

Transformasi Gen *Proteolisis 6 (PRT6)* Berperantarakan *Agrobacterium tumefaciens* ke dalam Kotiledon Tomato kultivar *Micro Tom*

(*Agrobacterium tumefaciens* Mediated Transformation of the *Proteolysis 6 (PRT6)* Gene into Cotyledons of Tomato cv. *Micro Tom*)

INTAN ELYA SUKA, NUR FARHANA ROSLAN, BEE LYNN CHEW, HOE HAN GOH,
ZAMRI ZAINAL & NURULHIKMA MD ISA*

ABSTRAK

Gen *Proteolisis 6 (PRT6)* merupakan gen yang memainkan peranan penting dalam tapak jalan N-end rule dan berfungsi sebagai enzim E3 ligase. *PRT6* berperanan dalam pengenalan protein sasaran bagi proses degradasi. Objektif utama kajian ini adalah untuk mentransformasi konstruk *RNAi PRT6* ke dalam tomato berperantarakan *Agrobacterium tumefaciens*. Ini bertujuan untuk memahami peranan tapak jalan N-end rule semasa proses pemasakan buah. Beberapa faktor yang memberi kesan kepada transformasi seperti masa ko-penanaman dan juga kepekatan antibiotik yang digunakan telah dioptimumkan. Keputusan kajian menunjukkan pengeraman kotiledon selama 48 jam pada medium ko-penanaman dapat meningkatkan penghasilan kalus sebanyak 61% manakala penggunaan 500 mg/L antibiotik karbenisilin dalam medium regenerasi pucuk dapat mengurangkan kontaminasi *A. tumefaciens* sehingga 5.2%. Selain itu, strain *A. tumefaciens C58* merupakan strain *A. tumefaciens* yang paling sesuai digunakan sebagai perantara dalam kajian ini. Tindak balas berantai polimerase (*PCR*) telah dijalankan pada pucuk yang terhasil untuk mengesahkan integrasi fragmen *PRT6* ke dalam genom tomato. Berdasarkan analisis *PCR*, kesemua tujuh pucuk putatif transgenik adalah merupakan transforman positif.

Kata kunci: Antibiotik; *A. tumefaciens*; kalus; ko-penanaman; *Proteolisis 6*

ABSTRACT

Proteolysis 6 (PRT6) gene plays an important role in the N-end rule pathway which functions as an E3 ligase enzyme. PRT6 functions to recognise target proteins for degradation. The main objective of this study is to transform the PRT6 RNAi construct through Agrobacterium tumefaciens into tomato. The purpose of this study was to understand the role of the N-end rule pathway during fruit ripening. Several factors affecting transformation efficiency such as co-cultivation time and concentration of antibiotics were optimised. The results from this study showed that pre-cultured cotyledons incubated for 48 h in co-cultivation medium increased the callus formation to 61% while using 500 mg/L carbenicillin antibiotic in the shoot regeneration medium reduced the contamination of A. tumefaciens to 5.2%. Besides, A. tumefaciens strain C58 was shown to be the most suitable A. tumefaciens strain to be used in this study. Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed on the regenerated shoots to confirm integration of the PRT6 fragment into the tomato genome. Based on the PCR analysis, all putative transgenic shoots were positive transformants.

Keywords: Antibiotic; *A. tumefaciens*; callus; co-cultivation; *Proteolysis 6*

PENDAHULUAN

Micro Tom merupakan tumbuhan tomato daripada kultivar kerdil yang pada awalnya digunakan sebagai tanaman hiasan (Saito et al. 2011). *Micro Tom* mempunyai beberapa kriteria istimewa seperti ketinggian yang rendah, kitaran hidup yang singkat dan saiz genom yang kecil iaitu 350 Mbp (Carvalho et al. 2011; Martí et al. 2006). Buah *Micro Tom* dapat dituai sekitar hari ke-70 hingga hari ke-90 selepas biji benihnya disemai. Oleh kerana ciri-ciri istimewa *Micro Tom* yang hampir sama dengan model tumbuhan *Arabidopsis thaliana*, tumbuhan ini dijadikan sebagai model tumbuhan bagi tumbuhan berbuah. Penghasilan tumbuhan transgenik tomato daripada kultivar ini telah banyak dihasilkan dengan menggunakan eksplan

seperti kotiledon dan hipokotil. Tumbuhan transgenik yang terhasil telah banyak membantu para pengkaji memahami dengan lebih baik tentang fungsi sesuatu gen. Ini dapat dilihat daripada segi perubahan morfo-fisiologi pokok transgenik tersebut akibat perubahan dalam pengekspresan gen yang dikaji.

Proteolisis 6 (PRT6) merupakan gen yang mengekod enzim E3 ligase yang berperanan sebagai *N-recognin* dalam tapak jalan *N-end rule* (Gibbs et al. 2011). Tapak jalan *N-end rule* merupakan tapak jalan yang sangat terpulihara dalam organisma eukariot (Gibbs et al. 2014). Tapak jalan ini menghubungkan antara jangka hayat protein secara *in vivo* dengan kaedah mengenal pasti residu protein yang tidak stabil pada terminal-N (Varland et al.

2015). Pelekatan molekul ubikuitin pada protein yang tidak stabil dijalankan secara enzimatik iaitu dengan penglibatan enzim pengaktifan (E1), enzim konjugasi (E2) dan enzim E3 ligase. Pelekatan ubikuitin pada protein tidak stabil serta pengecaman protein sasaran oleh E3 ligase menyebabkan degradasi protein berlaku (Graciet et al. 2010; Varland et al. 2015; Varshavsky 2011).

Dalam tapak jalan *N-end rule*, PRT6 berperanan mengenal pasti substrat protein yang mempunyai residu tidak stabil bagi proses degradasi protein pada 26S proteasom. Kajian terdahulu menunjukkan bahawa kumpulan subfamili faktor transkripsi Etilina kumpulan VII (ERF VII) adalah substrat sasaran pertama yang ditemui dalam tumbuhan (Gibbs et al. 2015, 2011). Substrat ini mempunyai ciri susunan motif metionina-sistina (MCGGAIL/L) pada terminal-N (Nakano et al. 2006). Pemotongan asid amino Metionina (Met) oleh enzim *Met amino peptidase* (MAP) ketika proses pasca-translasi mengakibatkan asid amino sistina (Cys) terdedah di terminal-N. Substrat yang membawa residu sistina ini seterusnya mengalami proses pengoksidaan dan mengalami penambahan kumpulan arginin oleh enzim *Arg-tRNA protein transferase*. Residu Arg yang terdedah di terminal-N protein adalah merupakan residu tidak stabil bagi tapak jalan *N-end Rule* yang akan dikenal pasti oleh PRT6 untuk proses degradasi protein (Graciet et al. 2010). Kajian lepas menunjukkan bahawa substrat ERF VII ini juga berfungsi sebagai pengesan oksigen dalam tumbuhan terutama ketika keadaan kekurangan oksigen iaitu hipoksia. Dalam keadaan hipoksia, residu sistina pada substrat ERF VII tidak dapat dioksidakan. Oleh itu, tiada modifikasi berlaku bagi menghasilkan residu protein tidak stabil, ini menyebabkan degradasi protein tidak berlaku dan substrat ini akan terkumpul (Gibbs et al. 2016). Selain daripada itu, kajian dalam tumbuhan *A. thaliana* juga menunjukkan PRT6 juga terlibat dalam pengawalan percambahan biji benih, pembukaan dan penutupan stomata serta pemanjangan hipokotil berikutan kestabilan substrat protein sasaran ERF VII dalam mutan PRT6 (Gibbs et al. 2016).

Banyak kajian telah dijalankan sebelum ini bagi memahami tapak jalan *N-end rule* dengan menggunakan model tumbuhan *A. thaliana* (Gibbs et al. 2016) dan barli (Mendonzo et al. 2016). Namun begitu *A. thaliana* tidak mempunyai buah. Ini menyebabkan pendedahan tentang tapak jalan ini terutama ketika proses perkembangan dan pemasakan buah masih kurang diketahui. Oleh yang demikian, tumbuhan tomato daripada kultivar *Micro Tom* telah digunakan bagi penghasilan tumbuhan transgenik dalam kajian ini. Gen PRT6 yang telah dipencilkan daripada sampel buah masak (*breaker* +5) telah diklonkan ke dalam vektor RNAi yang dipacu oleh promoter *Poligalakturonase* (PG). Promoter ini digunakan bagi mengkaji kesan pengurangan pengekspresan gen PRT6 ketika proses pemasakan buah. Klon PRT6 RNAi telah ditransformasi ke dalam tiga strain *A. tumefaciens* yang berbeza bagi mengenal pasti strain yang sesuai digunakan dalam uji kaji ini. Beberapa proses pengoptimuman telah diuji

seperti jangka masa penderaman ko-penanaman selepas transformasi dan kepekatan antibiotik karbenisilin yang sesuai untuk mengurangkan kontaminasi *A. tumefaciens* pada medium aruhan kalus.

BAHAN DAN KAEDAH

PENGLONAN PRT6 KE DALAM VEKTOR RNAI DI BAWAH KAWALAN PROMOTER POLIGALAKTURONASE (PG)

Biji benih *Micro Tom* diperoleh daripada The University of Nottingham, UK. Biji benih ditanam di dalam kebuk pertumbuhan (Conviroon, USA) pada suhu 22°C. Gen sasaran PRT6 telah dipencilkan daripada sampel buah matang +5 melalui transkripsi berbalik rantai polimerase (RT-PCR) dengan menggunakan pasangan pencetus attB1_PRT6: 5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAAAAAGCAGG CTT CGT TGC GGT CAC TCA GGC TAT-3' dan attB2_PRT6: 5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC TCG CCA CAC

TCC ATC AGT TC-3'. Amplikon yang terhasil telah diklonkan ke dalam vektor pK8gWIWG-PG-B4 yang bersaiz 18137 pb. Plasmid ini diperoleh daripada Plant System Biology Department, Ghent Belgium. Pengklonan dilakukan mengikut sistem pengklonan Gateway (Invitrogen, Paisley, UK). Plasmid yang membawa konstruk positif PRT6 RNAi telah diekstrak dan kemudian ditransformasi ke dalam *A. tumefaciens* strain C58 (USM), LBA 4404 (UKM) dan GV 3101 (UKM).

TRANSFORMASI PRT6 KE DALAM KOTILEDON MICRO TOM

Biji benih dibersihkan dengan 50% etanol dan 50% larutan kloroks serta digoncang selama 30 saat. Biji benih dibilas dan dikeringkan di atas kertas turas dan kemudian disemai di dalam balang yang mengandungi medium 1/2 Murashige dan Skoog (MS). Daun pertama hasil percambahan biji benih dipotong kepada dua bahagian selepas berusia tujuh hari. Eksplan kotiledon ini dieramkan di atas piring petri yang mengandungi medium KCMS (4.4 g MS, 20 g sukrosa, 200 mg KH₂PO₄, 0.9 mg/L tiamin, 100 µM asetosrington, pH 5.7, 3 g agar) selama 24 jam di bilik kultur tisu.

Eksplan kotiledon yang telah dieram semalaman direndam ke dalam kultur ampaian *A. tumefaciens*. Seterusnya, eksplan kotiledon dikultur di dalam medium pra-penderaman KCMS selama 24 jam dan 48 jam dalam keadaan gelap bagi tujuan ko-penanaman. Apabila proses penderaman selesai, eksplan kotiledon dipindahkan ke dalam piring petri yang mengandungi medium aruhan kalus. Penyediaan medium aruhan kalus dilakukan berdasarkan kajian lepas oleh Chetty et al. (2013) dan Sun et al. (2006) dengan sedikit modifikasi pada hormon yang digunakan. Kajian lepas menggunakan hormon zeatin (C₁₀H₁₃N₅O), manakala dalam kajian ini zeatin ribosid (C₁₅H₂₁N₅O₅) digunakan. Medium aruhan kalus yang telah digunakan dalam kajian ini adalah seperti berikut: (4.3 g/L MS, 30 g/L sukrosa, 100 mg/L inositol, vitamin Nitsch, 0.05 mg/L asid folik, 2.0 mg/L zeatin ribosid, pH 5.8, 3.0 g

agar, 100 mg/L kanamisin, 250 mg/L sifotaksim). Prosedur subkultur eksplan dilakukan pada setiap 2 minggu. Selepas kalus terhasil, ia dipindahkan ke medium aruhan pucuk untuk fasa regenerasi (4.3 g/L MS, 30 g/L sukrosa, 100 mg/L inositol, vitamin Nitsch, 0.05 mg/L asid folik, 1.0 mg/L zeatin ribosid, pH 5.8, 3.0 g agar, 100 mg/L kanamisin, 250 mg/L sifotaksim). Semua uji kaji dijalankan dengan lima replikasi dan setiap replikasi mengandungi 15 kotiledon yang telah diinfeksi. Peratus penghasilan kalus dikira melalui pembentukan kalus per eksplan dibahagikan dengan jumlah keseluruhan eksplan yang digunakan.

PENCERAPAN KONTAMINASI *A. TUMEFACIENS* PADA EKSPAN

Pencerapan kontaminasi *A. tumefaciens* pada eksplan dijalankan dengan membuat pemerhatian terhadap kotiledon yang telah diinfeksi selama tiga minggu. Kotiledon yang mengalami kontaminasi dicera dengan mata kasar dan peratus kontaminasi dikira melalui bilangan eksplan yang tercemar dengan kontaminasi *Agrobacterium* kepada jumlah keseluruhan eksplan yang mengalami transformasi.

ANALISIS STATISTIK

Analisis varian sehala (ANOVA) telah dijalankan dengan menggunakan perisian *Statistical Analysis Software* (SAS) diikuti dengan ujian *Duncan Multiple Range* (DMRT) bagi menentukan perbezaan signifikan ($p \leq 0.05$). Kesemua uji kaji dijalankan dengan lima replikasi.

PENYARINGAN TUMBUHAN TRANSGENIK

Daun tomato direndam bersama cecair nitrogen di dalam tiub mikropengempar 1.5 mL. Sampel dikisar sehingga menjadi serbuk sebelum ditambah dengan penimbal pengestrakan (10 mM Tris HCl, pH 9.0, 0.4 M Litium Klorida, 2 mM EDTA, pH 8.0, 1% SDS). Tiub kemudian diempar pada kelajuan maksimum dan supernatan terhasil dipindahkan ke dalam tiub mikropengempar baru. Isopropanol ditambahkan ke dalam tiub mikropengempar sebelum dieram pada suhu bilik selama 2 min. Sampel kemudian diempar pada kelajuan maksimum dan supernatan terhasil dibuang. Pelet yang terhasil dibersihkan dengan 70% etanol sebelum diampai ke dalam penimbal TE. Sampel genomik yang diperolehi telah digunakan sebagai templat dalam proses PCR dengan menggunakan pasangan pencetus transgen *PG-F*: 5'-GAG ACG GGA GAA GAC AAG CC-3' dan *PRT6-R*: 5'-TCG CCA CAC TCC ATC AGT TC-3'.

KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN

PENGHASILAN KALUS DARIPADA STRAIN *A. TUMEFACIENS* BERBEZA

Berdasarkan analisis *in silico* menggunakan pangkalan data *Tomato eFP Browser*, pengekspresan *PRT6* adalah

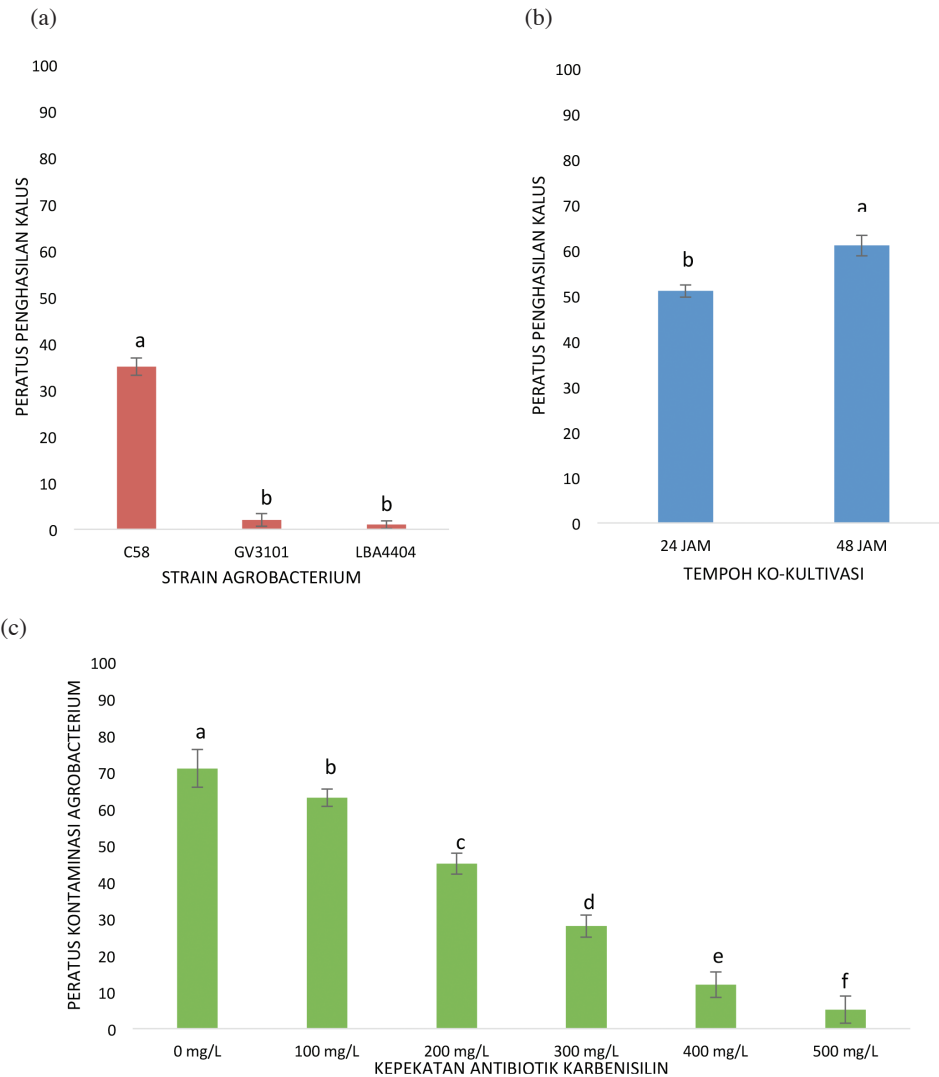
paling tinggi pada buah matang +5. Oleh itu, pemencilan *PRT6* telah dijalankan pada buah matang +5. Selepas pengklonan gen sasaran ke dalam vektor RNAi, pK8gWIWG-PG-B4 (*PG_RNAi*) dijalankan, konstruk tersebut telah ditransformasi ke dalam tiga strain *A. tumefaciens* yang berbeza.

Ketiga-tiga strain ini diuji bagi mengenal pasti strain *A. tumefaciens* yang paling sesuai digunakan dalam transformasi *Micro-Tom*. Berdasarkan Rajah 1(a), strain C58 memberikan peratus penghasilan kalus paling tinggi (35%) dan perbezaan ini signifikan berbanding strain GV 3101 (2%) dan strain LBA 4404 (1%). Pemerhatian pada hari ke-20 menunjukkan eksplan yang diinfeksi dengan *A. tumefaciens* strain GV 3101 dan LBA 4404 mengalami nekrosis dan tidak menghasilkan kalus, manakala eksplan yang diinfeksi dengan strain C58 berjaya menghasilkan kalus yang padat dan hijau. Walaupun terdapat kajian lepas yang menyatakan strain GV 3101 mempunyai kadar kontaminasi yang rendah (Chetty et al. 2013) dan amat disyorkan penggunaannya dalam transformasi tumbuhan dikotiledon namun ia tidak dapat menghasilkan kalus pada uji kaji yang dijalankan dalam kajian ini. Keputusan yang diperolehi oleh strain GV3101 adalah sama dengan strain LBA 4404, namun begitu penggunaan strain LBA 4404 lebih disyorkan dalam proses transformasi tumbuhan monokotiledon. Bagi strain C58, banyak kajian telah dijalankan menggunakan strain tersebut terutamanya dalam tumbuhan tomato. Penggunaan strain ini dalam transformasi berperantaraan *A. tumefaciens* dilaporkan dapat meningkatkan kadar kebolehidupan sesuatu eksplan (Wood et al. 2001). Oleh kerana strain *A. tumefaciens* C58 mencatatkan penghasilan kalus yang paling tinggi, strain ini digunakan seterusnya dalam transformasi ke dalam kotiledon *Micro Tom* bagi menguji parameter yang lain.

PENGARUH TEMPOH MASA PENDERAMAN PADA MEDIUM KO-PENANAMAN TERHADAP PENGHASILAN KALUS

Langkah penderaman eksplan yang telah diinfeksi pada medium pra-kultur adalah langkah yang penting dalam proses transformasi berperantaraan *A. tumefaciens*. Tujuan utama langkah penderaman ini adalah untuk membantu pemindahan gen asing daripada *A. tumefaciens* ke dalam tumbuhan dengan cekap. Kehadiran sebatian fenolik iaitu asetosringon dilaporkan berjaya membantu pengaruhan gen-gen *vir* dan pemindahan T-DNA jika eksplan yang terluka diberi masa eraman yang optimum pada medium ko-penanaman (Godwin et al. 1991).

Berdasarkan Rajah 1(b), peratus penghasilan kalus pada medium yang dieramkan selama 48 jam adalah lebih tinggi (61%) berbanding apabila dieramkan selama 24 jam sahaja (51%). Perbezaan antara tempoh eraman 24 jam dan 48 jam juga adalah signifikan dengan nilai $p \leq 0.05$ berdasarkan analisis statistik (Rajah 1b). Tempoh masa ko-penanaman selama 48 jam meningkatkan peluang pemindahan transgen daripada *A. tumefaciens* ke dalam eksplan (Tan et al. 2017). Kajian lepas oleh Sun et al.



Kolum dan bar mewakili purata peratusan daripada lima replikat dan setiap replikat mengandungi 15 kotiledon. Abjad yang berbeza menunjukkan perbezaan yang signifikan iaitu nilai $p \leq 0.05$ berdasarkan ujian *Duncan Multiple Range* (DMRT)

RAJAH 1. (a) Graf perbandingan peratus penghasilan kalus pada 3 strain *A. tumefaciens* yang digunakan, (b) Graf perbandingan peratus penghasilan kalus pada tempoh eraman yang berbeza di atas medium ko-penanaman dan (c) Graf peratus kontaminasi *A. tumefaciens* terhadap kombinasi 250 mg/L sifotaksim dengan kepekatan antibiotik karbenisilin yang berbeza

(2006) turut melaporkan tempoh pengeraman yang terlalu lama akan menyebabkan peningkatan kadar kontaminasi *A. tumefaciens*, nekrosis pada eksplan serta menurunkan peratus kecekapan transformasi.

KESAN KEPEKATAN ANTIBIOTIK KARBENISILIN TERHADAP KONTAMINASI *A. TUMEFACIENS* PADA EKSPLAN

Setiap antibiotik yang digunakan dalam medium regenerasi mempunyai kesan fitotoksik yang berbeza terhadap penghasilan tumbuhan transgenik berdasarkan eksplan yang digunakan. Kesan antibiotik juga bergantung kepada jenis tumbuhan, keadaan tumbesaran dan jenis eksplan yang digunakan (Haddadi et al. 2015). Antibiotik turut digunakan bagi merencat pertumbuhan *A. tumefaciens* dalam proses penyaringan transgenik putatif.

Antibiotik sifotaksim merupakan antara antibiotik yang sering digunakan bagi merencat pertumbuhan *A. tumefaciens* selepas proses pengeraman ko-penanaman. Sifotaksim merupakan antibiotik semi sintetik, mempunyai spektrum yang luas dan juga merupakan salah satu antibiotik β -lactam yang berperanan menghalang sintesis dinding sel ketika proses pembiakan bakteria dan mengakibatkan lisis sel (Haddadi et al. 2015). Banyak kajian lepas mencadangkan kepekatan optimum sifotaksim dalam pelbagai tumbuhan lain seperti padi (Grewal et al. 2006) dan gandum (Rao et al. 1995). Antara julat kepekatan yang dicadangkan adalah antara 200 hingga 450 mg/L (Haddadi et al. 2015).

Dalam kajian ini, sebanyak 250 mg/L antibiotik sifotaksim telah digunakan pada medium aruhan kalus.

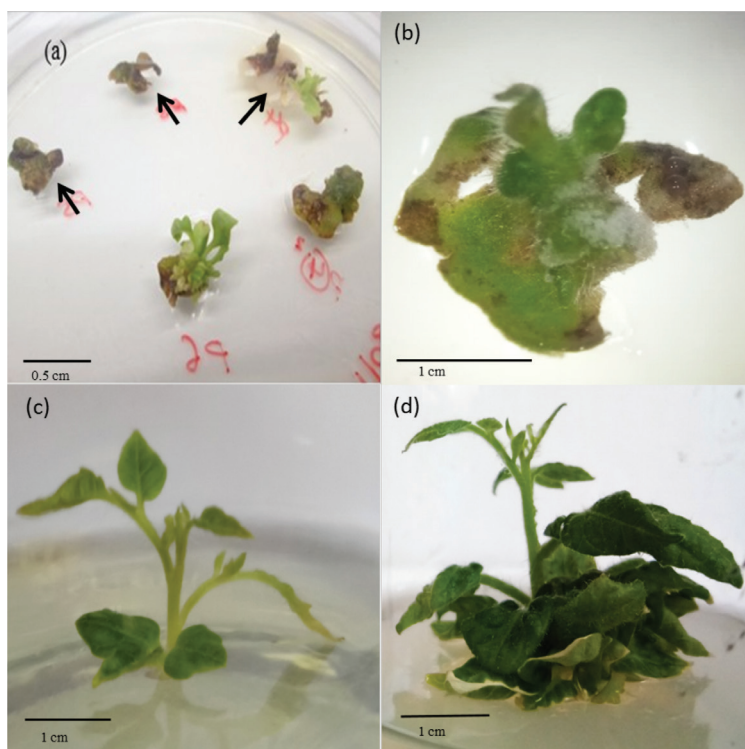
Namun begitu, kontaminasi *A. tumefaciens* masih berlaku seawal hari ketiga eksplan dikultur pada medium aruhan kalus (Rajah 2(a)). Kepekatan antibiotik sifotaksim yang rendah menyebabkan kontaminasi berlaku. Oleh itu, penggunaan antibiotik karbenisilin telah dipertimbangkan bagi merencat pertumbuhan *A. tumefaciens* selepas proses pengeraman pada medium ko-penanaman. Keputusan kajian terdahulu menunjukkan bahawa kombinasi antibiotik karbenisilin dan sifotaksim memberi kesan fitotoksik yang minimum pada kebanyakan tisu tumbuhan serta memberikan hasil yang lebih cekap berbanding penggunaan antibiotik sifotaksim sahaja (Qin et al. 2011). Oleh yang demikian, analisis seterusnya melihat kombinasi 250 mg/L sifotaksim dengan kepekatan karbenisilin yang berbeza terhadap kontaminasi *A. tumefaciens*. Berdasarkan Rajah 1(c), pada kepekatan 0 mg/L karbenisilin, peratusan kontaminasi *A. tumefaciens* adalah paling tinggi (71%), manakala tiada perbezaan yang ketara dalam peratusan kontaminasi *Agrobacterium* dapat dicerap apabila kepekatan karbenisilin ditingkatkan kepada 100 mg/L (63%). Pada kepekatan 200 mg/L, peratus kontaminasi *A. tumefaciens* adalah 45% dan mula menunjukkan sedikit penurunan pada kepekatan 300 mg/L (28%). Pada kepekatan 400 mg/L, peratus kontaminasi *A. tumefaciens* hampir dapat direncat (12%) dan pada kepekatan 500 mg/L menunjukkan peratus kontaminasi *A. tumefaciens* yang paling rendah (5.2%).

Walau bagaimanapun, berdasarkan analisis statistik, kesemua perbezaan peratusan adalah signifikan pada setiap kepekatan antibiotik yang digunakan ($p \leq 0.05$).

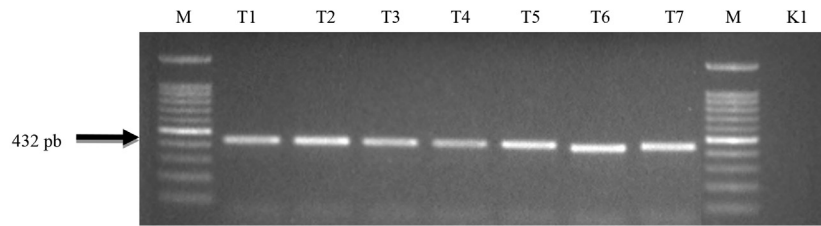
Karbenisilin merupakan antibiotik semi sintetik yang mempunyai analog semula jadi seperti benzil-penisilin (Costa et al. 2000) iaitu satu struktur yang mempunyai persamaan dengan hormon auksin. Oleh kerana strukturnya yang menyerupai auksin, ia juga dapat membantu dalam pembentukan kalus (Holford & Newbury 1992). Kajian terdahulu menunjukkan nilai kepekatan karbenisilin yang optimum adalah antara 250 ke 450 mg/L (Haddadi et al. 2015). Bagaimanapun, dalam kajian ini, gabungan antibiotik sifotaksim 250 mg/L dan karbenisilin 500 mg/L telah berjaya menghalang kontaminasi *A. tumefaciens* sekaligus meningkatkan penghasilan kalus (Rajah 2(b)). Seterusnya penghasilan pucuk pada medium regenerasi juga berjaya diperoleh selepas proses transformasi (Rajah 2(c) dan 2(d)).

PENYARINGAN POKOK TRANSGENIK *PRT6*

Penyaringan pokok transgenik positif telah dijalankan dengan menggunakan kaedah PCR. Sebanyak tujuh pucuk yang terhasil daripada proses transformasi telah disaring dengan menggunakan pasangan pencetus transgen. Amplifikasi PCR menunjukkan kesemua pucuk transgenik yang ditransform menggunakan *A. tumefaciens* mempunyai konstruk menunjukkan jalur bersaiz 432



RAJAH 2. (a) Penghasilan kalus pada medium regenerasi yang mengandungi antibiotik 250 mg/L sifotaksim. Tiga eksplan menunjukkan kontaminasi *A. tumefaciens* dan mengalami nekrosis (ditunjukkan dengan anak panah hitam) dan menyebabkan penghasilan kalus yang rendah, (b) Penghasilan kalus pada medium aruhan kalus yang mengandungi antibiotik 250 mg/L sifotaksim dan 500 mg/L karbenisilin dan (c) dan (d) penghasilan pucuk pada medium regenerasi pucuk



K1: bukan transforman; M; penanda tetangga 100 pb

RAJAH 3. Keputusan analisis PCR menunjukkan jalur bersaiz 432 pb hadir pada setiap sampel transgenik (T1-T7)

pb, manakala pucuk yang ditransform menggunakan *A. tumefaciens* tanpa konstruk tidak menunjukkan sebarang jalur (Rajah 3).

KESIMPULAN

Transformasi gen *PRT6* berperantarakan *A. tumefaciens* ke dalam kotiledon *Micro Tom* berjaya dilakukan dengan pengubahsuaian beberapa parameter. Dalam kajian ini, peratus penghasilan kalus adalah lebih tinggi apabila tempoh pengeraman pada medium ko-penanaman adalah selama 48 jam. Ini diikuti dengan kombinasi antibiotik karbenisilin (500 mg/L) dan sifotaksim (250 mg/L) yang optimum serta mampu merencat pertumbuhan *A. tumefaciens* dengan lebih cekap. Selain itu, penggunaan strain *A. tumefaciens* C58 dilihat lebih sesuai bagi memastikan kejayaan penjanaan tumbuhan transgenik *Micro Tom*. Kajian yang lebih mendalam boleh dijalankan pada transforman positif ini bagi memahami peranan tapak jalan *N-end rule* dalam proses pemasakan buah terutamanya perkaitan tapak jalan ini dengan tapak jalan pengisyaratan hormon etilina.

PENGHARGAAN

Penyelidikan ini telah dibiayai oleh Kementerian Pendidikan Tinggi Malaysia melalui Skim Geran Penyelidikan Asas (FRGS/2/2014/SG05/UKM/02/5). Pelajar sarjana dibiayai oleh skim MyBrain oleh Kementerian Pendidikan Tinggi Malaysia.

RUJUKAN

- Carvalho, R.F., Marcelo, L.C., Lilian, E.P., Simone, L.C., Agustin, Z., Joni, E.L., Vagner, A.B., & Lázaro, E.P.P. 2011. Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: Micro-Tom as an effective toolkit for plant development research. *Plant Methods* 7(1): 1-14.
- Chetty, V.J., Ceballos, N., Garcia, D., Narváez-Vásquez, J., Lopez, W. & Orozco-Cárdenas, M.L. 2013. Evaluation of four *A. tumefaciens* strains for the genetic transformation of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivar Micro-Tom. *Plant Cell Reports* 32(2): 239-247.
- Costa, M.G.C., Nogueira, F.T.S., Figueira, M.L., Otoni, W.C., Brommonschenkel, S.H. & Cecon, P.R. 2000. Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Cultivars. *Plant Cell Reports* 19(3): 327-332.
- Gibbs, D.J., Mark, B., Hannah, M.T. & Michael, J.H. 2016. From start to finish: Amino-terminal protein modifications as degradation signals in plants. *New Phytologist* 211(4): 1188-1194.
- Gibbs, D.J., Jorge, V.C., Sophie, B., Geeta, P., Guillermina, M.M. & Michael, J.H. 2015. Group VII ethylene response factors coordinate oxygen and nitric oxide signal transduction and stress responses in plants. *Plant Physiology* 169(1): 23-31.
- Gibbs, D.J., Md Isa, N., Movahedi, M., Lozano-Juste, J., Mendiondo, G.M., Berckhan, S., Marín-de, L.R.N., Vicente, C.J., Sousa, C.C., Pearce, S.P., Bassel, G.W., Hamali, B., Talloji, P., Tomé, D.F., Coego, A., Beynon, J., Alabadí, D., Bachmair, A., León, J., Gray, J.E., Theodoulou, F.L. & Holdsworth, M.J. 2014. Nitric oxide sensing in plants is mediated by proteolytic control of group VII erf transcription factors. *Molecular Cell* 53(3): 369-379.
- Gibbs, D.J., Seung, C.L., Nurulhikma, M.I., Silvia, G., Takeshi, F., George, W.B., Cristina, S.C., Corbineau, F., Theodoulou, F.L., Bailey-Serres, J. & Holdsworth, M.J. 2011. Homeostatic response to hypoxia is regulated by the n-end rule pathway in plants. *Nature* 479(7373): 415-418.
- Godwin, I., Gordon, T., Brian, F. & Newbury, H.J. 1991. The effects of acetosyringone and pH on agrobacterium-mediated transformation vary according to plant species. *Plant Cell Reports* 9(12): 671-675.
- Graciet, E. & Frank, W. 2010. The plant n-end rule pathway: Structure and functions. *Trends in Plant Science* 15(8): 447-453.
- Grewal, D., Raman, G. & Satbir, S.G. 2006. Influence of antibiotic cefotaxime on somatic embryogenesis and plant regeneration in Indica rice. *Biotechnology Journal* 1(10): 1158-1162.
- Haddadi, F., Maheran, A.A., Siti, N.A.A., Soon, G.T. & Hossein, K. 2015. An efficient agrobacterium-mediated transformation of strawberry cv. camarosa by a dual plasmid system. *Molecules* 20(3): 3647-3666.
- Holford, P. & Newbury, H.J. 1992. The effects of antibiotics and their breakdown products on the *in vitro* growth of *Antirrhinum majus*. *Plant Cell Reports* 11(2): 93-96.
- Martí, E., Carmina, G., Gerard, J.B., Mark, S.D. & José, L.G. 2006. Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. *Journal of Experimental Botany* 57(9): 2037-47.
- Mendiondo, G.M., Gibbs, D.J., Szurman-Zubrzycka, M., Korn, A., Marquez, J., Szarejko, I., Maluszynski, M., King, J., Axcell, B., Smart, K., Corbineau, F. & Holdsworth, M.J. 2016. Enhanced waterlogging tolerance in barley by

- manipulation of expression of the n-end rule pathway E3 ligase PROTEOLYSIS6. *Plant Biotechnology Journal* 14(1): 40-50.
- Nakano, T., Suzuki, K., Fujimura, T. & Shinshi, H. 2006. Genome-wide analysis of the ERF gene family. *Plant Physiology* 140(February): 411-432.
- Qin, Y.H., Jaime, A., Teixeira, S.J.H.B., Zhang, S.L. & Hu, G.B. 2011. Response of *in vitro* strawberry to antibiotics. *Plant Growth Regulation* 65(1): 183-193.
- Rao, A.M., Padma, S.K. & Kavi, K.P.B. 1995. Enhanced plant regeneration in grain and sweet sorghum by asparagine, proline and cefotaxime. *Plant Cell Reports* 15(1-2): 72-75.
- Saito, T., Ariizumi, T., Okabe, Y., Asamizu, E., Hiwasa-Tanase, K., Fukuda, N., Mizoguchi, T., Yamazaki, Y., Aoki, K. & Ezura, H. 2011. TOMATOMA: A Novel tomato mutant database distributing Micro-Tom mutant collections. *Plant and Cell Physiology* 52(2): 283-296.
- Sun, H.J., Sayaka, U., Shin, W. & Hiroshi, E. 2006. A highly efficient transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics. *Plant and Cell Physiology* 47(3): 426-431.
- Tan, L.W., Zuraida, A.R., Hoe, H.G., Duk, J.H., Ismanizan, I. & Zamri, Z. 2017. Production of transgenic rice (Indica Cv. MR219) overexpressing ABP57 gene through agrobacterium-mediated transformation. *Sains Malaysiana* 46(5): 703-711.
- Varland, S., Camilla, O. & Thomas, A. 2015. N-terminal modifications of cellular proteins: The enzymes involved, their substrate specificities and biological effects. *Proteomics* 15(14): 2385-2401.
- Varshavsky, A. 2011. The N-End rule pathway and regulation by proteolysis. *Protein Science* 20(8): 1298-1345.
- Wood, D.W., Setubal, J.C., Kaul, R., Monks, D.E., Kitajima, J.P., Okura, V.K., Zhou, Y., Chen, L., Wood, G.E., Almeida, N.F. Jr., Woo, L., Chen, Y., Paulsen, I.T., Eisen, J.A., Karp, P.D., Bovee, D. Sr., Chapman, P., Clendenning, J., Deatherage, G., Gillet, W., Grant, C., Kutayavin, T., Levy, R., Li, M.J., McClelland, E., Palmieri, A., Raymond, C., Rouse, G., Saenphimmachak, C., Wu, Z., Romero, P., Gordon, D., Zhang, S., Yoo, H., Tao, Y., Biddle, P., Jung, M., Krespan, W., Perry, M., Gordon-Kamm, B., Liao, L., Kim, S., Hendrick, C., Zhao, Z.Y., Dolan, M., Chumley, F., Tingey, S.V., Tomb, J.F., Gordon, M.P., Olson, M.V. & Nester, E.W. 2001. The genome of the natural genetic engineer *A. tumefaciens* C58. *Science* 294(5550): 2317-2323.
- Intan Elya Suka, Nur Farhana Roslan, Zamri Zainal & Nurulhikma Md Isa*
Pusat Pengajian Biosains dan Bioteknologi
Fakulti Sains dan Teknologi
Universiti Kebangsaan Malaysia
43600 UKM Bangi, Selangor Darul Ehsan
Malaysia
- Bee Lynn Chew
Pusat Pengajian Sains Kajihayat
Universiti Sains Malaysia, Minden
11800 Georgetown, Penang
Malaysia
- Hoe Han Goh & Zamri Zainal
Institut Biologi Sistem
Universiti Kebangsaan Malaysia
43600 UKM Bangi, Selangor Darul Ehsan
Malaysia
- *Pengarang untuk surat-menyurat; email: hikma@ukm.edu.my
- Diserahkan: 15 September 2017
Diterima: 7 Mac 2018