogos 2007. Tujuan utama Akta Biokeselamatan 2007 adalah untuk melindungi kesihatan manusia, tumbuh-tumbuhan dan haiwan, alam sekitar dan kepelbagaiannya hasil daripada pembangunan produk berdasarkan bioteknologi moden. Sebelum kajian yang melibatkan organisma terubah suai secara hidup, sama ada di lapangan

tertutup (*contained trial*), di lapangan terkawal (*confined trial*) ataupun di lapangan terbuka (*open trial*) dijalankan, kelulusan daripada Lembaga Biokeselamatan Kebangsaan [*National Biosafety Board (NBB)*] perlu diperoleh. Permohonan perlu dihantar ke Jabatan Biokeselamatan dan seterusnya akan dinilai daripada segi teknikal oleh Jawatankuasa Pengubahsuaian Genetik Malaysia [*Genetic Modification Advisory Committee (GMAC)*] sebelum ia dipertimbang untuk kelulusan oleh NBB. Penilaian ini penting bagi menentukan atau menilai sebarang kesan atau risiko yang mungkin terjadi hasil daripada kajian yang dijalankan. Permohonan untuk kajian lapangan melibatkan permohonan *Notification* diperlukan apabila menjalankan kajian di lapangan tertutup dan *Approval for release* apabila menjalankan kajian di lapangan terkawal, terbuka dan lapangan komersial. Permohonan *Notification* memerlukan masa maksimum 90 hari untuk diluluskan manakala permohonan *Approval for release* memerlukan masa maksimum 180 hari untuk diluluskan oleh NBB.

Teknologi kejuruteraan genetik ke atas padi varieti MR 219
Kajian kejuruteraan genetik ke atas tanaman padi MR 219 telah dijalankan dalam usaha meningkatkan kerintangan terhadap penyakit hawar seludang. Penyakit hawar seludang yang disebabkan oleh kulat *Rhizoctonia solani* merupakan salah satu penyakit utama yang menyerang tanaman padi di Malaysia dan boleh menjelaskan pengeluaran hasil dan kualiti padi. Serangan penyakit ini kebiasaannya berlaku di peringkat pembiakan beranak maksimum sehingga di peringkat padi masak. Simptom penyakit dengan lesi bujur berwarna kelabu kehijauan dapat dilihat di bahagian seludang padi pada aras air. Dalam keadaan yang kondusif, lesi (*lesion*) boleh merebak ke batang dan daun padi. Pada masa ini, saringan kerintangan terhadap penyakit hawar seludang merupakan salah satu kriteria yang diambil kira semasa pemilihan varieti padi dalam proses pembiakbakaan secara konvensional. Namun, cabaran bagi pembiakbakaan varieti rintang terhadap hawar seludang ini adalah kekurangan varieti penderma yang mempunyai kerintangan sepenuhnya terhadap patogen penyakit ini. Sehingga kini, petani masih bergantung kepada racun kimia seperti difenoconazole dan flutolanil untuk mengawal penyakit ini. Walau bagaimanapun, penggunaan racun kimia berterusan dan berlebihan patut dielakkan bagi mengurangkan masalah pencemaran kepada alam sekitar dan mengelakkan berlakunya kerintangan patogen ini terhadap racun kimia dalam jangka masa panjang.

Oleh itu, pembangunan varieti yang rintang terhadap penyakit ini adalah sangat diperlukan. Teknologi kejuruteraan genetik merupakan satu langkah alternatif yang boleh diaplikasikan untuk pembangunan varieti baharu bagi menangani masalah tersebut. Kajian awal pembangunan padi MR 219 yang rintang terhadap penyakit hawar seludang melalui kaedah transgenik telah dijalankan di makmal dan di Rumah Kaca

Transgenik. Permohonan *Notification* yang mengandungi maklumat lengkap berkaitan LMO, perancangan kajian berserta penilaian dan pengurusan risiko telah dihantar ke Jabatan Biokeselamatan dan kelulusan daripada NBB telah diperoleh sebelum kajian dimulakan.

Pemencilan, pencirian gen berpotensi dan transformasi kalus dengan kaedah berperantara *Agrobacterium*

Pendekatan pemprofilan pengekspresan gen dengan menggunakan kaedah PCR kuantitatif masa nyata [*Real-time quantitative (PCR)*] telah dijalankan untuk mengenal pasti gen-gen penting yang berkaitan dengan pertahanan selepas infeksi dengan *R. solani* dijalankan. Dua varieti padi digunakan untuk mendapatkan profil tersebut iaitu Tetep yang merupakan padi yang toleran dan varieti padi IR64 iaitu yang rentan terhadap hawar seludang. Hasil kajian menunjukkan terdapat lima gen iaitu β -1,3 Glucanases (GNS1), *Thaumatin like protein* (PR5), *rice acidic class II Chitinase* (Rcht2), *Pathogenesis-related protein 1* (PR1) dan *Pathogenesis-related protein 10* (PR10) yang mempamerkan corak pengekspresan yang berbeza di dalam padi Tetep dan IR64 pada sampel 24 jam, 72 jam dan tujuh hari selepas infeksi dengan *R. solani* dijalankan. Pengekspresan gen-gen ini adalah lebih tinggi dalam varieti Tetep berbanding dengan IR64. Ini menunjukkan bahawa mekanisme ketoleran kedua-dua varieti padi ini terhadap *R. solani* adalah dikawal oleh pelbagai gen yang berkaitan dengan pertahanan atau kepatogenan semasa infeksi kulat patogen. Kadar pengekspresan gen yang tinggi ini dihipotesiskan sebagai asbab padi varieti Tetep mempunyai tahap ketoleran yang lebih tinggi terhadap *R. solani* berbanding varieti IR64 di mana gen-gen tersebut terlibat dalam sistem pertahanan padi terhadap penyakit hawar seludang. Dua gen berpotensi yang menunjukkan kadar pengekspresan yang tinggi iaitu *Thaumatin-like protein* (PR5) dan *Chitinase* (CHT) telah dipilih untuk digunakan dalam kejuruteraan genetik bagi membangunkan varieti padi yang rintang terhadap penyakit hawar seludang. PR5 berperanan mengubah ketelapan membran kulat dan juga merencatkan aktiviti antikulat manakala CHT berperanan dalam proses melisis kitin dinding sel kulat.

Analisis secara *in silico* gen PR5 dan CHT telah dijalankan untuk mengetahui fungsi, interaksi dan proses biologi antara kedua-dua protein gen tersebut. Hasil analisis *in silico* meramalkan protein yang dihasilkan mempunyai domain antikulat dan ketahanan terhadap penyakit kulat seperti hawar seludang ini dapat dipertingkatkan dengan kombinasi kedua-dua gen tersebut. Berdasarkan sorotan kajian, pengekspresan melampau gen PR5 padi telah meningkatkan ketahanan ubi kayu transgenik terhadap penyakit bawaan kulat antraknos dan pisang transgenik terhadap penyakit bawaan kulat *Fusarium*. Manakala, pengekspresan melampau gen CHT telah dilapor meningkatkan ketahanan padi transgenik terhadap penyakit hawar seludang pada tahun 1995 di mana penulis memberikan pendapat bahawa ketahanan pokok

mempunyai korelasi langsung dengan kadar pengekspresan gen CHT.

Bagi tujuan pembangunan kaset gen, kedua-dua gen ini dipencarkan daripada varieti Tetep dengan menggunakan kaedah berdasarkan reaksi rantai polimerase (PCR) dan disahkan menggunakan penjujukan DNA. Gen-gen sasaran dengan jujukan DNA yang tepat diklonkan ke dalam vektor transformasi tumbuhan pCAMBIA 1305.2 dan dipacu dengan promoter yang kuat iaitu *Cauliflower Mosaic Virus* (CaMV) 35S agar pengekspresan gen-gen ini dapat dipertingkatkan dalam genom tumbuhan. Sebanyak tiga kaset gen telah dibangunkan iaitu kaset gen tunggal untuk PR5 dan CHT serta kaset gen kombinasi antara PR5 dan CHT yang diklasifikasi sebagai *stacked genes* (SG). Kaset-kaset gen ini mempunyai gen penanda pemilihan *hptII* yang membolehkan tisu yang berjaya ditransformasi berupaya hidup apabila dikulturkan ke dalam medium yang mengandungi antibiotik hygromycin. Ini penting bagi proses pemilihan awal tisu yang tertransformasi bagi membezakan tisu yang mengandungi kaset gen ataupun tidak sebelum analisis molekul dengan menggunakan PCR dijalankan. Kaset-kaset gen tersebut ditransformasikan ke dalam *Agrobacterium* strain EHA 105 untuk digunakan dalam proses transformasi kalus embriogenik padi.

Kalus embriogenik dihasilkan dengan mengkultur embrio zigosit [Gambar 1(b)] benih padi matang di dalam medium Gamborg's B5 yang ditambah dengan hormon panggalak tumbesaran *naphthaleneacetic acid* (NAA) sebanyak 10 mg/L dan 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) sebanyak 1 mg/L. Kalus yang terbentuk selepas sebulan dikultur [Gambar 1(c)] digunakan dalam proses transformasi dengan kaset-kaset gen yang dibangunkan. Transformasi kaset-kaset gen ini ke dalam kalus padi MR 219 telah dijalankan dengan menggunakan kaedah berperantara *Agrobacterium*. Kaedah transformasi berperantara *Agrobacterium* dipilih memandangkan kaedah ini berupaya menghasilkan pokok transgenik dengan salinan gen asing tunggal jika dibandingkan dengan kaedah transformasi menggunakan *particle bombardment*.

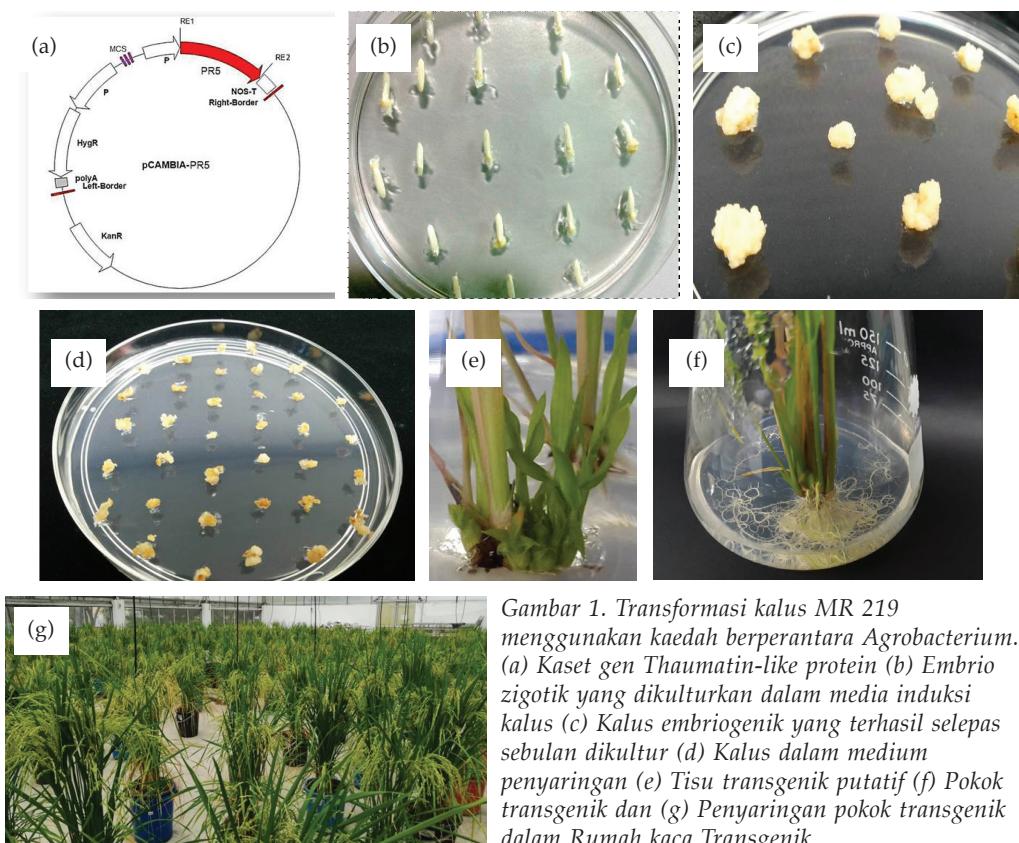
Pemilihan tisu yang telah ditransformasi dengan kaset gen telah dijalankan dalam medium yang mengandungi antibiotik hygromycin dan proses pemilihan ini dijalankan selama tiga bulan [Gambar 1(d)]. Dalam medium pemilihan ini hanya tisu yang mengandungi gen penanda *hptII* sahaja yang akan bertahan dan berjaya hidup manakala tisu yang tidak mengandungi gen penanda tersebut akan mati. Proses ini membolehkan pengenalpastian dan pemilihan tisu yang berpotensi mengandungi gen yang ditransformasi untuk dimajukan ke analisis molekul seterusnya. Tisu putatif yang berjaya hidup selepas proses pemilihan dipindahkan ke medium regenerasi bagi penghasilan plantlet [Gambar 1(e)] dan akan dibiak sehingga membentuk pokok yang lengkap [Gambar 1(f)]. Seterusnya analisis molekul dengan menggunakan PCR dijalankan bagi mengesahkan integrasi gen di dalam genom plantlet putatif yang terhasil. Plantlet yang telah

disahkan positif kehadiran gen yang ditransformasikan dikenali sebagai pokok transgenik, kemudiannya dipindahkan ke tanah di dalam baldi [Gambar 1(g)] untuk dijalankan kajian penyaringan dengan kulat patogen *R. solani*.

Penyaringan kerintangan pokok transgenik terhadap penyakit hawar seludang

Titisan pokok transgenik (generasi T0) dipindahkan ke tanah dalam baldi dan ditempatkan di Rumah Kaca Transgenik, MARDI. Biji benih generasi T1 yang terhasil dituai untuk ditanam semula bagi kajian penilaian kerintangan terhadap kulat *R. solani*.

Penyaringan kerintangan terhadap penyakit hawar seludang telah dijalankan ke atas generasi T1 sehingga T4 pokok transgenik dalam keadaan tertutup. Penyaringan daripada satu generasi ke satu generasi sangat diperlukan bagi memastikan titisan pokok transgenik yang stabil diperoleh sebelum kajian di lapangan terkawal ataupun terbuka dijalankan bagi mengesahkan trait yang dikehendaki.



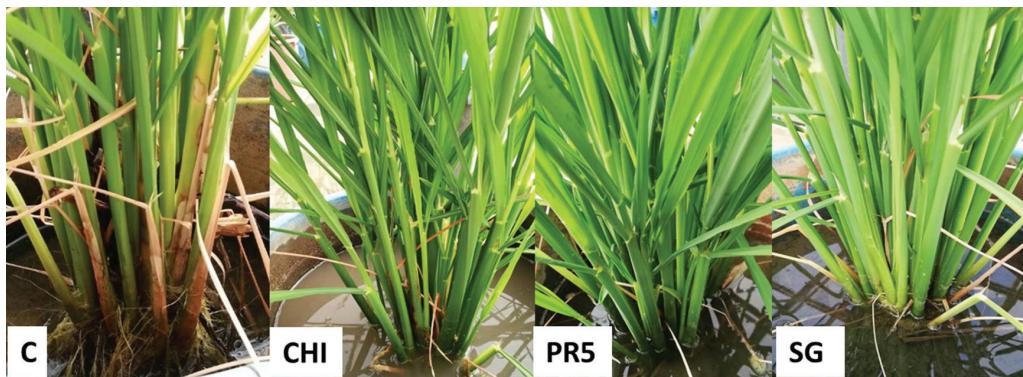
Gambar 1. Transformasi kalus MR 219 menggunakan kaedah berperantara *Agrobacterium*. (a) Kaset gen Thaumatin-like protein (b) Embrio zigotik yang dikulturkan dalam media induksi kalus (c) Kalus embriogenik yang terhasil selepas sebulan dikultur (d) Kalus dalam medium penyaringan (e) Tisu transgenik putatif (f) Pokok transgenik dan (g) Penyaringan pokok transgenik dalam Rumah kaca Transgenik

Pada penyaringan generasi T1, sebanyak 12 titisan pokok transgenik daripada setiap kaset gen iaitu PR5, CHT dan kombinasi kedua-dua gen (SG) dengan empat replikasi telah disaring. Pokok padi transgenik dan pokok padi kawalan ditanam dalam baldi dan infeksi dengan patogen *R. solani* telah dijalankan pada peringkat pembiakan beranak maksimum. Proses inokulasi pokok transgenik dilakukan dengan meletakkan potongan jerami padi yang telah diinokulasi dengan *R. solani* di bahagian batang padi. Penilaian penyakit hawar seludang dilakukan dengan mengukur tinggi lesi relatif penyakit hawar seludang [relative lesion height (RLH)] berdasarkan skor *Standard Evaluation System (SES) for Rice* (IRRI). Simptom penyakit hawar seludang dengan lesi bujur berwarna kelabu kehijauan dapat diperhatikan di bahagian seludang padi pada aras air di pokok kawalan seawal tujuh hari selepas infeksi dijalankan. Simptom lesi ini kemudiannya merebak ke bahagian batang dan daun padi. Pada titisan pokok transgenik, simptom lesi ini lewat diperhatikan iaitu selepas dua minggu infeksi dijalankan dan boleh merebak ke bahagian batang. Tetapi bagi titisan pokok transgenik yang berpotensi pula terdapat titisan yang tidak menunjukkan simptom dan ada yang bersimptom, namun begitu simptom lesi ini tidak merebak ke bahagian lain tanaman tidak seperti pada pokok kawalan (*Gambar 2*). Pokok transgenik dan pokok kawalan dibiarkan sehingga mengeluarkan bunga dan biji benih (generasi T2) yang terhasil dituai. Titisan pokok transgenik yang menunjukkan RLH dengan skor 0 (tiada simptom) dan skor 1 ($RLH \leq 20\%$) telah dipilih untuk penyaringan selanjutnya iaitu generasi T2.

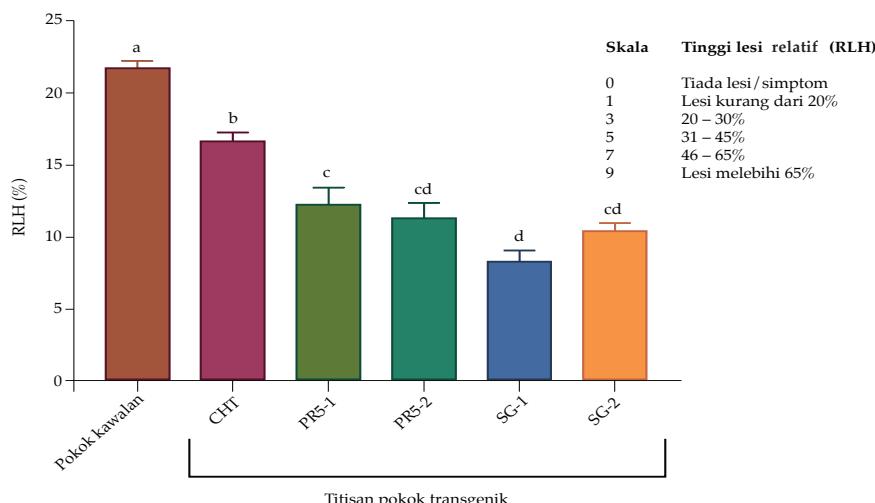
Penyaringan T2 diteruskan dengan pemilihan tiga titisan transgenik yang berpotensi dengan 16 replikasi untuk setiap kaset gen telah dijalankan. Penyaringan titisan pokok yang berpotensi diteruskan pada generasi T3 dengan tiga titisan untuk PR5, dua titisan untuk CHT dan dua titisan untuk SG. Dua puluh empat replikasi bagi setiap titisan ditanam dan akhirnya pada generasi T4 sebanyak dua titisan berpotensi untuk PR5, dua titisan kombinasi SG dan satu titisan berpotensi CHT ditanam dengan 30 replikasi.

Berdasarkan analisis terkini ke atas generasi T4 titisan transgenik PR5 dan SG mempunyai peningkatan kerintangan terhadap penyakit hawar seludang berbanding dengan titisan yang hanya mengandungi gen CHT sahaja (*Rajah 1*). Hasil penyaringan ini menunjukkan titisan padi transgenik mempunyai daya tahan yang lebih tinggi terhadap kulat patogen *R. solani* berbanding dengan pokok kawalan. Penentuan titisan yang berpotensi ini penting untuk digunakan dalam kajian lapangan seterusnya. Tahap pengekspresan gen yang ditransformasi dalam genom pokok transgenik berpotensi pula dianalisis dengan menggunakan kaedah PCR kuantitatif nyata maya (RT-qPCR) selepas infeksi dengan fungus *R. solani* dijalankan. Keputusan RT-qPCR menunjukkan terdapat peningkatan pengekspresan ke

atas gen yang ditransformasikan dalam titisan pokok transgenik yang berpotensi dengan peningkatan tahap kerintangan terhadap penyakit hawar seludang berbanding dengan pokok kawalan. Hasil kajian ini membuktikan peningkatan pengekspresan gen PR5 dan CHT dalam pokok padi mampu meningkatkan daya tahan pokok tersebut terhadap penyakit hawar seludang. Kombinasi kedua-dua gen dalam satu kaset gen menunjukkan kemampuan meningkatkan daya pokok padi yang lebih baik berbanding hanya menggunakan gen tunggal sahaja.



Gambar 2. Penyaringan titisan padi transgenik dan pokok kawalan dengan patogen *R. solani* di Wing 1, Rumah kaca Transgenik. C: Pokok kawalan; CHI: Pokok transgenik dengan pengekspresan melampau gen Chitinase; PR5; Pokok transgenik dengan pengekspresan melampau gen Thaumatin-like protein; dan SG: Pokok transgenik dengan pengekspresan melampau gen Thaumatin-like protein dan Chitinase



Rajah 1. Perbezaan tahap toleransi T4 padi transgenik berpotensi berbanding dengan padi kawalan selepas penyaringan dengan fungus *Rhizoctonia solani*. Perbezaan abjad menunjukkan perbezaan yang signifikan ($p < 0.05$) berdasarkan Tukey's test

Hala tuju penyelidikan

Pendekatan bioteknologi moden dengan menggunakan keadah kejuruteraan genetik tumbuhan tidak dapat disangkal telah memberikan sumbangan besar dalam dunia pertanian moden. Hasil kajian ini menunjukkan kaedah kejuruteraan genetik berpotensi untuk memberi nilai tambah tanaman padi dari segi kerintangan terhadap penyakit hawar seludang. Kerintangan padi MR 219 terhadap penyakit hawar seludang dapat dipertingkatkan dengan pengeskpresan konstitutif gen berkaitan patogenesis seperti *Thaumatin-like protein* dan *Chitinase*. Titisan pokok padi transgenik yang toleran dengan penyakit ini juga telah berjaya dikenal pasti. Walau bagaimanapun, kajian lanjut perlu dijalankan untuk validasi kerintangan titisan pokok transgenik yang diperoleh di lapangan terkawal (*confined field trial*). Selain itu, kajian lapangan terkawal juga penting untuk mengumpul data-data biokeselamatan yang diperlukan untuk kegunaan kajian lanjut di lapangan terbuka dan di lapangan komersial kelak. Penggunaan varieti yang rintang terhadap penyakit hawar seludang dijangka dapat meningkatkan pengeluaran hasil padi dan secara tidak langsung dapat meningkatkan pendapatan petani. Dengan penanaman varieti yang rintang, ia dapat mengurangkan kebergantungan petani kepada penggunaan racun kimia bagi pengurusan penyakit ini. Padi transgenik yang tahan terhadap penyakit juga boleh dijadikan sebagai alternatif dalam pemilihan varieti padi dalam program pembaikbakaan untuk meningkatkan lagi kualiti padi sedia ada. Selain itu, kesedaran awam berkaitan teknologi kejuruteraan genetik juga perlu dipertingkatkan agar teknologi ini dapat diterima pakai sebagai teknologi alternatif dalam membangunkan varieti padi elit baharu tempatan.

Penghargaan

Penulis ingin merakamkan setinggi penghargaan kepada Institut Penyelidikan dan Kemajuan Pertanian Malaysia (MARDI) atas dana Projek Pembangunan P-RB401 yang dianugerahkan untuk menjalankan penyelidikan ini. Sekalung budi dan ucapan penghargaan juga ditujukan kepada semua kolaborator dan kakitangan sokongan di Pusat Penyelidikan Bioteknologi dan Nanoteknologi (BN), Pusat Penyelidikan Tanaman Industri (IC) serta Pusat Penyelidikan Padi dan Beras (PR) yang terlibat secara langsung ataupun tidak dalam penyelidikan ini.

Bibliografi

- Ahn, S.W. dan Mew, T.W., (1986). Relation between rice sheath blight (ShB) and yield. *International Rice Research Newsletter*. 11: 21 – 22
- Chang-Jiang Zhao, Ai-Rong Wang, Yu-Jun Shi, Liu-Qing Wang, Wen-De Liu, Zong-Hua Wang dan Guo-Dong Lu (2008). Identification of Defense-Related Genes in Rice Responding to Challenge by *Rhizoctonia Solani*. *Theor Appl Genet*. 116: 501 – 516
- IRRI. (2013). *Standard Evaluation System (SES) for Rice. 5th Edition*. Manila: International Rice Research Institute (IRRI)
- Lin, W., Anuratha, C., Datta, K. et al. (1995) Genetic Engineering of Rice for Resistance to Sheath Blight. *Nat Biotechnol* 13: 686 – 691
- Mahdavi, F., Sariah, M. dan Maziah, M. (2012) Expression of rice *thaumatin-like protein* gene in transgenic banana plants enhances resistance to fusarium wilt. *Appl Biochem Biotechnol*. 2012 Feb;166(4): 1008 – 1019
- Odeny Ojola, P., Nyaboga, E.N., Njiru, P.N., dan Orinda, G. (2018). Overexpression of rice *thaumatin-like protein* (Ostlp) gene in transgenic cassava results in enhanced tolerance to *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *manihotis*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 16(1): 125 – 131
- Rohaiza, A.R., Muhamad Ridzuan, A.R., Hazirah, A.W., Mohd Yusof, N.R., Noriha, M.A., Amin Asyraf, T., Nazrul Hisham, N., Rogayah, S. dan Sew, Y.S. (2015). Identification and isolation of defense related genes in rice during sheath blight early infection. International Congress of the Malaysian Society for Microbiology (ICMSM 2015). 7 – 10 Dis. 2015, Bayview Beach Resort, Pulau Pinang
- Srinivasachary, L., Willocquet, L. dan Savary, S. (2011). Resistance to rice sheath blight (*Rhizoctonia solani* Kuhn) [teleomorph: *Thanatephorus cucumeris* (A. B. Frank) Donk.] disease: Current status and perspectives. *Euphytica* 178: 1 – 22
- Yu-Xiang, Z., Zhi-Juan, J.I., Liang-Yong, M.A., Xi-Ming, L.I. dan Chang-Deng, Y. (2011). Advances in mapping loci conferring resistance to rice sheath blight and mining *Rhizoctonia solani* resistant resources. *Rice Science* 18(1): 56 – 66

Ringkasan

Penyakit hawar seludang adalah salah satu penyakit utama padi yang disebabkan oleh kulat patogenik tanah yang dikenali sebagai *Rhizoctonia solani* dan pencarian varieti padi yang rintang telah dijalankan secara meluas dalam program pembiakbakaan konvensional. Sebagai pendekatan alternatif, teknik kejuruteraan genetik telah diaplikasi untuk membangunkan padi transgenik dengan peningkatan daya ketahanan terhadap penyakit ini. Dua gen yang berkaitan dengan patogenesis (PR) telah dipencilkan daripada padi varieti Tetep yang toleran terhadap penyakit ini dan ditransformasi ke dalam genom padi varieti tempatan, MR 219. Keseluruhan tiga kaset gen telah dibangunkan yang mengandungi gen tunggal *Thaumatin-like protein*, *Chitinase* serta kombinasi kedua-dua gen. Transgen dibangunkan dalam orientasi *sense* dan setiap gen dikawal oleh promoter *Cauliflower Mosaic Virus* (CaMV) 35S untuk pengekspresan yang konstitutif. Dalam kajian lapangan tertutup, pokok transgenik MR 219 disaring dengan *R. solani*

dan dinilai dengan menggunakan skor Sistem Penilaian Piawai untuk Padi (SES). Titisan berpotensi kemudian dipilih daripada satu generasi ke satu generasi dan terkini generasi keempat (T4) menunjukkan titisan transgenik yang mengekspres gen *Thaumatin-like protein* dan kombinasi kedua-dua gen secara konstitutif menunjukkan peningkatan toleran terhadap pathogen ini. Kajian lanjutan di lapangan terkawal perlu dijalankan bagi mengenalpasti potensi sebenar titisan padi transgenik yang terhasil.

Summary

Sheath blight disease is one of the major rice diseases caused by a soil-borne pathogenic fungus known as *Rhizoctonia solani* and the search for resistant rice varieties has been extensively conducted in the conventional breeding programme. As an alternative approach, genetic engineering has been employed to develop transgenic rice with increased resistance against the pathogen. Two pathogenesis-related (PR) protein genes were isolated from Tetep rice variety and transformed to a high-yielding Malaysian rice variety, MR 219. A total of three constructs have been designed which contain individual *Thaumatin-like protein* gene, individual *Chitinase* gene, and stacked of both genes. The transgenes were constructed in sense orientation and each individual transgene was controlled by Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) 35S promoter for constitutive expression. In the contained trial environment, transgenic MR 219 plants were challenged by using *R. solani* and evaluated by using the Standard Evaluation System for Rice (SES) score. Potential lines were then selected over generation and the current fourth generation (T4) lines showed that the transgenic lines over-expressing *Thaumatin-like protein* and stacked of both genes showed enhanced tolerance against the pathogen. Further evaluation in confined field trial is required to determine the true potential of the transgenic rice lines.

Pengarang

Rogayah Sekeli (Dr.)
Pusat Penyelidikan Bioteknologi dan Nanoteknologi
Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM
43400 Serdang, Selangor
E-mel: lynn@mardi.gov.my

Sanimah Simoh (Dr.), Nazrul Hisham Nazaruddin, Amin Asyraf Tamizi,
Zaifulfarizal Zulkifli, Izzati Sofia Mohd Dorani, Rohaiza Ahmad Redzuan dan
Sew Yun Shin (Dr.)

Pusat Penyelidikan Bioteknologi dan Nanoteknologi,
Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM,
43400 Serdang, Selangor

Nora'ini Abdullah
Pusat Penyelidikan Tanaman Industri, Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM,
43400, Serdang, Selangor, Malaysia

Siti Norsuha Misman dan Mohamad Ariff Asrofp Rahim
Pusat Penyelidikan Padi dan Beras, MARDI Seberang Perai, Beg Berkunci No. 203,
13200 Kepala Batas, Pulau Pinang.