

## Transformasi Gen Metalotionin (*eiMT1*) daripada *Eleusine indica* ke dalam Pokok Tembakau, *Nicotiana tabacum* Berperantaraan *Agrobacterium tumefaciens*

(Transformation of Metallothionein Gene (*eiMT1*) from *Eleusine indica* into Tobacco, *Nicotiana tabacum* by *Agrobacterium tumefaciens*)

NIK MARZUKI SIDIK\*, ROSLINA MAT YAZID, CHE RADZIAH CHE MOHD. ZAIN & ISMANIZAN ISMAIL

### ABSTRAK

Metalotionin (MT) merupakan protein pengikat logam berberat molekul rendah dan kaya dengan sistein yang hadir dalam pelbagai jenis organisma termasuklah bakteria, kulat, tumbuhan dan haiwan. MT tumbuhan dipercayai mengambil bahagian dalam metabolisme dan penyahtoksikan logam dengan cara pengkelatan ion-ion logam berat. Fungsinya yang unik ini telah mendorong minat untuk memencilkan gen MT daripada rumput sambau, *Eleusine indica*. DNA pelengkap (cDNA) *eiMT1* telah diklonkan ke dalam vektor binari pBII21 untuk ditransformasikan ke dalam pokok tembakau melalui perantaraan *Agrobacterium tumefaciens*. Penyaringan pokok tembakau transgenik dengan PCR dilakukan menggunakan 3 pasang pencetus yang direka khas iaitu pasangan CMTF dan CMTR, 35SF dan PMTR, dan pasangan pencetus khusus-gen MFS2 dan MRS2. Ketiga-tiga pasangan pencetus ini berjaya menghasilkan saiz serpihan DNA jangkaan iaitu masing-masing 270 pb, 1.1 kb dan 170 pb. Penjujukan terhadap serpihan bersaiz 170 pb dan analisis jujukan menunjukkan persamaan 100 % dengan *eiMT1*. Kajian pengekspresan gen melalui pendekatan transkripsi berbalik-PCR membuktikan bahawa transgen *eiMT1* telah berjaya diekspreskan dalam 11 daripada 19 pokok transgenik yang dikaji.

**Kata kunci:** *eiMT1*; *Eleusine indica*; metalotionin; transformasi; tembakau

### ABSTRACT

Metallothioneins (MTs) are low molecular weight, cysteine-rich metal-binding proteins found in a wide range of organisms including bacteria, fungi, plant and animal. Plant MTs are thought to play a role in metal metabolism and detoxification via chelating of the metal ions. This unique feature results in the interest to isolate MT gene from goosegrass, *Eleusine indica*. *eiMT1* cDNA was cloned into pBII21 binary vector for the transformation into tobacco by *Agrobacterium tumefaciens*. Screening of transgenic plants was conducted using three specially designed primers, CMTF and CMTR and 35SF and PMTR, and a pair of gene specific primers, MFS2 and MRS2. The primer pairs used successfully produced expected DNA fragments of 270 bp, 1.1 kb and 170 bp, respectively. Sequencing and sequence analysis of the 170 bp fragment was 100 % identical to the *eiMT1*. Gene expression study via reverse transcription-polymerase chain reaction approach showed that the transgene was successfully expressed in 11 of the 19 transgenic plants.

**Keywords:** *eiMT1*; *Eleusine indica*; metallothionein; transformation; tobacco

### PENGENALAN

*Eleusine indica* (L) Gaertn. atau lebih dikenali sebagai rumput sambau adalah sejenis rumput yang tumbuh melata di negara-negara tropika dan subtropika. Spesies ini tergolong dalam keluarga Graminae dan boleh ditemui di kawasan yang mendapat sinaran matahari yang terik serta kawasan sepanjang jalan-jalan raya di mana rumput-rumput lain jarang tumbuh. Apa yang menarik tentang spesies ini adalah sifat kerintangannya terhadap logam berat dan ia berupaya menyerap dan mengumpulkan logam berat pada jumlah yang tinggi (Wong & Lau 1985).

Kerintangan spesies tumbuhan terhadap logam berat sering dikaitkan dengan kehadiran protein tertentu dalam sel. Salah satu protein pengikat logam berat yang paling banyak dikaji adalah metalotionin (MT). Metalotionin merupakan protein yang mempunyai berat molekul rendah

dan kaya dengan sistein (Vasák 2005). Metalotionin hadir dalam pelbagai jenis organisma termasuklah spesies eukariot haiwan dan tumbuhan. Metalotionin dipercayai mengambil bahagian dalam metabolisme dan penyahtoksikan logam dengan cara pengkelatan ion-ion logam berat, seterusnya menghalang ion-ion logam daripada berinteraksi dengan komponen sel yang lain (Cobbett & Goldsbrough 2002). Kehadiran molekul sistein memainkan peranan utama dalam kefungsiannya MT. Molekul sistein mempunyai kumpulan sulfhidril yang mampu untuk mengikat kepada logam berat seperti zink, kuprum dan kadmium (Hyun et al. 2006). Kajian-kajian lepas menunjukkan gen MT diaruhkan dengan kehadiran logam-logam seperti kadmium dalam *Chironomus riparius* (Fabrik et al. 2008), zink dalam *Thlaspi caerulescens* (Hassinen et al. 2007) dan aluminium dalam *Saccharum*

spp. (Watt 2003). Walau bagaimanapun, pengekspresan gen MT juga boleh diaruh oleh keadaan seperti kecederaan dan jangkitan virus (Choi et al. 1996; Ma et al. 2003).

Pendekatan bioteknologi telah digunakan bagi penghasilan tumbuhan yang rintang terhadap kontaminasi logam-logam berat. Gen-gen yang mengekodkan protein seperti MT telah ditransformasikan ke dalam tumbuhan sasaran untuk menjana tumbuhan transgenik yang bersifat hiper-pengumpul logam (Eapen et al. 2007; Macek et al. 2007). Seterusnya, tumbuhan transgenik ini digunakan untuk merawat tanah yang telah tercemar dengan logam-logam berat melalui teknik yang dikenali sebagai fitoremediasi. Pendekatan fitoremediasi telah menjadi pendekatan utama dalam merawat pencemar logam berat di persekitaran kerana kosnya yang rendah, teknik yang mesra alam, tidak melibatkan penggunaan sumber tenaga manusia yang meluas dan yang paling penting ialah logam-logam yang dirawat boleh dikitar semula (Eapen & D'Souza 2005; Pilon-Smits 2005).

Kami telah terdahulu melaporkan tentang pemencilan jujukan gen *eiMTI* daripada genom rumput *E. indica* (Nik Marzuki et al. 2006). Di dalam kajian ini, cDNA gen *eiMTI* telah dipencilkan (telah dihantar untuk penerbitan) dan digunakan untuk ditransformasikan ke dalam pokok tembakau. Penyaringan pokok tembakau transgenik yang telah dilakukan membuktikan proses transformasi telah berjaya dilakukan. *eiMTI* juga telah dibuktikan berjaya diekspreskan dalam pokok tembakau transgenik yang dihasilkan.

## BAHAN DAN KAEDAH

### PENGKLONAN cDNA *eiMTI* KE DALAM VEKTOR PENGEKSPRESAN

cDNA *eiMTI* diklonkan ke dalam plasmid pBI121 yang bersaiz 14.758 kb. Gen pelapor *gus* dikeluarkan daripada plasmid pBI121 melalui pencernaan dengan enzim penyekat *Bam*HI dan *Sac*I. cDNA dicernakan dengan menggunakan enzim penyekat yang sama dan diklonkan ke dalam plasmid pBI121 untuk menghasilkan plasmid rekombinan pBI121-MT. Transformasi plasmid pBI121-MT ke dalam tisu daun tembakau dilakukan melalui perantaraan *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404.

### TRANSFORMASI DAUN TEMBAKAU DAN REGENERASI POKOK

Daun pokok tembakau jenis liar disterilkan permukaannya dengan kloroks (20%) selama 20 minit dengan goncangan perlahan. Selepas itu, daun dibilas dengan air suling steril sebanyak lima kali. Daun tembakau dikeringkan di atas kertas turas dan dipotong kepada bentuk cakera berukuran 0.5-1.0 cm<sup>2</sup>. Kemudian, eksplan daun diletakkan di atas media Murashige dan Skoog (MS) yang mengandungi 5 mg/L 6-benzilaminopurina (BAP) dan dikultur selama dua hari dalam bilik kultur.

Sebanyak 5 mL kultur *A. tumefaciens* yang dikultur 48 jam pada 28°C diinokulat ke dalam 50 mL medium Luria Bertani Glukosa (LBG) yang mengandungi 50 µg/mL kanamisin dan 100 µg/mL streptomisin. Campuran ini digoncang pada 28°C dengan kelajuan 220 rpm sehingga mencapai ketumpatan optik 0.4-0.6 pada jarak gelombang 600 nm. Selepas itu, eksplan yang telah dipotong kepada bentuk cakera direndamkan dalam larutan tadi dan digoncang perlahan-lahan selama 20 minit. Kemudian, eksplan dikeringkan di atas kertas turas steril dan diletakkan kembali ke medium asal. Eksplan diko-kultivasi dalam bilik gelap selama dua hari.

Selepas dua hari, eksplan dipindahkan ke media MS yang mengandungi BAP dan 300 µg/mL cefotaksim dan dikultur selama dua minggu. Pada peringkat ini, cefotaksim digunakan untuk menyingkirkan *A. tumefaciens*. Selepas dua minggu, eksplan dipindahkan ke medium pemilihan iaitu MS yang mengandungi 75 µg/mL kanamisin. Eksplan dibiarkan tumbuh dan disub-kultur setiap tiga minggu untuk mengelakkan pelumusan yang akan merosakkan anak pokok dalam medium pengkulturan. Anak pokok yang telah meregenerasi daripada cakera daun disubkulturkan kepada individu dan dipindahkan ke medium pengakaran yang mengandungi hormon asid asetik naftalena (NAA) pada kepekatan 0.1 mg/L. Anak pokok dipindahkan ke tanah selepas ianya telah hidup dengan stabil di atas medium pengakaran. Proses pengikliman dilakukan selama tiga hingga empat hari dengan menutup anak pokok dengan plastik berlubang untuk membolehkan anak pokok beradaptasi dengan persekitaran baru.

### PENYARINGAN POKOK TRANSGENIK

Penyaringan pokok transgenik dilakukan dengan menggunakan pendekatan PCR. DNA genom pokok tembakau diekstrak dengan menggunakan kaedah Doyle dan Doyle (1987). Sebanyak 1 µg DNA tembakau yang berkualiti tinggi digunakan untuk setiap tindakbalas PCR. Bagi amplifikasi gen *eiMTI*, pasangan pencetus CMTF (5'-TTCTTGGATCCTTGCTCTAGAACGCTCGACATGTCTTGC-3') dan CMTR (5'-ATTTAGAGCTCCGGTGGCAGTCGGA-3') digunakan. Pasangan pencetus ini akan menyepuh pada penghubung yang telah diligasikan pada kedua-dua hujung 5' dan 3' gen *eiMTI* dan akan menggandakan keseluruhan gen *eiMTI* termasuklah kedua-dua penghubung.

Campuran tindak balas untuk PCR sebanyak 25 µL terdiri daripada 1 µg sampel DNA genom, 2 µL penimbal PCR (10×) (Promega, USA), 0.5 µL campuran dNTP (10 mM), 1 µL MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0.2 µL *Taq* DNA polimerase (5 U), 1 µL pencetus CMTF dan CMTR (10 pM). Bagi tindak balas kawalan, templat DNA digantikan dengan plasmid pBI121-MT (kawalan positif) dan DNA genom tembakau jenis liar (kawalan negatif). Kitaran PCR dimulai dengan langkah denaturasi permulaan pada 95°C selama 3 minit, diikuti dengan 30 kitaran pada 95°C selama 1 minit; 45°C selama 45 saat; 72°C selama 45 saat. Seterusnya satu kitaran pemanjangan akhir dilakukan pada 72°C selama 10 minit.

Penyaringan pokok transgenik juga dilakukan dengan menggunakan pasangan pencetus ke hadapan 35SF (5'-CCTGCAGTCCCCAGATTAGC-3') dan pencetus ke belakang PMTR (5'-GGGGTTGCACTGCAGCTGGA-3'). Pasangan pencetus ini akan mengamplifikasi keseluruhan promoter CAMV 35S yang digunakan bagi mengawal pengekspresan *eiMT1* dan sebahagian daripada *eiMT1*. Kitaran PCR dimulai dengan langkah denaturasi permulaan pada 95°C selama 3 minit diikuti dengan 30 kitaran pada 95°C selama 1 minit; 66.6°C selama 1 minit; 72°C selama 45 saat. Seterusnya satu kitaran pemanjangan akhir pada 72°C selama 10 minit dilakukan. Sementara penyaringan menggunakan pencetus-kehadapan gen, MTF2 (5'-GCTGCACTGTGGCTCG-3') dan MTR2 (5'-CTGGAGCCGAGCC-3') dimulai dengan langkah denaturasi permulaan pada 95°C selama 3 minit diikuti dengan 30 kitaran pada 95°C selama 1 minit; 56.7°C selama 1 minit; 72°C selama 45 saat. Seterusnya satu kitaran pemanjangan akhir pada 72°C selama 10 minit dilakukan.

Serpihan yang terhasil daripada tindak balas PCR diklonkan ke dalam vektor pengklonan pDrive menggunakan PCR Cloning Kit (Qiagen) dan dihantar kepada Syarikat First BASE Laboratory Sdn. Bhd, Malaysia untuk diujukkan menggunakan pasangan pencetus universal M13F dan M13R. Analisis jujukan dilakukan menggunakan BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) dan pepadanan jujukan dilakukan menggunakan ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

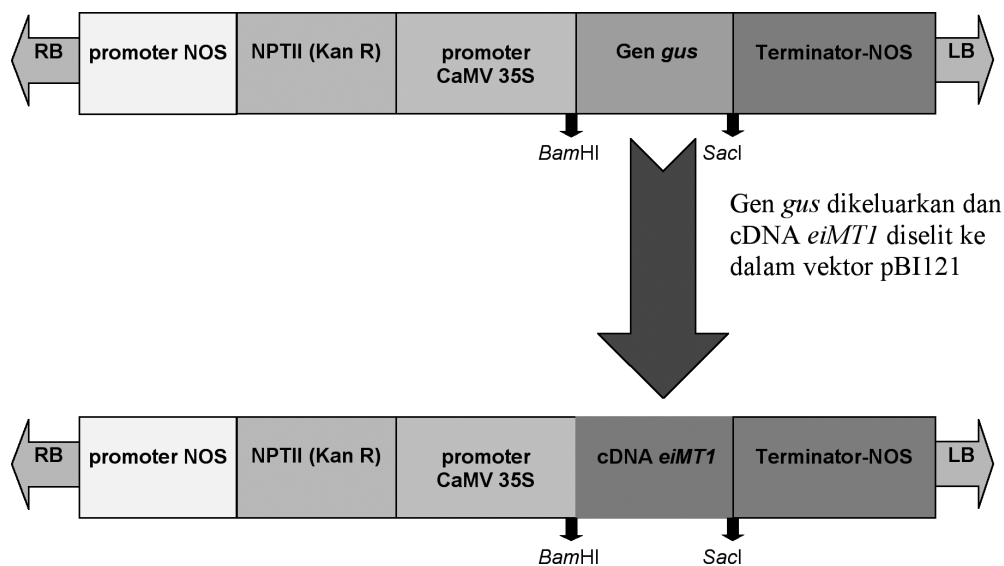
#### HASIL DAN PERBINCANGAN

cDNA *eiMT1* telah berjaya diklonkan ke dalam vektor pengekspresan pBI121 dengan menghasilkan plasmid rekombinan pBI121-MT. Penjujukan dan analisis terhadap jujukan cDNA *eiMT1* dalam pBI121-MT telah menunjukkan penyelitan dalam orientasi yang betul yang membenarkan pengekspresan *eiMT1* berlaku (hasil tidak ditunjukkan).

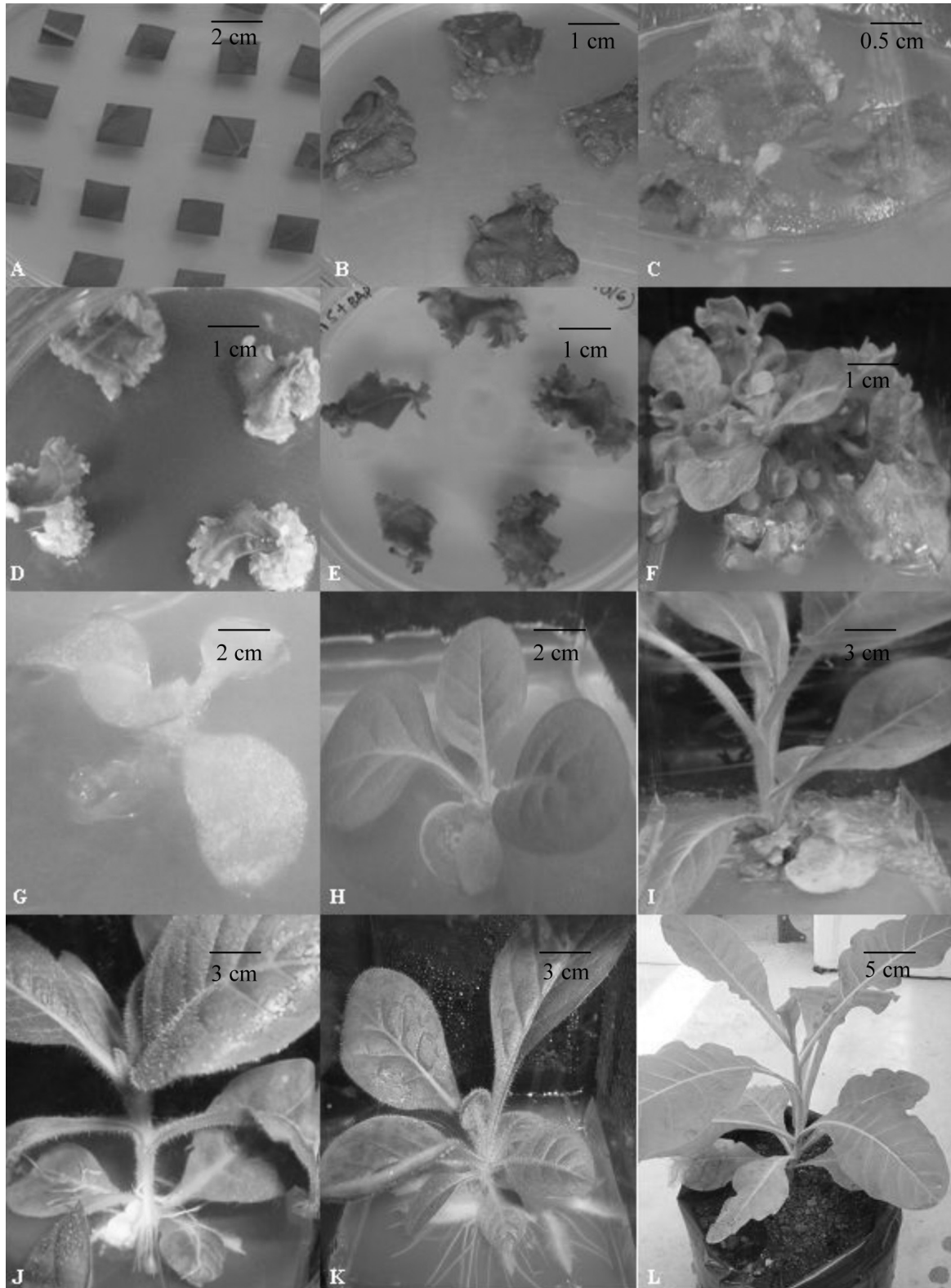
Aruhan pengekspresan gen *eiMT1* dalam pasmid pBI121-MT ini adalah dikawal oleh promoter CAMV 35S. Rajah 1 menunjukkan lakaran peta plasmid pBI121 di mana kedudukan beberapa gen penanda, promoter CAMV 35S, gen *gus* dan NOS-terminator telah ditetapkan. Dalam kajian ini gen *gus* telah dikeluarkan dan digantikan dengan cDNA *eiMT1*. Promoter CAMV 35S adalah bersifat konstitutif iaitu ia akan mengaruh pengekspresan gen secara berterusan. Banyak kajian telah menggunakan promoter yang sama dalam kajian transformasi gen ke dalam sistem tumbuhan dan kejayaannya telah dibuktikan (Macek et al. 2002; McCafferty et al. 2008)

Plasmid rekombinan pBI121-MT ini kemudian ditransformasikan ke dalam genom pokok tembakau melalui kaedah perantaraan *A. tumefaciens*. Daun tembakau yang telah ditransformasi digunakan bagi penjanaan pokok tembakau secara terus. Rajah 2 menunjukkan perkembangan pokok tembakau transgenik pada peringkat-peringkat yang berbeza. Kaedah transformasi tisu tumbuhan berperantaraan *A. tumefaciens* telah digunakan secara meluas untuk memperkenalkan gen yang diminati sama ada ke dalam tumbuhan dikotiledon ataupun tumbuhan monokotiledon. Kemampuan *A. tumefaciens* dalam memindahkan gen asing ke dalam genom tumbuhan yang diinfeksi telah dibuktikan dalam pokok *Arabidopsis* (Hsieh et al. 2009), padi (Sridevi et al. 2008) dan tomato (Oller et al. 2005).

Analisis molekul dengan menggunakan teknik PCR dilakukan untuk menentukan kehadiran gen *eiMT1* dalam pokok tembakau transgenik. Daripada lebih 100 pokok tembakau transgenik putatif yang disaring menggunakan pasangan pencetus CMTF dan CMTR, hanya 19 pokok yang berjaya menghasilkan serpihan bersaiz 270 pb seperti yang dijangkakan (Rajah 3). Pencetus CMTF dan CMTR dibina berasaskan kepada jujukan penghubung yang ditambah di hujung 5' dan 3' gen *eiMT1* yang mengandungi tapak enzim penyekatan untuk tujuan pengklonan. Pencetus ini akan mengganda serpihan jangkakan bersaiz 279 pb.



RAJAH 1. Peta pBI121-MT menunjukkan strategi digunakan dalam pengklonan

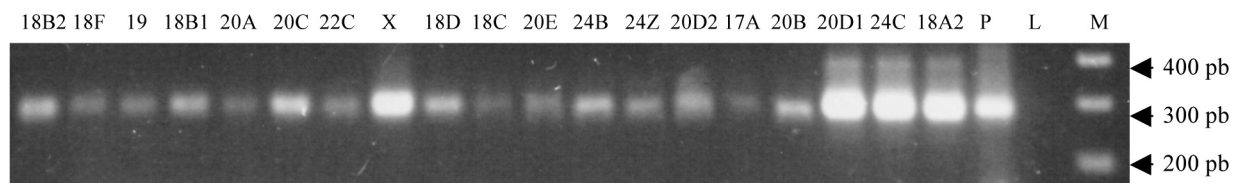


RAJAH 2. Peringkat penghasilan pokok tembakau transgenik. A) Cakera daun segar yang dipotong kepada saiz 5-9 mm<sup>2</sup> untuk digunakan dalam ko-kultivasi. B) Cakera daun tembakau yang diletakkan pada medium yang mengandungi antibiotik cefotaksim, untuk penyingkiran *A. tumefaciens*. C) Pembentukan pucuk. D) Pembentukan kalus. E) Pemanjangan pucuk pada medium yang mengandungi hormon BAP, di mana hanya pucuk diaruhkan. F) Perkembangan dan pemanjangan pucuk berganda. G) Anak pokok tembakau yang telah dipotong kepada individu tunggal. H) Perkembangan anak pokok tembakau transgenik. I) Anak pokok tembakau yang berjaya bermandiri pada peringkat kultur tisu. J) Pembentukan akar dalam medium pengakaran. K) Perkembangan dan pemanjangan akar. L) Pemindahan pokok tembakau transgenik ke tanah selepas proses pengikliman untuk kemandirian pada persekitaran baru

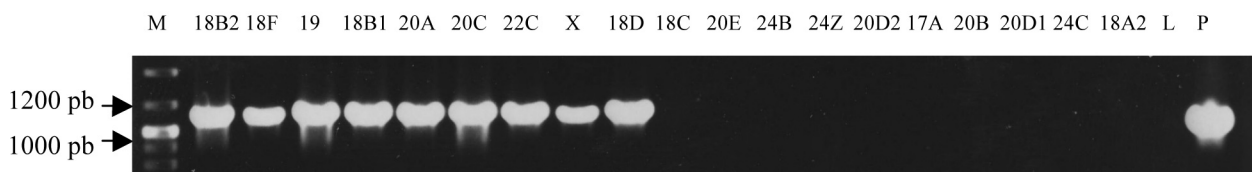


Penyaringan peringkat kedua terhadap 19 pokok transgenik putatif dilakukan menggunakan pasangan pencetus 35SF dan PMTR dan hanya 9 pokok (Pokok 18B2, 18F, 19, 18B1, 20A, 20C, 22C, X dan 18D) sahaja berjaya menghasilkan serpihan jangkakan bersaiz 1.1 kb (Rajah 4). Pasangan pencetus 35SF dan PMTR akan menganda keseluruhan promoter (834 pb) dan 219 pb jujukan *eiMT1* menghasilkan satu serpihan DNA bersaiz 1089 pb termasuk jujukan penghubung di antara promoter dan *eiMT1* bersaiz 36 pb. Pokok-pokok lain yang memberikan keputusan negatif daripada penyaringan ini mencadangkan bahawa kesemuanya tidak mengandungi promoter CAMV 35S seterusnya mengakibatkan penyepuhan oleh pencetus 35SF tidak berlaku. Penyaringan seterusnya dilakukan terhadap 19 pokok positif menggunakan pasangan pencetus khusus gen iaitu MTFS2 dan MTRS2. Kesemua 19 pokok yang disaring menunjukkan kehadiran serpihan bersaiz kira-kira 170 pb yang dijangkakan (Rajah 5). Dalam kesemua proses penyaringan yang dilakukan, tiada kehadiran serpihan dicerap pada pokok tembakau jenis liar. Penjujukan telah dilakukan ke atas serpihan bersaiz 170 pb dan analisis jujukan menunjukkan jujukan yang diperolehi adalah 100% sama dengan jujukan *eiMT1* (Rajah 6).

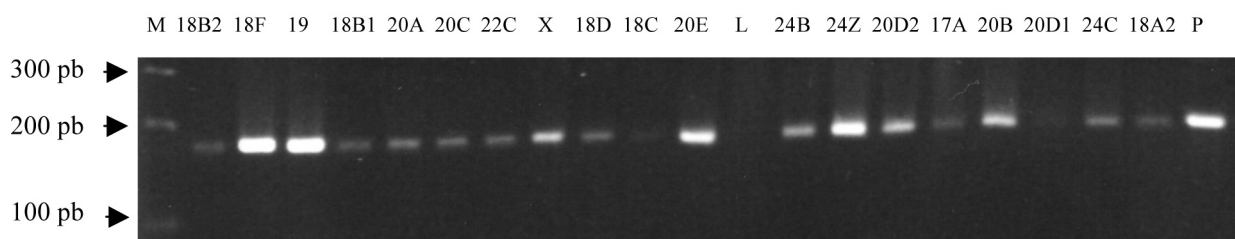
Hasil-hasil kajian ini membuktikan bahawa cDNA *eiMT1* telah berjaya dipindah dan diintegrasikan ke dalam genom pokok tembakau. Kejayaan memindahkan gen asing ke dalam pokok tembakau dengan sistem transformasi berperantaraan *A. tumefaciens* ini adalah selari dengan kajian-kajian yang dilaporkan sebelum ini. Pengekspresan *eiMT1* dalam pokok tembakau transgenik telah dikaji melalui pendekatan tindakbalas transkriptase berbalik-PCR menggunakan pencetus khusus gen MTFS2 dan MTRS2. Hasil kajian menunjukkan hanya 11 pokok tembakau transgenik (pokok 18B1, 18D, 18C, 20E, 24B, 24Z, 20D2, 17A, 20B, 20D1, 24C) berjaya mengungkapkan gen *eiMT1*. Daripada 11 pokok ini, pokok 18B1 dan 18D adalah pokok yang membawa promoter CAMV 35S sementara pokok 18C, 20E, 24B, 24Z, 20D2, 17A, 20B, 20D1, 24C adalah pokok yang tidak membawa promoter CAMV 35S. Kadar pengungkapan *eiMT1* dalam pokok tembakau transgenik juga berbeza-beza. Pokok 18B1, 24B, 20D2 dan 20D1 menunjukkan kadar pengungkapan gen yang jauh lebih rendah berbanding pokok 18D, 18C, 20E, 24Z, 17A, 20B dan 20D1 (Rajah 7). Dalam kaedah transformasi gen ke dalam tumbuhan penerima, penyelitan gen asing ke dalam genom perumah berlaku secara rawak. Pemerhatian yang menunjukkan pokok



RAJAH 3. Hasil elektroforesis gel agarosa produk PCR penyaringan pokok tembakau transgenik menggunakan pasangan pencetus CMTF dan CMTR. Label di atas rajah menunjukkan nombor pokok transgenik putatif yang disaring. P, plasmid pBI121-MT (kawalan positif); L, tembakau jenis liar; M, penanda DNA 100 pb (Vivantis)



RAJAH 4. Hasil elektroforesis gel agarosa produk PCR penyaringan pokok tembakau transgenik menggunakan pasangan pencetus 35SF dan PMTR. Label di atas rajah menunjukkan nombor pokok transgenik putatif yang disaring. M, penanda DNA 100 pb (Vivantis); L, tembakau jenis liar; P, plasmid pBI121-MT (kawalan positif).



RAJAH 5. Hasil elektroforesis gel agarosa produk PCR penyaringan pokok tembakau transgenik menggunakan pasangan pencetus MTFS2 dan MTRS2. Label di atas rajah menunjukkan nombor pokok transgenik putatif yang disaring. M, penanda DNA 100 pb (Vivantis); L, tembakau jenis liar; P, plasmid pBI121-MT (kawalan positif).

transgenik yang tidak membawa promoter CAMV 35S tetapi mengungkapkan gen *eiMT1* (Rajah 7) mencadangkan bahawa penyelitan gen *eiMT1* berlaku bersebelahan dengan promoter gen natif dalam genom tembakau. Penyelitan ini tidak merosakkan fungsi promoter tersebut seterusnya mengekalkan keupayaannya untuk mengaruh ungkapan gen. Kajian lanjut sedang dilakukan bagi mengenalpasti lokasi penyelitan gen *eiMT1* pada pokok 18C, 20E, 24B, 24Z, 20D2, 17A, 20B, 20D1, 24C.

Variasi pengekspresan transgen pada tumbuhan transgenik adalah keadaan biasa dalam sistem transformasi. Keadaan ini berlaku kesan daripada transformasi pada setiap transforman yang merupakan satu keadaan yang dipanggil kesan transformasi bebas (Day et al. 2000). Kesan transformasi bebas ini berlaku apabila transgen diintegrasikan ke dalam lokasi kromosom yang sama atau berlainan, dan juga ke dalam kawasan kromatin yang aktif ataupun tidak aktif (Day et al. 2000). Transgen yang diintegrasikan ke dalam genom tumbuhan secara bebas dan rawak ini mengakibatkan berlaku kepelbagaian pada pengekspresan transgen, seperti kesan posisi, bilangan salinan transgen, delesi DNA dan juga pengaturan semula DNA (Zhang 2008).

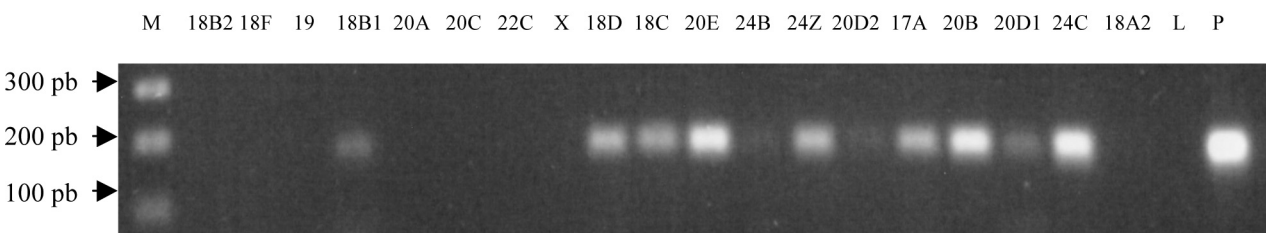
Kromatin adalah kawasan sasaran bagi T-DNA diintegrasikan ke dalam sel tumbuhan secara rawak (Alonso et al. 2003). Kawasan kromatin yang aktif melakukan transkripsi dikenali sebagai eukromatin. Manakala heterokromatin adalah kawasan kromatin yang tidak aktif dan terletak pada kawasan kromosom yang terlalu padat (Lam et al. 2005). Ketidakeupayaan pengekspresan gen pada kawasan heterokromatin dipercayai berkaitan dengan hipermetilasi bes sitosina dan hipoasetilasi histon pada

kawasan tersebut (Gelvin & Kim 2007). Merujuk pada Rajah 7, tidak semua transgen mengalami penyenyapan gen. Penyenyapan gen terjadi apabila berlaku metilasi pada transgen. Metilasi DNA berlaku pada bes sitosina yang menukarkannya kepada 5-metil-sitosina oleh enzim DNAmetiltransferase. Dalam eukariot, fenomena metilasi bes sitosina paling banyak berlaku dalam tumbuhan (Suzuki & Bird 2008). Metilasi DNA menghalang faktor transkripsi daripada melekat pada kawasan promoter yang sepatutnya. Ini menyebabkan sama ada pengekspresan transgen berkurang ataupun corak pengekspresan tidak sekata (Meyer 1995). Terdapat beberapa mekanisme dicadangkan yang boleh menyumbang kepada berlakunya metilasi pada transgen. Antaranya ialah apabila transgen diintegrasikan ke dalam bahagian kromosom yang hipermetilasi, menyebabkan corak metilasi boleh merebak ke bahagian transgen dan seterusnya menyebabkan penyahaktifan transgen (Meyer 1995). Proses transkripsi yang tinggi serta proses penghasilan RNA yang terganggu kesan daripada kehadiran RNA yang banyak juga mengganggu pengekspresan transgen pada tahap yang sempurna. RNA tersebut mungkin berpasangan dengan DNA yang mengandungi transgen dan seterusnya menyebabkan berlakunya metilasi. Korelasi antara darjah metilasi DNAdengan pengekspresan gen telah dilihat dalam beberapa tumbuhan seperti jagung, *Arabidopsis thaliana* dan *Antirrhinum majus* (Gehring & Henikoff 2007).

Pada masa kini, pokok-pokok tembakau transgenik yang dihasilkan masih berada dalam rumah kaca dan belum menghasilkan biji benih. Untuk masa depan, kami mencadangkan agar kajian tentang kestabilan integrasi gen ke dalam genom tembakau dan perwarisan dilakukan

<i>eiMT1</i>	ATGTCTTGCAAGCTGCGGATCAAGCTGCAACTGTGGCTCGAGCTGCAAGTGC	60
24C	-----GCTGCAACTGTGGCTCGAGCTGCAAGTGC	38
<i>eiMT1</i>	TACCCTGACCTTGAGGAGAAGAGCACCGGCGCTCAGGCCACCGTTGTCTCGGCGTTGCA	120
24C	TACCCTGACCTTGAGGAGAAGAGCACCGGCGCTCAGGCCACCGTTGTCTCGGCGTTGCA	98
<i>eiMT1</i>	CCCGAGCAGAAGCTCCAGTTCAAGGCGGCCACCGAGTCCGGCGAGACCGCCATGGCTGC	180
24C	CCCGAGCAGAAGCTCCAGTTCAAGGCGGCCACCGAGTCCGGCGAGACCGCCATGGCTGC	158
<i>eiMT1</i>	GGCTGCGGCTCCAGCTGCAAGTGAACCCCTGCAACTGCTAA	222
24C	GGCTGCGGCTCCAG-----	172

RAJAH 6. Penjajaran jujukan serpihan DNA hasil PCR terhadap genom pokok tembakau transgenik positif dengan jujukan *eiMT1*. 24C, serpihan DNA hasil daripada penyaringan.



RAJAH 7. Pengekspresan gen *eiMT1* dalam pokok tembakau transgenik menggunakan pendekatan RT-PCR. Label di atas rajah menunjukkan nombor pokok transgenik putatif yang disaring. M, penanda DNA 100 pb (Vivantis); L, tembakau jenis liar; P, plasmid pBI121-MT (kawalan positif)

terhadap sekurang-kurang hingga ke generasi F<sub>2</sub> apabila biji benih generasi F<sub>1</sub> dan F<sub>2</sub> diperolehi nanti. Kajian juga akan dilakukan bagi melihat kebolehan tumbuhan tembakau transgenik ini untuk hidup dalam keadaan kepekatan logam berat yang tinggi serta keupayaannya untuk bertindak sebagai agen fitoremediasi logam-logam berat.

#### PENGHARGAAN

Penghargaan kepada Universiti Kebangsaan Malaysia yang telah membiayai penyelidikan ini melalui Geran Universiti Penyelidikan UKM-GUP-BTK-07-15-196.

#### RUJUKAN

- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P. & Cheuk, R. 2003. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301: 653-657.
- Choi, D., Kim, H.M., Yun, H.K., Park, J.A., Kim, W.T. & Bok, S.H. 1996. Molecular cloning of a metallothionein-like gene from *Nicotiana glutinosa* L. and its induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol.* 112: 353-359.
- Cobbett, C. & Goldsbroug, P. 2002. Phytochelatin and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant Bio.* 53: 159-182.
- Day, C.D., Lee, E., Kobayashi, J., Holappa, L.D., Albert, H. & Ow, D.W. 2000. Transgene integration into the same chromosome location can produce alleles that express at a predictable level, or alleles that are differentially silenced. *Genes & Development* 14: 2869-2880.
- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11-15.
- Eapen, S. & D'Souza, S.F. 2005. Prospects of genetic engineering of plants for phytoremediation of toxic metals. *Biotechnol. Adv.* 23: 97-114.
- Eapen, S., Singh, S. & S.F. D'Souza, S.F. 2007. Advances in development of transgenic plants for remediation of xenobiotic pollutants. *Biotechnol. Adv.* 25: 442-451.
- Fabrik, I., Ruferova, Z., Hilscherova, K., Adam, V., Trnkova, L. & Kizek, R. 2008. A determination of metallothionein in larvae of freshwater midges (*Chironomus riparius*) using Brdicka reaction. *Sensors*. 8: 4081-4094.
- Gehring, M. & Henikoff, S. 2007. DNA methylation dynamics in plant genomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1769: 276-286.
- Gelvin, S.B. & Kim, S.I. 2007. Effect of chromatin upon *Agrobacterium* T-DNA integration and transgene expression. *Biochim. Biophys. Acta* 1769: 410-421.
- Hassinen, V.H., Tervahauta, A.I., Halimaa, P., Plessl, M., Peraniemi, S., Schat, H., Aarts, M.G., Servomaa, K. & Karenlampi, S. 2007. Isolation of Zn responsive genes from two accessions of the hyperaccumulator plant *Thaspi caerulescens*. *Planta* 225: 977-989.
- Hsieh, J.L., Chen, C.Y., Chiu, M.H., Chein, M.F., Chang, J.S., Endo, G. & Huang, C.C. 2009. Expressing a bacterial mercuric ion binding protein in plant for phytoremediation of heavy metals. *J. Hazard. Mat.* 161: 920-925.
- Hyun, P., In-Young, A., Heeseon, J.C., Sei, H.P. & Hye, E.L. 2006. Cloning, expression and characterization of metallothionein from the Antarctic clam *Laternula elliptica*. *Prot. Expres. Purif.* 52: 82-88.
- Lam, A.L., Pazin, D.E. & Sullivan, B.A. 2005. Control of gene expression and assembly of chromosomal subdomains by chromatin regulators with antagonistic functions. *Chromosoma* 114: 242-251.
- Ma, M., Lau, P.S., Jia, Y.T., Tsang, W.K., Samuel, L.K.S. Nora, T.F.Y. & Wong, Y.S. 2003. The isolation and characterization of Type 1 metallothionein (MT) cDNA from a heavy-metal-tolerant plant, *Festuca rubra* cv. Merlin. *Plant Sci.* 164: 51-60.
- Macek, T., Kotrba, P., Svatos, A., Novakova, M., Demnerova, K. & Mackova, M. 2007. Novel roles for genetically modified plants in environmental protection. *Trends Biotech.* 26: 146-152.
- Macek, T., Macková, M., Pavlíková, D., Száková, J., Truksa, M., Singh Cundy, A., Kotrba, P., Yancey, N. & d Scouten, W.H. 2002. Accumulation of Cadmium by Transgenic Tobacco. *Acta Biotech.* 22: 101-106.
- McCafferty, H.R.K., Moore, P.H. & Zhu, Y.J. 2008. Papaya transformed with the *Galanthus nivalis* GNA gene produces a biologically active lectin with spider mite control activity. *Plant Sci.* 3: 385-393.
- Meyer, P. 1995. Understanding and controlling transgene expression. *Trends Biotechnol.* 13: 332-337.
- Nik Marzuki, S., Shaiful, A.S., Chin, I.S., Belinda, M.Y.S., Mushrifah, I., Shahrul Hisham, Z.A. & Shahidan, S. 2006. Molecular cloning and sequencing of metallothionein gene from *Eleusine Indica*. *Malays. Appl. Biol.* 35: 71-74.
- Oller, A.L.W., Agostini, E., Talano, M.A., Capozucca, C., Milrad, S.R., Tigier, H.A. & Medina, M.I. 2005. Overexpression of a basic peroxidase in transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Pera) hairy roots increases phytoremediation of phenol. *Plant Sci.* 169: 1102-1111.
- Pilon-Smits, E. 2005. Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56: 15-39.
- Sridevi, G., Parameswari, C., Sabapathi, N., Raghupathy, V. & Veluthambi, K. 2008. Combined expression of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase genes in indica rice (*Oryza sativa* L.) enhances resistance against *Rhizoctonia solani*. *Plant Sci.* 175: 283-290.
- Suzuki, M.M. & Bird, A. 2008. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat. Rev. Gen.* 9(6): 465-76.
- Vasák, M. 2005. Advances in metallothionein structure and functions. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 19: 13-17.
- Watt, D.A. 2003. Aluminium-responsive genes in sugarcane: identification and analysis of expression under oxidative stress. *J. Exp. Bot.* 54: 1163-1174.
- Wong, M.H. & Lau, W.M. 1985. Root growth of *Cynodon dactylon* and *Eleusine indica* collected from motorways at different concentrations of lead. *Environ. Res.* 36(2): 257-267.
- Zhang, X. 2008. The epigenetic landscape of plants. *Science* 320: 489-492.

Pusat Pengajian Biosains dan Bioteknologi  
Fakulti Sains dan Teknologi  
43600 Universiti Kebangsaan Malaysia  
Bangi, Selangor, Malaysia

\*Pengarang untuk surat-menyurat; email: nms@ukm.my

Diserahkan: 16 Jun 2009  
Diterima: 5 Mei 2010