

## **Transformasi genetik *in planta*: Teknik ringkas penghantaran sistem CRISPR/Cas9 ke dalam sel bagi tujuan pengeditan genom padi**

(*In planta* genetic transformation: a simple technique for delivering the CRISPR/Cas9 system into cells for rice genome editing)

Amin Asyraf Tamizi, Rogayah Sekeli, Nazrul Hisham Nazaruddin, Nurul Hidayah Samsulrizal dan Zarina Zainuddin

### **Pengenalan**

Sistem pengeditan genom/gen *Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats* (CRISPR)/Cas9 kini diaplikasikan dalam bidang bioteknologi tumbuhan untuk penghasilan tanaman yang disunting secara genetik. Teknologi ini membolehkan penyelidik mengubah suai kod genetik secara selektif dan spesifik untuk menghasilkan ciri yang diinginkan tanpa melibatkan integrasi gen asing. Dalam penyelidikan tanaman padi, teknologi pengeditan genom telah digunakan untuk menambah baik pelbagai ciri yang berkaitan dengan ketahanan terhadap faktor abiotik seperti kemarau dan kemasinan. Selain itu, padi rintang terhadap penyakit seperti hawar bakteria (*bacterial blight*), hawar seludang (*sheath blight*) dan virus tungro turut dibangunkan melalui teknologi pengeditan genom.

Pengeditan CRISPR/Cas9 untuk tanaman melibatkan aliran kerja yang terdiri daripada empat fasa utama iaitu: (1) penentuan jujukan gen/DNA sasaran, (2) perekaan RNA panduan [*guide RNA* (gRNA)] dan penggabungan komponen gen CRISPR/Cas9, (3) penghantaran sistem CRISPR/Cas9 dan (4) analisis hasil pengeditan gen. Antara fasa-fasa ini, kaedah penghantaran sistem CRISPR/Cas9 ke dalam sel tumbuhan merupakan tahap yang paling kritikal dan kecekapan penghantaran ini bergantung kepada jenis tanaman. Tiga sistem penghantaran CRISPR/Cas9 yang biasa dilaporkan ialah transformasi polietilena glikol (PEG), bedilan partikel dan transformasi berperantara *Agrobacterium*. Di MARDI, teknik berperantara *Agrobacterium* diguna pakai untuk transformasi sistem CRISPR/Cas9 ke dalam sel padi yang melibatkan dua jenis transformasi; transformasi *in vitro* (melalui kalus) dan transformasi *in planta* (melalui biji).

Pusat Penyelidikan Bioteknologi dan Nanoteknologi (BN) MARDI dengan kerjasama Kuliah Sains, Universiti Islam Antarabangsa Malaysia (UIAM) telah membangunkan sistem penghantaran sistem CRISPR/Cas9 melalui transformasi *in planta* pada tanaman padi menggunakan cambahan biji MR 219 (*Oryza sativa* ssp. *indica*). Bagi meningkatkan capaian maklumat kepada pengguna, artikel buletin ini menerangkan aspek-aspek utama kajian dan protokol teknologi penghantaran sistem CRISPR/Cas9 tersebut.

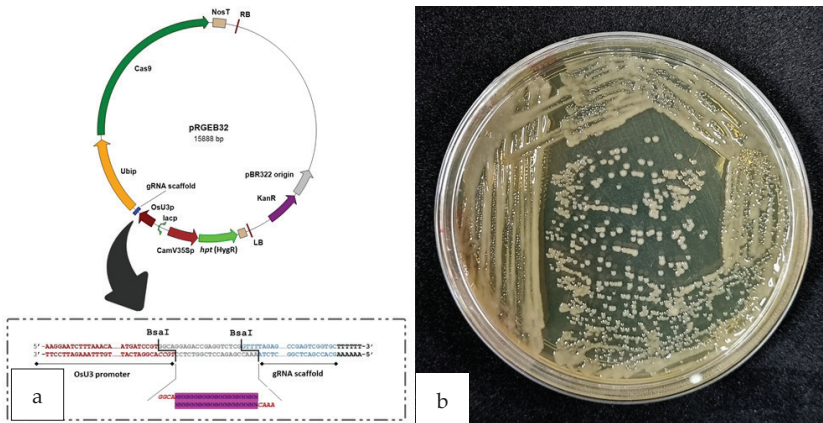
### **Kelebihan teknologi penghantaran melalui transformasi *in planta***

Transformasi genetik *in planta* menawarkan beberapa kelebihan berbanding dengan kaedah transformasi genetik konvensional (seperti transformasi *in vitro* kalus), terutama dari segi kecekapan dan kemudahan pengendalian. Kaedah ini tidak melibatkan penjaanaan kalus melalui kultur tisu yang memerlukan persekitaran yang aseptik dan memakan masa, terutama bagi spesies tumbuhan yang rekalsitran kepada manipulasi *in vitro*. Selain itu, transformasi *in planta* secara amnya mampu mencapai kecekapan transformasi yang memuaskan (5 – 30% kadar keberjayaan), di samping dapat memendekkan kitaran penjaanaan tumbuhan terubah genetik kerana meristem pucuk apikal dijadikan sebagai sasaran transformasi. Walau bagaimanapun, transformasi *in planta* cenderung untuk menghasilkan tumbuhan T<sub>0</sub> kimera (*chimeric*) apabila sel yang ditransformasi bercampur dengan sel yang tidak ditransformasi. Namun, masalah ini dapat ditangani melalui swakacuk (*selfing*) bagi menghasilkan progeni (T<sub>1</sub>) yang mempunyai komposisi sel tertransformasi atau terubah genetik secara seragam. Kelebihan-kelebihan ini menjadikan transformasi *in planta* sebagai alternatif yang sangat berpotensi bagi penyelidikan, terutama dalam kajian pengeditan gen dan manipulasi genetik.

### **Protokol teknologi penghantaran sistem CRISPR/Cas9 melalui transformasi *in planta***

#### ***Penyediaan Agrobacterium***

Vektor DNA CRISPR/Cas9 (pRGEB32) yang mengandungi kaset gen Cas9, *hygromycin phosphotransferase* (*hpt-HygR*) dan gRNA ditransformasikan ke dalam sel kompeten *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 menggunakan kaedah *freeze-thaw* (*Gambar 1*). Sel-sel tersebut kemudian dikultur ke atas agar pepejal Luria Bertani (LB) yang mengandungi antibiotik kanamisin (50 µg/mL) dan rifampicin (50 µg/mL), seterusnya diinkubasi selama dua hari pada suhu 28 °C sehingga koloni-koloni mula terbentuk. Tiga koloni dipilih secara rawak, plasmid vektor dipencilkan dan seterusnya dihantar untuk penjujukan bagi mengesahkan kehadiran vektor CRISPR/Cas9 yang mengandungi gRNA dalam sel *Agrobacterium*. Sel-sel positif yang mengandungi vektor CRISPR/Cas9 dikulturkan dalam medium LB cecair semalaman pada suhu 28 °C. Kultur sel ini dijadikan stok gliserol 15% (v/v) dan disimpan dalam peti beku –80 °C sebagai stok gliserol 15%. Stok kultur ini mampu bertahan dalam tempoh tiga hingga lima tahun dan boleh digunakan untuk transformasi biji padi pada masa yang diperlukan.



Gambar 1. (a) Peta vektor CRISPR/Cas9 (pRGE32) yang menunjukkan kedudukan dan susunan kaset gen Cas9, hygromycin phosphotransferase (hpt-HygR) dan gRNA. (b) *Agrobacterium tumefaciens* 'EHA105' digunakan sebagai agen perantara yang memindahkan gen-gen sistem CRISPR/Cas9 tersebut ke dalam sel padi

### Penyediaan biji padi dan transformasi secara *in planta*

Benih padi dikupas secara manual (boleh disimpan pada 4 °C untuk kegunaan jangka masa panjang) dan proses pensterilan permukaan biji dilakukan seperti berikut:

- 1) Biji yang telah dikupas direndam di dalam 75% (w/v) larutan etanol (satu minit) dan dibilas dua kali dengan air suling steril (sdH<sub>2</sub>O) (dua minit setiap bilasan). Seterusnya, biji direndam di dalam larutan sterilisasi [Clorox® (tidak dicairkan) yang dicampur 0.25% (v/v) Tween 20] dan digoncang (*swirling*) selama 30 minit menggunakan alat pengoncang (*shaker*). Goncangan secara kasar perlu dielakkan semasa proses sterilisasi untuk mengelakkan kerosakan pada biji. Biji dibilas empat kali dengan sdH<sub>2</sub>O (lima minit setiap bilasan) sebelum direndam di dalam sdH<sub>2</sub>O selama satu minit lalu dikeringkan di atas kertas turas steril selama satu jam. Sebanyak 100 mL larutan sterilisasi disediakan di dalam kelalang kon 250 mL, dan setiap larutan boleh digunakan untuk mensterilkan 100 benih yang telah dikupas.
- 2) Selepas proses pensterilan permukaan, biji direndam di dalam 100 mL sdH<sub>2</sub>O (dalam kelalang 250 mL) dan dibiarkan bercambah dalam gelap pada suhu bilik (27 °C) [Gambar 2(a)]. Biji perlulah terendam sepenuhnya dalam air untuk memastikan koleoptil (tunas) dan bukannya akar yang tumbuh dahulu. Air diganti sekali semasa perendaman (selepas 24 jam) untuk mengawal sebarang pertumbuhan mikroorganisma endofit. Selepas 48 jam direndam, koleoptil yang tumbuh dipotong menggunakan pisau steril [Gambar 2(b)]. Parameter ini disesuaikan untuk kultivar MR 219, manakala kultivar padi lain kemungkinan memerlukan prosedur yang sedikit berbeza.

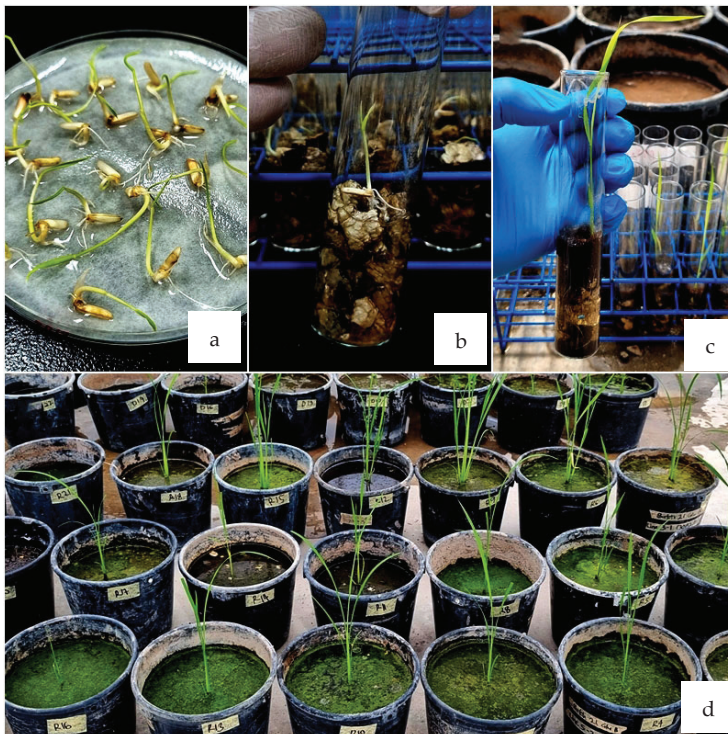
Sementara itu, satu koloni *Agrobacterium* segar yang mengandung vektor CRISPR/Cas9 dikultur semalaman pada suhu 28 °C di dalam 5 mL brot LB (mengandung 50 µg/mL kanamisin dan 50 µg/mL rifampisin) dengan goncangan pada kadar kelajuan 180 rpm. Kultur ini kemudiannya diemparkan (*centrifuged*) pada kelajuan 9,000 RCF selama 10 minit, cecair supernatan dibuang dan pelet diampaiakan semula (*resuspend*) dengan 150 mL brot Murashige dan Skoog separuh kekuatan (1/2 MS) yang mengandungi vitamin (jenama Duchefa Biochemie). Kultur seterusnya diinkubasi (28 °C, 180 rpm) selama kira-kira dua jam untuk meningkatkan ketumpatan optik (OD600) daripada 0.3 kepada 0.6. Ampaian *Agrobacterium* ini dilabel sebagai kultur inokulasi.

Sebanyak 50 biji padi yang dipotong tunasnya sebelum ini direndam di dalam 30 mL kultur inokulasi menggunakan piring Petri dan kerja-kerja dilakukan dalam kabinet keselamatan biologi (BSC). Piring Petri seterusnya ditutup dan dibalut menggunakan parafilm dan diletakkan di dalam kebuk vakum [*Gambar 2(c)*]. Pam diaktifkan sehingga tekanan vakum mencapai 80 kPa dan dibiarkan selama 15 minit. Kemudian, injap dibuka perlahan-lahan selama dua minit dan vakum diaktifkan semula sehingga tekanan mencapai 80 kPa selama tiga minit. Piring Petri dikeluarkan daripada kebuk vakum dan diletakkan semula di dalam BSC. Biji-biji padi dikeluarkan daripada piring Petri dan diletakkan di atas kertas turas steril selama satu minit untuk menyingkirkan lebihan cecair kultur *Agrobacterium* pada biji. Biji-biji disusun pada kertas turas steril yang dibasahkan dengan 3 mL brot MS yang mengandungi vitamin [*Gambar 2(d)*] dan diinkubasi di dalam bilik gelap pada suhu 25 ± 2 °C selama lima hari bagi membolehkan *Agrobacterium* menjangkiti sel-sel pada tunas padi. Hampir keseluruhan aktiviti transformasi biji perlu dilakukan dalam BSC bagi mengekalkan keadaan aseptik terhadap biji dan kultur *Agrobacterium*.

Selepas lima hari, anak benih padi yang mula kehijauan [*Gambar 3(a)*] dikeluarkan dari bilik gelap dan direndam dalam larutan karbenisilin 250 µg/mL selama 1 jam dengan goncangan perlahan untuk membunuh *Agrobacterium*. Plantlet dibilas tiga kali dengan sdH<sub>2</sub>O dan dipindahkan ke dalam campuran vermikulit dan tanah alluvial yang diautoklaf [*Gambar 3(b)*]. Seterusnya plantlet padi dibiarkan untuk membesar di bawah pencahayaan lampu kalimantang (1600 lx, 16 jam sehari/8 jam malam) pada suhu bilik 27 ± 2 °C selama tujuh hari. Seterusnya, plantlet yang berakar diaklimatisasikan selama tujuh hari lagi di rumah kaca di bawah jaring peneduh (teduhan 50%). Setelah plantlet menghasilkan daun baharu [*Gambar 3(c)*], pokok dipindahkan ke dalam baldi yang mengandungi tanah alluvial dan dibiarkan membesar [*Gambar 3(d)*].



Gambar 2. (a) Proses-proses transformasi *in planta* berperantara *Agrobacterium* menggunakan biji merangkumi empat langkah utama, (b) Penyediaan biji, potongan koleoptil (tunas), (c) Aplikasi vakum dan (d) Ko-kultivasi biji bersama *Agrobacterium* yang mengandungi vektor CRISPR/Cas9

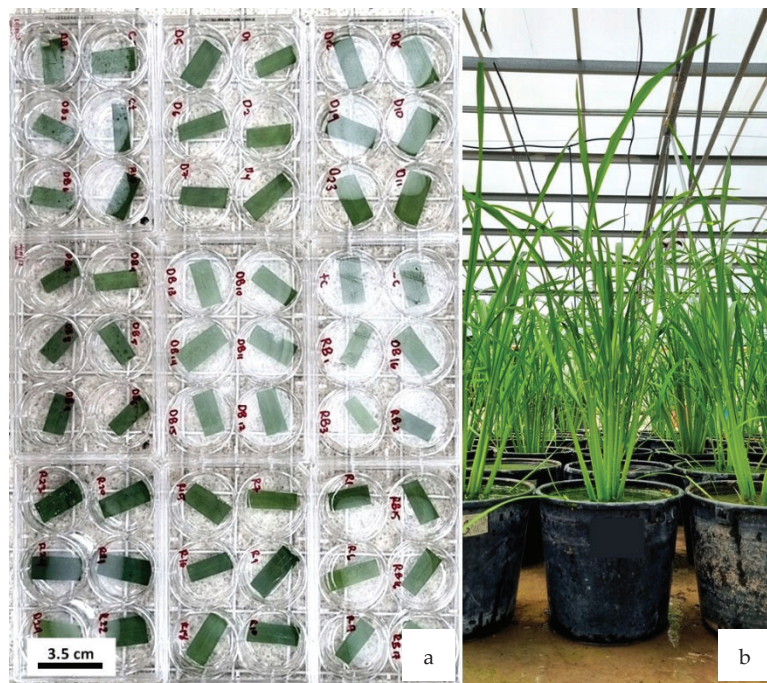


Gambar 3. (a) Fasa selepas ko-kultivasi dan aklimatisasi anak benih padi, (b) Pembunuhan *Agrobacterium* (250 µg/mL karbenisilin) dan pembersihan benih padi, (c) Pengakaran di makmal, aklimatisasi di rumah kaca dan (d) Pemindahan ke dalam pasu yang mengandungi tanah alluvium

### Saringan kerintangan higromisin dan analisis PCR

Selain kaset gen Cas9 dan gRNA, vektor CRISPR/Cas9 yang digunakan untuk transformasi turut mengandung gen penanda pemilihan *hygromycin phosphotransferase (hpt-HygR)*. Apabila sistem CRISPR/Cas9 berjaya dihantar ke dalam sel yang akan membolehkan pokok padi tahan kepada antibiotik higromisin dan keadaan ini memudahkan penyaringan titisan yang ditransformasi. Kajian lengkung pembunuhan (*kill curve*) turut perlu dijalankan bagi menentukan tempoh dan kepekatan perencatan minimum (MIC) larutan higromisin untuk menyebabkan kekuningan penuh (nekrosis) pada daun padi kawalan. Langkah ini penting memandangkan varieti padi berlainan serta jenama pengeluar higromisin besar kemungkinan mempunyai tindak balas yang berbeza.

Bagi menyaring pokok yang berjaya ditransformasi, asai daun dijalankan dengan meletakkan jalur daun sepanjang 2 cm ke dalam plat kultur sel enam ruang (*6-well culture plate*) yang mengandungi 3 mL larutan higromisin ( $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) dan BAP ( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) dengan permukaan bawah daun (*abaxial*) menyentuh larutan berkenaan (*Gambar 4*). Seterusnya, jalur daun padi MR 219 diinkubasi pada suhu  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  dalam bilik tumbesaran (12 jam siang/12 jam malam) selama tujuh hari. Peratusan keluasan hijau pada daun selepas tempoh inkubasi seterusnya diukur menggunakan ImageJ. Asai daun ini sesuai dilakukan terhadap

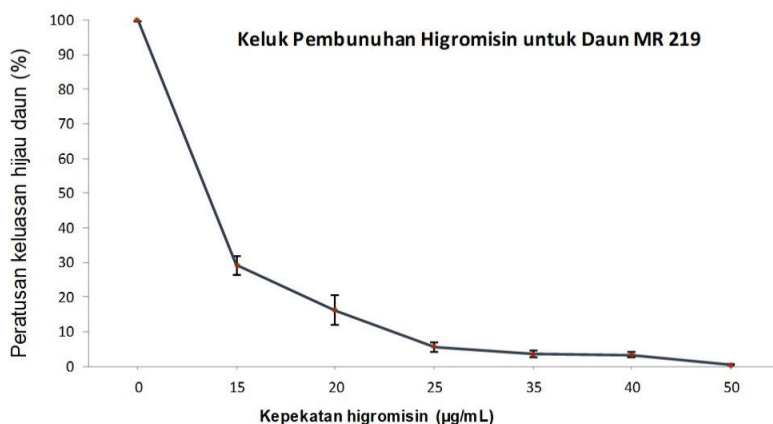


Gambar 4. (a) Ujian higromisin terhadap jalur daun yang diambil daripada pokok-pokok padi berusia (b) yang ditransformasikan dan dijangka mengandungi sistem CRISPR/Cas9

pokok padi berusia satu hingga dua bulan dan setiap anak padi (*tiller*) perlu dilabel sebagai sampel berbeza walaupun berasal daripada rumpun yang sama.

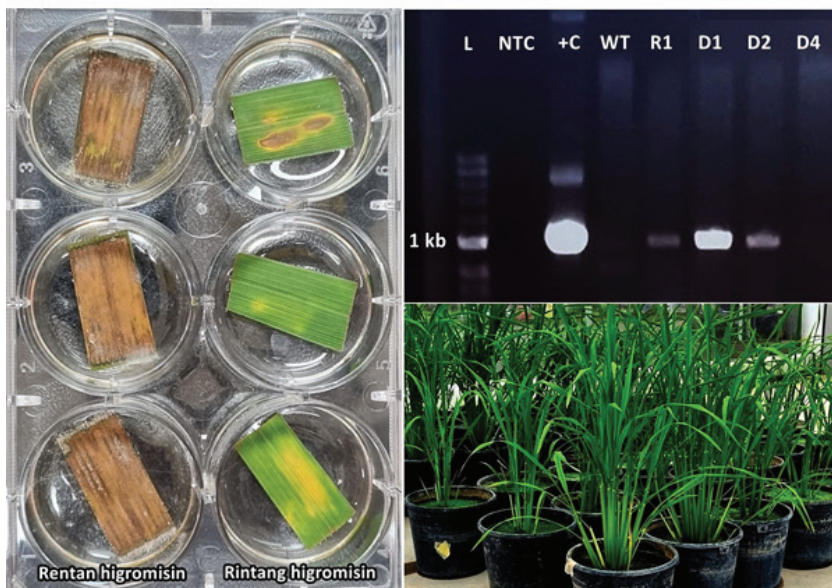
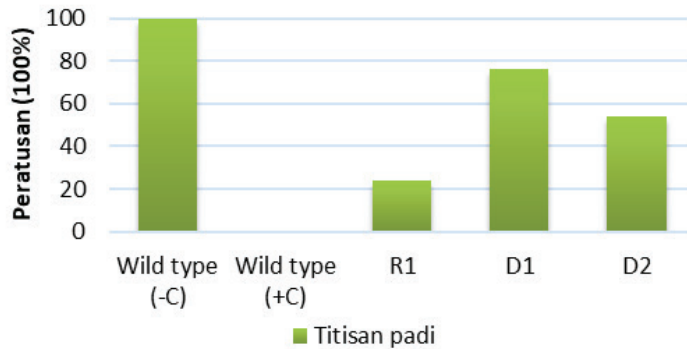
### Asai daun dan analisis molekul kehadiran gen Cas9 pada pokok padi

Kajian lengkung pembunuhan (*kill curve*) higromisin terhadap padi MR 219 kawalan menunjukkan larutan higromisin berkepekatan  $50 \mu\text{g}/\text{mL}$  adalah paling sesuai untuk membunuh daun padi MR 219 dalam masa tujuh hari (*Rajah 1*). Larutan antibiotik tersebut juga perlu ditambah dengan BAP ( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) bagi mengelakkan daun menjadi kuning secara pramatang. Selepas tujuh hari saringan melalui asai daun, sampel yang tahan kepada higromisin (permukaan hijau  $\geq 50\%$ ) dilabel sebagai pokok transforman putatif dan dianalisis menggunakan tindak balas berantai polimerase (PCR) untuk menentusahkan kehadiran gen Cas9. Berdasarkan analisis PCR, sekitar 9% titisan (termasuk titisan R1, D1 dan D2) daripada rumpun yang berasingan telah ditentusahkan mengandungi gen Cas9 (*Rajah 2*). Kehadiran gen Cas9 turut dikesan ketika padi pada tahap senesens (usia lebih empat bulan). Hal ini menunjukkan teknik transformasi *in planta* yang dibangunkan untuk padi MR 219 berjaya menghantar sistem CRISPR/Cas9 secara stabil sekurang-kurangnya untuk generasi  $T_0$ .



*Rajah 1.* Kajian lengkung pembunuhan (*kill curve*) menunjukkan  $50 \mu\text{g}/\text{mL}$  merupakan kepekatan perencatan minimum (MIC) bagi larutan higromisin untuk menyebabkan daun padi MR 219 (kawalan) bertukar kekuningan secara keseluruhannya selepas tujuh hari inkubasi. Palang ralat mewakili ralat piawai untuk tiga replikasi ( $n = 3$ )

**Peratusan hijau daun selepas saringan asai daun**



NTC – kawalan bukan templat; +C – kawalan positif (plasmid CRISPR/Cas9 pRGEB32); WT – kawalan negatif; R1, D1, D2 dan D4 – pokok yang dianalisis untuk mengesan kehadiran gen Cas9

Rajah 2. Saringan pokok padi yang rintang kepada higromisin melalui asai daun dan analisis PCR bagi menentusahkan kehadiran gen Cas9 (1 kb) dalam pokok padi

Artikel ini memberi fokus kepada keberkesanan teknik transformasi genetik berperantara *Agrobacterium* secara *in planta* bagi penghantaran sistem CRISPR/Cas9 yang berpotensi diperluaskan penggunaannya untuk varieti padi dan spesies tumbuhan bijirin yang lain. Plasmid CRISPR/Cas9 yang digunakan terdiri daripada komponen kaset gen *Cas9*, *hpt-HygR* dan *gRNA* (Gambar 1) dan pengesanan salah satu daripada komponen gen tersebut dalam padi melalui PCR sudah memadai untuk langkah penentusahan. Apabila komponen-komponen kaset



gen CRISPR/Cas9 tersebut berjayakan diintegrasikan pada genom, sel-sel padi akan mensintesis ribonukleoprotein gRNA-Cas9 yang seterusnya akan mencetuskan pemotongan (dan membawa kepada pengeditan) pada jujukan DNA yang disasarkan. Berdasarkan dapatan preliminari daripada kajian yang masih berlangsung, beberapa titisan yang ditentusahkan membawa gen *Cas9* telah dikenal pasti mempunyai perubahan pada DNA sasaran (belum diterbitkan). Memandangkan komponen kaset gen CRISPR/Cas9 dan gen sasaran pengeditan merupakan trait tidak terhubung (*unlinked traits*), segregasi akan mengikut pola pewarisan Mendel. Oleh itu, populasi padi yang mengandungi gen teredit dan bebas daripada elemen gen CRISPR boleh diperolehi seawal generasi pertama ( $T_1$ ).

### **Kesimpulan**

Teknologi CRISPR/Cas9 merupakan teknologi baharu dalam bioteknologi tumbuhan. Terdapat pelbagai cara untuk menghantar sistem CRISPR/Cas9 ke dalam sel tumbuhan seperti transformasi berperantara *Agrobacterium*, transformasi biolistik dan elektroporasi. Artikel ini memperincikan proses transformasi *in planta* menggunakan *Agrobacterium* sebagai perantara untuk padi *O. sativa* ssp. *indica* cv. MR 219 yang berpotensi diaplikasikan untuk varieti padi lain. Kaedah ini membolehkan penghantaran sistem CRISPR/Cas9 ke dalam sel padi tanpa melalui prosedur kultur tisu yang memerlukan tempoh masa transformasi yang lebih singkat disamping menggunakan tahap amalan aseptik yang sederhana. Namun demikian, kerja-kerja optimasi masih perlu dilakukan bagi meningkatkan kadar transformasi menjangkau kadar 10%.

### **Penghargaan**

Penulis dengan ikhlas menzahirkan penghargaan kepada Dr. Wee Chien Yeong (Ibu Pejabat MARDI) kerana menyediakan strain *Agrobacterium* EHA105 dan Puan Site Noorzuraini Abd Rahman (MARDI Seberang Perai) kerana membekalkan benih MR 219. Kami juga berterima kasih kepada anggota Makmal Biologi Molekul, Pusat Penyelidikan Bioteknologi dan Nanoteknologi, MARDI; Dr. Noriha Mat Amin, Dr. Rohaiza Ahmad Redzuan, Puan Siti Akhtar Mohshim, Puan Azlinda Erny Yunus dan Puan Nor Hidayu Che Asari atas panduan dan bantuan berkaitan dengan penyelidikan ini. Ucapan terima kasih khas juga ditujukan kepada editor dan penilai yang memberikan pandangan berharga untuk penambahbaikan artikel ini. Penyelidikan ini dijalankan bawah geran Pembangunan MARDI (Projek Mega RMK-12: P-502, Sub-projek D) dan the Fundamental Research Grant Scheme (FRGS/1/2019/STG05/UIAM/03/8). Kajian ini melibatkan organisma terubah genetik dan pemberitahuan (*notification*) telah dikemukakan kepada Jabatan Biokeselamatan (JBK) [Ruj: JBK(S)600-3/1/159(6) dan JBK(S)600-3/1/115(9)].

## Bibliografi

- Md Yusof, A. A., Tamizi, A. A., Mohd-Zim, N. A., Abdul Sattar, S. S., Salleh, M. S., Ahmad Azmi, N. S., Zainal, Z., Zainuddin, Z., & Samsulrizal, N. H. (2023). Development of CRISPR/Cas9 construct in rice (*Oryza sativa* subsp. *indica*) using Golden Gate cloning method towards drought tolerance. *Journal of Tropical Life Science*, 13, 257–76. Diperoleh dari <http://dx.doi.org/10.11594/jtls.13.02.04>
- Pride, L., Gary, V., & Agehara, S. (2020). How to measure leaf disease damage using image analysis in ImageJ: HS1382, 9 2020. *University of Florida IFAS, EDIS 2020* (5). Diperoleh dari <https://doi.org/10.32473/edis-hs1382-2020>.
- Tamizi, A. A., Md-Yusof, A. A., Mohd-Zim, N. A., Nazaruddin, N. H., Sekeli, R., Zainuddin, Z., & Samsulrizal, N. H. (2023). *Agrobacterium*-mediated *in planta* transformation of cut coleoptile: a new, simplified, and tissue culture-independent method to deliver the CRISPR/Cas9 system in rice. *Molecular Biology Reports*, 50(11), 9353–9366. Diperoleh dari <https://doi.org/10.1007/s11033-023-08842-2>.
- Zainuddin, Z., Mohd-Zim, N. A., Ahmad Azmi, N. S., Roowi, S. H., & Samsulrizal, N. H. (2021). Genome editing for the development of rice resistance against stresses: a review. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 44, 599–616. Diperoleh dari <https://doi.org/10.47836/pjtas.44.3.06>

## Ringkasan

Sebuah protokol transformasi secara *in planta* untuk penghantaran sistem CRISPR/Cas9 ke dalam sel padi Malaysia (*Oryza sativa* L. subsp. *indica* cv. MR 219) telah dibangunkan. Kaedah ini menggunakan benih yang bercambah dengan koleoptil (tunas) yang dipotong sebagai sasaran untuk infiltrasi *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 dan peratus keberkesanan transformasi yang telah dicapai ialah sekitar 9%. Secara ringkas, biji padi yang telah dikupas disterilkan permukaannya dan direndam selama 48 jam, dan seterusnya koleoptil dipotong untuk mendedahkan meristem apikal. Koleoptil yang dipotong kemudian diinokulasi dengan *A. tumefaciens* yang mengandungi vektor CRISPR/Cas9. Ko-kultivasi dijalankan dalam persekitaran gelap pada suhu  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama lima hari, diikuti dengan tempoh tujuh hari untuk proses pengakaran dan aklimatisasi. Plantlet terhasil kemudian dipindahkan ke dalam pasu tanpa lubang yang mengandungi tanah alluvium. Daun padi yang berumur dua bulan seterusnya dijalankan kajian pemilihan higromisin menggunakan larutan yang mengandungi  $50\text{ }\mu\text{g/mL}$  higromisin dan  $1\text{ }\mu\text{g/mL}$  6-benzylaminopurine (BAP). Langkah ini membolehkan pengenalpastian tumbuhan yang tahan (rintang) kepada higromisin dan dilabel sebagai transforman yang putatif. Transforman tersebut kemudiannya disahkan melalui tindak balas berantai polimerase (PCR) untuk mengesahkan integrasi gen Cas9 bagi padi  $T_0$ . Protokol ini menawarkan pendekatan yang pantas untuk penyuntingan genom padi, tanpa melalui prosedur kultur tisu.

## Summary

We recently established a streamlined protocol for the delivery of the CRISPR/Cas9 system via in planta transformation in Malaysian rice (*Oryza sativa* L. subsp. *indica* cv. MR 219). This method utilised sprouting seeds with severed coleoptiles as targets for infiltration with *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105, resulting in a transformation efficiency of 9%. In summary, the dehusked seeds were sterilised on the surface and soaked for 48 hours, after which the coleoptile was cut to expose the apical meristem. The cut coleoptile was then inoculated with the *A. tumefaciens* carrying the CRISPR/Cas9 vector. Co-cultivation occurred in a dark environment at  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  for five days, followed by a seven-day period for rooting and acclimatisation. The seedlings were then transferred to non-draining pots containing alluvial soil. Two-month-old plant leaves underwent a hygromycin selection assay using a selection solution containing  $50\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$  hygromycin and  $1\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$  6-benzylaminopurine (BAP), allowing for the identification of hygromycin-resistant plants as potential transformants. The transformants were further validated through polymerase chain reaction (PCR) to confirm the integration of the *Cas9* gene in the putative  $T_0$  lines. This protocol offers a quick approach to rice genome editing, eliminating the need for tissue culture.

## Pengarang

Amin Asyraf Tamizi

Pusat Penyelidikan Bioteknologi dan Nanoteknologi

Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor

E-mel: aminasyraf@mardi.gov.my

Rogayah Sekeli (Dr.) dan Nazrul Hisham Nazaruddin

Pusat Penyelidikan Bioteknologi dan Nanoteknologi

Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor

Nurul Hidayah Samsulrizal (Dr.) dan Zarina Zainuddin (Prof. Madya Dr.)

Kuliah Sains, Universiti Islam Antarabangsa Malaysia (UIAM)

25200 Kuantan, Pahang