

Penyuntingan genom padi: Teknologi alternatif melawan penyakit karah

(Rice genome editing: An alternative technology to combat blast disease)

Rogayah Sekeli, Amin Asyraf Tamizi, Nazrul Hisham Nazaruddin, Mazlizaznina Manap, Zaifulfarizal Zulkifli, Wee Chien Yeong, Siti Norsuha Misman, Siti Norhayati Ismail dan Rahiniza Kamaruzaman

Kata kunci: penyuntingan genom, MR 297, penyakit karah, CRISPR/Cas9, *Broad Spectrum Resistance Digu 1*

Pengenalan

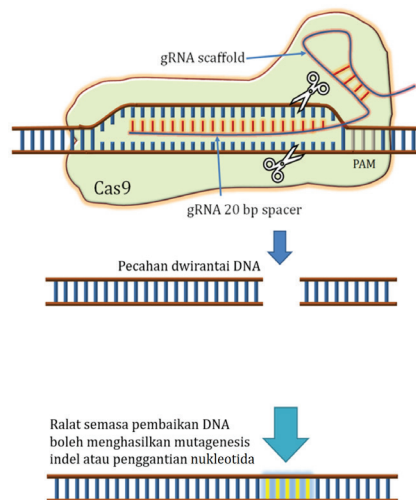
Pengeluaran padi merupakan antara sektor utama dalam industri pertanian negara. Namun begitu, pengeluaran padi di Malaysia menghadapi beberapa isu kritikal khususnya berkaitan dengan penyakit padi yang disebabkan oleh jangkitan patogen. Penyakit karah yang disebabkan oleh kulat *Pyricularia oryzae*, merupakan salah satu penyakit utama yang menjadi ancaman kepada industri tanaman padi. Ia boleh menyebabkan kehilangan hasil yang signifikan iaitu antara 10 – 30% dan penularan penyakit karah yang tidak dikawal boleh memusnahkan keseluruhan kawasan penanaman padi. Dalam usaha untuk mengatasi masalah ini, Institut Penyelidikan dan Kemajuan Pertanian Malaysia (MARDI) telah membangunkan beberapa varieti padi yang tahan kepada penyakit karah termasuklah varieti MARDI Siraj 297 (MR 297) yang telah diperkenalkan pada tahun 2016. Walau bagaimanapun, proses evolusi yang berlaku secara semula jadi telah menyebabkan kemunculan strain baharu patogen *P. oryzae* yang lebih agresif dan ketahanan varieti padi sedia ada terhadap penyakit ini menjadi semakin lemah dan berkurangan. Selain itu, pesawah padi juga bergantung kepada penggunaan racun kulat yang digunakan secara berkala bagi mengawal penyakit ini. Kedua-dua pendekatan yang digunakan pada masa kini dilihat mempunyai keterbatasan akibat kemunculan patogen baharu yang lebih agresif dan kebimbangan terhadap pencemaran alam sekitar kerana penggunaan racun kulat secara berterusan.

Aplikasi teknologi CRISPR/Cas9 dalam penyuntingan genom tumbuhan

Dalam usaha untuk mengatasi masalah ini, penyelidik telah cuba memanfaatkan teknologi terkini iaitu kaedah penyuntingan genom sebagai salah satu penyelesaian alternatif. Teknologi penyuntingan genom merupakan satu pendekatan bioteknologi berpotensi yang boleh diaplikasikan untuk mengubah dan menambah baik ciri-ciri tanaman, termasuk meningkatkan daya tahan terhadap serangan penyakit. Terdapat beberapa teknologi penyuntingan genom yang telah dibangunkan antaranya *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR), *Transcription Activator-Like Effector Nucleases* (TALEN) dan *Zinc Finger Nucleases* (ZFN). Teknologi

CRISPR/Cas9 telah mendapat perhatian meluas di peringkat global kerana membolehkan penyuntingan jujukan DNA atau gen dilakukan dengan tahap ketepatan dan spesifik yang tinggi. Berbanding dengan kaedah pengubahsuaian genetik secara konvensional iaitu teknologi organisma terubah suai secara genetik (GMO), penyuntingan genom berasaskan CRISPR/Cas9 turut menawarkan kelebihan dari segi keberkesanan serta meningkatkan kebolehterimaan awam terhadap produk akhir.

Teknologi CRISPR/Cas9 ini diadaptasi daripada sistem pertahanan sendiri bakteria *Streptococcus pyogenes* bagi melawan jangkitan virus seperti bakteriofaj. Mekanisme pertahanan melibatkan penghasilan enzim dikenali sebagai CRISPR-associated protein 9 (Cas9). Enzim Cas9 turut dikenali sebagai gunting genetik (*genetic scissor*) yang berkeupayaan memotong jujukan DNA dengan tepat dan berpotensi mencetuskan mutasi secara spesifik dan proses ini dibantu oleh RNA panduan (*guide RNA*; gRNA). Elemen gRNA bertindak sebagai molekul pemandu yang mengarahkan enzim Cas9 ke lokasi DNA sasaran, menjadikannya komponen penting dalam memastikan ketepatan tindak balas enzim tersebut (*Gambar rajah 1*). Dengan ciri tersebut, teknologi CRISPR/Cas9 berupaya menyunting jujukan DNA atau gen sasaran dengan kebarangkalian kesilapan yang minimum, menjadikannya satu bentuk teknologi ampuh yang boleh diaplikasikan dalam pelbagai bidang, termasuk penyelidikan bioteknologi, rawatan penyakit genetik, serta pembangunan tanaman dan haiwan dengan ciri-ciri yang ditambah baik.



Gambar rajah 1. Skematik yang menggambarkan struktur dan mekanisme penyuntingan CRISPR/Cas9 menunjukkan bahawa pemotongan bebenang ganda dua DNA berlaku pada tapak sasaran yang kemudiannya disambung semula secara alami melalui sistem pembaikan non-homologous end-joining (NHEJ) atau homology-directed repair (HDR sekiranya templat penderma tersedia). Pemadanan gRNA terhadap DNA sasaran mencetuskan enzim Cas9 untuk memotong bebenang DNA tersebut

Penyuntingan gen Bsr-d1 ke atas varieti padi MR 297 bagi menangani penyakit karah

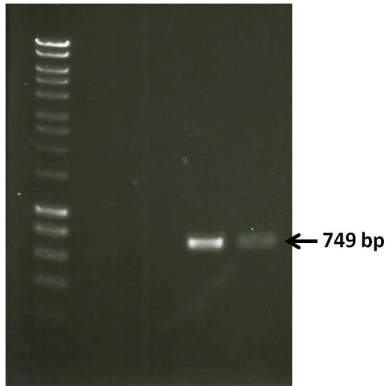
Teknologi penyuntingan genom telah diaplikasi sebagai satu kaedah alternatif untuk menangani penyakit karah padi di peringkat global. Pendekatan ini membolehkan pengubahsuaian genetik dilakukan secara spesifik terhadap gen-gen yang berkaitan dengan pertahanan pokok untuk meningkatkan ciri-ciri ketahanan pokok padi terhadap penyakit karah. Salah satu gen berpotensi yang telah dilaporkan ialah *Broad Spectrum Resistance Digu 1 (Bsr-d1)*.

Justeru, kajian penyuntingan gen *Bsr-d1* ini dengan menggunakan teknologi CRISPR/Cas9 telah dijalankan ke atas varieti padi MR 297 di MARDI. Secara khususnya, *Bsr-d1* mengawal ekspresi gen-gen peroksidase, iaitu enzim yang berfungsi menguraikan hidrogen peroksida (H_2O_2). Molekul H_2O_2 ialah salah satu komponen penting dalam mekanisme pertahanan tumbuhan kerana ia bertindak sebagai isyarat yang mencetuskan pelbagai tindak balas pertahanan terhadap patogen. Apabila gen *Bsr-d1* disenyapkan atau disunting, penguraian H_2O_2 dapat dikurangkan, dengan itu lebih banyak H_2O_2 terkumpul di dalam sel sebagai pertahanan alami. Keadaan ini boleh memperkuat sistem pertahanan dan mempercepatkan pengaktifan tindak balas terhadap serangan patogen kulat. Hasilnya, kerosakan pada tanaman padi dapat diminimumkan kerana pertahanan berasaskan pengumpulan H_2O_2 dan penguatan dinding sel mampu mencegah penularan patogen kulat.

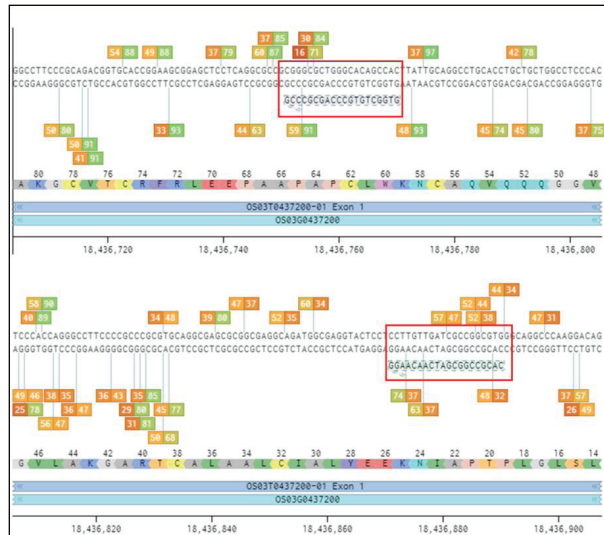
Pembangunan kaset gen CRISPR Bsr-d1

Dalam kajian yang dijalankan, gen *Bsr-d1* terlebih dahulu dipencilkan daripada genom padi MR 297 (*Gambar 1*) dan jujukan DNA dianalisis bagi memastikan ketepatan jujukan DNA gen sasaran. Sementara itu, reka bentuk gRNA dilakukan melalui penentuan lokasi nukleotida optimum dalam gen sasaran dengan menggunakan perisian bioinformatik Benchling (*Gambar rajah 2*). Tapak pengikatan gRNA dipilih berdasarkan keberadaan jujukan *protospacer adjacent motif* (PAM) yang sesuai dan skor kecekapan penyuntingan tertinggi bagi memastikan ketepatan serta keberkesanan sistem CRISPR yang dibangunkan.

RNA panduan (gRNA) yang telah direka bentuk bagi menasarkankan lokasi spesifik dalam gen sasaran kemudiannya diklonkan ke dalam vektor CRISPR yang turut mengandungi gen *Cas9*. Vektor pengekspresan CRISPR, pRGE32 yang digunakan dalam kajian ini diperolehi melalui Perjanjian Perpindahan Material (*Material Transfer Agreement*) dengan Pennsylvania State University dan bahan tersebut diperolehi daripada Addgene, Amerika Syarikat. Vektor lengkap yang mengandungi gRNA dan *Cas9* kemudiannya ditransformasikan ke dalam *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA 105 yang bertindak sebagai agen penghantar dalam proses transformasi tumbuhan.



Gambar 1. Pemencilan gen *Bsr-d1* daripada padi MR 297



Gambar rajah 2. Penggunaan perisian penyuntingan CRISPR Benchling untuk menentukan tapak penyuntingan terbaik bagi gen *Bsr-d1*

Transformasi tumbuhan menggunakan kaedah *in planta*

Kaedah transformasi *in planta* telah digunakan dalam kajian ini dengan menyasarkan koleoptil padi sebagai tisu sasaran. Kaedah transformasi *in planta* adalah satu teknik dalam bioteknologi tumbuhan yang membolehkan kemasukan bahan genetik asing terus ke dalam sel tumbuhan tanpa perlu melalui peringkat kultur tisu. Prosesnya lebih mudah, cepat dan tanpa menjalani sistem kultur tisu yang lebih rumit dan memakan masa. Analisis tindak balas berantai polimerase (PCR) bagi mengesan kehadiran gen *Cas9* dan gen penanda pemilihan antibiotik, *hygromycin phosphotransferase II* (*hptII*) telah dijalankan ke atas titisan pokok putatif yang terhasil dengan menggunakan primer seperti dalam *Jadual 1*. Keputusan analisis PCR telah berjaya mengenal pasti 15 titisan pokok T_0 yang disahkan positif kehadiran gen *Cas9* [Gambar 2(a)] dan gen penanda pemilihan *hptII* [Gambar 2(b)].

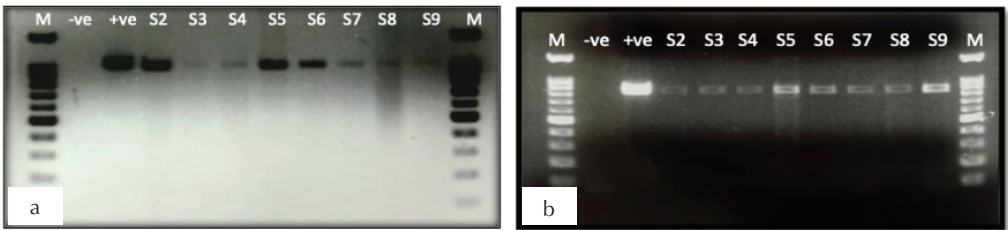
Gen *Bsr-d1* daripada titisan pokok yang positif telah diamplifikasi dan produk PCR dihantar untuk analisis jujukan DNA. Analisis jujukan DNA yang dijalankan turut menunjukkan terdapat perubahan pada susunan nukleotida dalam titisan T_0 yang dihasilkan. *Rajah 1* menunjukkan analisis satu titisan pokok teredit gen yang mengalami perubahan pada tapak sasaran gRNA berbanding dengan pokok kawalan. Dalam kromatogram kawalan, urutan nukleotida kelihatan jelas dan tersusun tanpa sebarang perubahan, menunjukkan tiada mutasi berlaku. Namun, pada pokok teredit gen T_0 , terdapat perubahan atau pertindihan puncak pada kawasan tapak sasaran, menunjukkan berlakunya sisipan nukleotida pada tapak tersebut.

Corak ini menunjukkan bahawa generasi T_0 yang dihasilkan melalui teknik transformasi *in planta* biasanya bersifat *chimeric* (percampuran sel tersunting gen dan yang tidak tersunting) kerana tisu sasaran adalah sel somatik daripada meristem apeks pucuk.

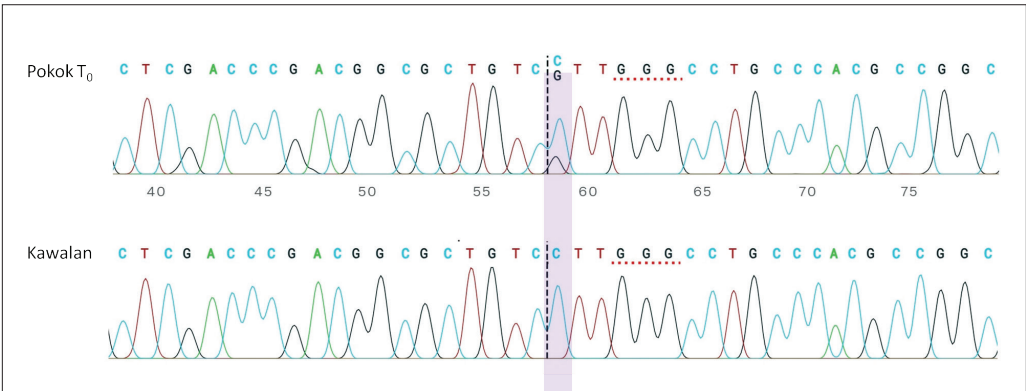
Jadi, sebahagian bulir (*panicle*) yang menghasilkan benih mungkin tidak mewarisi gen tersunting tersebut disebabkan sifat *chimeric* pada generasi T_0 . Namun begitu, dalam generasi T_1 dan seterusnya, tumbuhan yang diperoleh boleh menjadi heterozigot atau homozigot bergantung kepada kebarangkalian gen yang telah disunting diwarisi sepenuhnya seperti mengikut Hukum Mendel. Keputusan analisis jujukan DNA ini membuktikan bahawa pengeditan gen telah berjaya berlaku pada gen sasaran dalam pokok T_0 . Secara keseluruhan terdapat empat titisan yang menunjukkan perubahan pada kawasan tapak sasaran manakala sembilan titisan pokok T_0 yang lain menunjukkan perubahan pada kawasan di luar tapak sasaran.

Jadual 1. Senarai primer yang digunakan dalam analisis tindak balas berantai polimerase pokok putatif teredit gen

Primer	Jujukan DNA	Saiz amplicon
F_Cas9	5'- GTGCCCAGCAAGAAATTCAAGGTGCT-3'	Partial Cas9; 1012 bp
R_Cas9	5'- CAATGTAGCCGGCGTAGCCCGTT-3'	
F_HygR	5'-TTCTACACAGCCATCGGTCCAGACG-3'	35S- <i>hptII</i> ; 858 bp
R_HygR	5'-GCTTCGATGTAGGAGGGCGTGGATA-3'	



Gambar 2. Analisis tindak balas berantai polymerase (PCR). (a) gen Cas9 dan (b) gen *hptII*



Rajah 1. Analisis kromatogram jujukan DNA sampel titisan pokok teredit gen T_0 berbanding dengan pokok kawalan

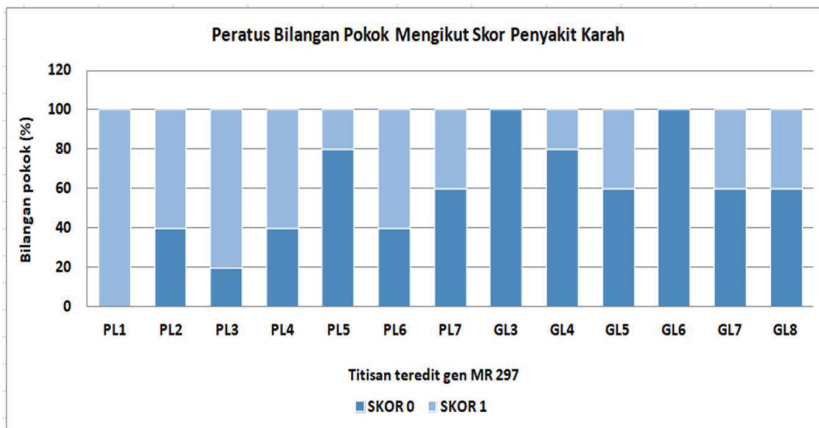
Penyaringan padi teredit gen generasi T₁ MR 297 terhadap penyakit karah

Bagi menilai keberkesanan penyuntingan genom yang telah dilakukan, biji benih titisan-titisan T₁ padi tersunting gen *Bsr-d1* tersebut diuji dengan menjalankan jangkitan menggunakan patogen *P. oryzae* (Gambar 3). Penilaian ketahanan penyakit dijalankan semasa peringkat pertumbuhan daun ketiga hingga keempat bagi memastikan tumbuhan berada dalam fasa yang sesuai untuk analisis penularan penyakit. Dalam proses saringan, spora *P. oryzae* (pencilan MR 297-3.1) digunakan untuk mencetuskan jangkitan pada pokok padi. Selepas tujuh hari inokulasi, tahap jangkitan dinilai berdasarkan simptom yang muncul, seperti kehadiran bintik nekrotik atau lesi pada daun, mengikut piawai *Standard Evaluation System for Rice* (IRRI). Penilaian ini boleh menentukan tahap ketahanan setiap titisan padi tersunting gen *Bsr-d1* yang dibangunkan terhadap penyakit karah.

Keputusan penyaringan generasi T₁ telah berjaya mengenal pasti dua titisan yang paling berpotensi, iaitu titisan yang menunjukkan skor 0 (sangat rintang) pada kesemua lima biji benih yang disaring. Titisan-titisan lain pula menunjukkan campuran skor 0 dan 1 dalam lima replikasi yang diuji (Rajah 2). Penemuan ini membuktikan bahawa penyuntingan atau penyenyapan fungsi gen *Bsr-d1* berpotensi menghasilkan varieti padi yang lebih tahan penyakit dengan mengukuhkan sistem pertahanan dalaman, mempercepat tindak balas terhadap jangkitan dan mengurangkan kerosakan, sekali gus menawarkan pendekatan yang lebih berkesan dan lestari dalam pengurusan penyakit tanaman. Walau bagaimanapun, kajian lanjutan perlu dijalankan melalui ujian lapangan bagi mengesahkan potensi sebenar titisan pokok tersunting gen *Bsr-d1* yang telah diperolehi.



Gambar 3. Penyaringan generasi T₁ padi teredit gen MR 297 yang disaring dengan *P. oryzae*



Rajah 2. Skor penyakit titisan T_1 MR 297 yang disaring dengan *P. oryzae*

Cabaran dan isu penggunaan teknologi penyuntingan genom

Walaupun penyuntingan genom menawarkan pelbagai manfaat dalam pembiakbakaan tanaman, terdapat beberapa isu dan cabaran yang perlu dipertimbangkan termasuk daripada sudut teknikal, etika, perundangan dan penerimaan masyarakat. Daripada segi teknikal, walaupun teknologi CRISPR/Cas9 memberikan ketepatan yang tinggi, terdapat juga risiko penyuntingan luar sasaran (*off target editing*) iaitu pengubahsuaian berlaku pada luar jujukan gen sasaran yang diminati. Ini boleh memberi kebarangkalian terdapatnya kesan mutasi yang tidak diingini.

Daripada segi perspektif dan penerimaan masyarakat, teknologi penyuntingan genom masih belum difahami sepenuhnya. Hal ini menyebabkan sesetengah pihak sukar menerima tanaman yang dihasilkan melalui teknologi ini, kerana wujud kebimbangan terhadap aspek keselamatan serta kemungkinan kesan negatif terhadap alam sekitar. Walaupun tanaman yang terhasil daripada penyuntingan genom berbeza daripada GMO, sebahagian besar masyarakat masih keliru dan menganggapnya sebagai produk yang sama. Persepsi masyarakat terhadap produk penyuntingan genom perlu dipertingkatkan untuk memudahkan proses penerimaan.

Dari segi pengawalseliaan, perundangan yang mengawal penggunaan teknologi penyuntingan genom adalah berbeza mengikut negara. Di Malaysia, pengawalseliaan terhadap aktiviti kegunaan terkawal (*contained used activity*) penyuntingan genom telah mendapat pengecualian menteri, di mana penyuntingan yang melibatkan kurang daripada 20 bp adalah tidak dikawal bawah Akta Biokeselamatan 2007. Sebaliknya, penyuntingan yang melebihi 20 bp akan tertakluk kepada pengawalseliaan yang sama seperti organisma hidup yang diubah suai (LMO). Pengecualian ini memudahkan penyelidik menjalankan kajian penyuntingan genom bagi menambah baik ciri tanaman.

Kesimpulan

Penyuntingan genom menawarkan penyelesaian alternatif yang berpotensi dalam usaha menangani penyakit karah padi. Teknologi ini membolehkan pembangunan varieti padi yang lebih tahan kepada penyakit, mengurangkan keperluan penggunaan racun kimia, meningkatkan hasil tanaman secara signifikan serta menyokong pengeluaran makanan yang selamat dan mampan. Hasil kajian yang dijalankan di MARDI telah berjaya mengenal pasti titisan padi yang berpotensi dengan menunjukkan ciri-ciri ketahanan yang baik terhadap penyakit karah. Selain itu, penggunaan sistem penghantaran vektor CRISPR/Cas9 melalui kaedah transformasi *in planta* telah memudahkan dan memendekkan proses kerja yang diperlukan untuk menghasilkan titisan padi tersunting gen *Bsr-d1*. Di samping itu, pengawalseliaan yang lebih longgar berbanding dengan tanaman transgenik serta pengetahuan yang lebih mendalam mengenai kepentingan teknologi ini dapat membantu pengkomersialan dan memperluas penerimaannya dalam kalangan masyarakat Malaysia.

Penghargaan

Kajian ini dibiayai oleh Dana Projek Pembangunan Penyelidikan RMK-12 bertajuk “Penghasilan varieti padi baharu teredit gen yang berkualiti dan rintang terhadap penyakit kritikal padi” (PRB502).

Bibliografi

- Feng, Z., Zhang, B., Ding, W., Liu, X., Yang, D. L., Wei, P., Cao, F., Zhu, S., Zhang, F., Mao, Y., & Zhu, J. K. (2013). Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Research*, 23(10), 1229–1232.
- IRRI. (2013). Standard evaluation system (SES) for rice. 5th Edition, International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines.
- Razalli, I. I., Abdullah-Zawawi, M. R., Tamizi, A. A., Harun, S., Zainal-Abidin, R. A., Jalal, M. I. A., Ullah, M. A., & Zainal, Z. (2025). Accelerating crop improvement via integration of transcriptome-based network biology and genome editing. *Planta*, 261, 92.
- 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.
- Sekeli, R., Tamizi, A. A., Nazaruddin, N. H., Ahmad-Redzuan, R., Abdullah, N. I., Zulkifli, Z., Misman, S. N., Rahim, M. A. A., & Sew, Y. S. (2024). Overexpression of *OsTlp* improves resistance of MR 219 rice (*Oryza sativa* spp. *indica*) to sheath blight. *Journal of Tropical Plant Physiology*, 16(2), 12–28.
- Ziwei, Z., Junjie, Y., Mawsheng, C., Xiaobo, Z., Chao, Y., Kaiwei, H., Yuchen, L., Min, H., Jing, W., Li, S., Long, W., Yingjie, W., Jichun, W., Jiali, L., Hai, Q., Yu, B., Mingwu, L., Kun, H., Tuo, Q., Qingqing, H., Xuewei, C., & Weitao, L. (2020). New insights into *bsr-d1*-mediated broad-spectrum resistance to rice blast. *Molecular Plant Pathology*, 21(7), 951–960.

Ringkasan

Penyakit karah padi yang disebabkan oleh kulat *Pyricularia oryzae*, memberikan impak yang negatif kepada pengeluaran padi di Malaysia. Penggunaan kaedah pembiakbakaan konvensional mempunyai kekangan disebabkan oleh kemunculan strain patogen baharu yang lebih virulen. Oleh itu, kajian ini dijalankan untuk meneliti potensi penyuntingan genom sebagai pendekatan alternatif dalam pengurusan penyakit karah padi dengan penekanan khusus terhadap penggunaan teknologi CRISPR/Cas9. Penyuntingan genom berupaya mengubah suai sesuatu gen secara spesifik yang terlibat dalam tindak balas imun tumbuhan, sekali gus meningkatkan ketahanan tumbuhan terhadap patogen. Kajian yang dijalankan di MARDI mengenai penyuntingan gen *Bsr-d1* dalam varieti padi MR 297 menunjukkan hasil yang memberangsangkan apabila beberapa titisan T₁ yang telah diubah suai menunjukkan ketahanan yang signifikan terhadap penyakit karah. Selain itu, pokok padi tersunting gen hasil penggunaan teknologi ini menyediakan penyelesaian yang lebih lestari melalui pengurangan penggunaan racun kulat kimia serta dapat memelihara alam sekitar dan meningkatkan hasil padi. Kajian penilaian lanjut perlu dijalankan dalam persekitaran terkawal dan lapangan terbuka untuk menentukan potensi sebenar tanaman padi yang telah disunting ini. Meskipun teknologi penyuntingan genom masih baharu di Malaysia, penggunaan teknologi ini menjadi satu penyelesaian alternatif dan efektif dalam meningkatkan penghasilan tanaman padi dan mengurangkan kerugian akibat serangan penyakit karah pada masa hadapan.

Summary

The rice blast disease, caused by the fungus *Pyricularia oryzae*, significantly reduces rice yield production in Malaysia. The used of conventional breeding has limitations due to the emergence of new and more virulent pathogen strains. This research investigates the potential of genome editing as an alternative approach for managing rice blast disease, with an emphasised on CRISPR/Cas9 technology. Genome editing can specifically modify genes involved in the plant's immune response and improve plants resistance against pathogens. Research carried out at MARDI on the editing of the *Bsr-d1* gene in the MR 297 rice variety showed promising results, with several T₁ edited lines exhibiting significant resistance against the blast disease. Besides that, this technology also provides a more sustainable solution by reducing the use of chemical fungicides and promoting environmental protection and an increase in rice yield. Further evaluation study needs to be conducted in controlled and open field environments to determine the real potential of the edited rice plants obtained. Although genome editing technology is still relatively new in Malaysia, it is hoped that application of this technology will become an effective and alternative approach to boost rice production and reduce losses due to blast disease in the future.

Pengarang

Rogayah Sekeli (Dr.)

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

E-mel: lynn@mardi.gov.my

Amin Asyraf Tamizi, Nazrul Hisham Nazaruddin, Mazlizaznina Manap, Zaifulfarizal
Zulkifli, Wee Chien Yeong (Dr.) dan Siti Norhayati Ismail

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

Siti Norsuha Misman (Dr.)

Pusat Penyelidikan Padi dan Beras,
MARDI Seberang Perai, 13200 Kepala Batas, Pulau Pinang

Rahiniza Kamaruzaman

Pusat Penyelidikan Padi dan Beras,
Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor