

LEMBARAN FAKTA

PERMOHONAN UNTUK MENDAPATKAN KELULUSAN UJI KAJI LAPANGAN TERKAWAL POKOK GETAH (*HEVEA BRASILENSIS*) YANG DIUBAHSUAI SECARA GENETIK

NO. RUJUKAN NBB: JBK (S) 602-1/1/17

Objektif Akta Biokeselamatan adalah untuk melindungi kesihatan manusia, tumbuh-tumbuhan dan haiwan, alam sekitar dan kepelbagaian biologi. Di bawah Akta Biokeselamatan, Lembaga Biokeselamatan Kebangsaan (LBK) sedang membuat penilaian untuk memberikan kelulusan ke atas permohonan daripada Lembaga Getah Malaysia.

1. Apakah tujuan permohonan ini?

Permohonan ini adalah untuk mendapatkan kelulusan menjalankan uji kaji lapangan untuk menilai pokok getah (*Hevea brasiliensis*) telah diubahsuai secara genetik (transgenik) di Penawar, Kota Tinggi, Johor Darul Takzim.

2. Apakah tujuan uji kaji lapangan ini?

Tujuan kerja lapangan ini adalah untuk membuat penilaian ke atas pengekspresan produk-produk transgen (protein) dalam tisu daun dan lateks pokok-pokok getah transgenik pada tahap tumbesaran yang berlainan dalam penanaman di lapangan. Pengambilan sampel daun dan lateks secara berkala untuk ujian pengekspresan transgen. Bukti pengekspresan protein asing dalam tisu pokok transgenik khususnya dalam lateks sebelum diberi perlakuan rangsangan lateks akan digunakan sebagai asas bagi mempromosikan teknologi transgenik sebagai bioreaktor untuk penghasilan protein-protein rekombinan bernilai komersil.

3. Bagaimanakah pokok getah transgenik diubahsuai?

Transformasi genetik berperantara *Agrobacterium*. Kesamaan yang terdapat dalam transformasi genetik berperantara *Agrobacterium* adalah penyelitan gen asing (yang diingini) serta gen nptII (kerintangan terhadap kanamycin) ke dalam genom *Hevea* pada peringkat kalus. Teknologi ini bertujuan mengekspres dan menuai produk transgen daripada lateks. Teknik torehan membolehkan penuaian produk transgen dalam lateks secara berterusan dan tanpa membawa kemudaratan kepada pokok getah transgenik. Transformasi genetik tidak membawa perubahan fenotip kepada pokok getah.

4. Ciri-ciri LMO

a) Maklumat tentang organisma induk

Hevea brasiliensis sungguhpun berasal dari lembah Amazon di Amerika Selatan, tumbuhan ini telah dibawa untuk kultivasi dalam ladang di banyak negara-negara beriklim tropika, termasuk Malaysia. Elastomer getah dan kayu yang diperolehi daripada pokok getah berfungsi sebagai bahan mentah dalam pelbagai aplikasi industri hiliran.

H. brasiliensis merupakan tumbuhan berbunga monoecious. Setiap infloresens mempunyai bunga jantan dan betina yang berasingan yang bercambah dari aksil daun basal baru. Bunga betina terletak di terminal tangkai tengah dan dahan-dahan dalam sesuatu infloresens. Bunga jantan lebih kecil dan mengisi ruang selebihnya dalam sesuatu infloresens. Kedua-dua bunga jantan dan betina mempunyai tangkai yang kecil dan berbau harum, ia tidak memiliki petak tetapi dirangkumi oleh lima lobus berbentuk segitiga. Bunga jantan mempunyai dua lingkaran yang mempunyai lima stamen, setiapnya dijunjung di atas satu tangkai. Bunga betina memiliki ovari kompaun dengan tiga lokul bertakhta tiga stigma yang melekit. Dalam sesuatu infloresens, beberapa bunga jantan akan mekar dan gugur selepas sehari. Bunga betina akan mekar dan kekal untuk masa selama tiga hingga lima hari, ini diikuti dengan bunga jantan yang lain. Mekanisme ini memastikan tahap pendebungaan kacuk yang tinggi. Pendebungaan berlaku menerusi serangga seperti lebah. Persenyawaan berlaku dalam masa 24 jam selepas pendebungaan. Bunga betina yang tidak disenyawakan akan gugur dengan sendirinya.

Di Malaysia, *H. brasiliensis* berbunga dari bulan Februari ke April dan ini diikuti dengan musim kedua yang singkat di antara September dan Oktober setiap tahun. Tidak ada bukti ketidakserasian walaupun pendebungaan kacuk pada lazimnya lebih cenderung menghasilkan buah. Selepas pendebungaan,

buah mencapai kematangan dalam 6-7 bulan dan akan meletup untuk menyebarkan biji ke persekitaran pokok induk.

Cantuman tunas merupakan teknik amalan dalam penanaman getah di mana batang daripada klon terpilih dicantum ke atas pokok penanti, dengan itu menghasilkan salinan-salinan seiras klon induk yang diingini. Teknik ini membolehkan penjanaan salinan tanpa had daripada satu pokok untuk penanaman getah.

Tiada tumbuhan yang mempunyai hubungan genetik yang dekat (untuk pembiakan seksual) dengan genus *Hevea* samada dalam persekitaran ataupun dalam tanaman di Malaysia. Kajian isoenzim menunjukkan bahawa debunga boleh disebarkan sejauh 1.1 km dari pokok induk dalam tanaman. Jarak pemisahan minimum di antara sempadan plot transgenik dengan tanaman getah biasa ialah 1.5 km.

Pokok getah tidak membawa kesan toksik ke atas manusia, haiwan atau organisma lain. Segelintir masyarakat afluen terutamanya di kalangan Negara-negara barat telah dilaporkan mengalami kesan alahan akibat pemakaian barangan yang diperbuat daripada getah.

H. brasiliensis merupakan tanaman perennial yang diusahakan untuk elastomer getah dan kayu yang menjadi sumber kepada pelbagai aplikasi industry hiliran. Tanaman getah memerlukan aplikasi baja di sepanjang tempoh masa produktif pokok iaitu selama 20 tahun, manakala tanaman getah yang diusahakan untuk kayu dikekalkan dalam pengurusan tanaman hutan-getah sehingga ditebang selepas 15 tahun.

b) Maklumat mengenai gen asing serta organisma penyumbang

1. B-Glucuronidase (GUS); Organisma penyumbang – bakterium - *Streptococcus pneumonia*
2. Fragmen bebenang tunggal variabel antibodi spesifik terhadap protein kot *Streptococcus gordonii* (scFv4715); Organisma penyumbang – mamalia, tikus – *Mus musculus*
3. Human atrial natriuretic factor (HANF); Organisma penyumbang – manusia - *Homo sapiens*
4. Human protamine 1 (HP1); Organism penyumbang – manusia - *Homo sapiens*
5. Neomycin phosphotransferase II (gen kerintangan kanamycin); Organisma penyumbang – bakterium - *Escherichia coli*.

c) Keterangan mengenai ciri-ciri yang diperkenalkan atau diubahsuai

Gen-gen yang diingini:

1. Glucuronidase (GUS) – ialah gen pelapor yang mengkodkan enzim glucuronidase yang menghidrolisis x-gluc – substrat larut tanpa warna, kepada produk larut berwarna biru. Ini berfungsi sebagai petunjuk pengekspresan gen di dalam tisu sasaran dalam pokok transgenik.
2. Fragmen bebenang tunggal variabel antibodi spesifik terhadap protein kot *Streptococcus gordonii* (scFv4715) akan mengikat pada protein kot *S. gordonii*, iaitu bakteria penyebab plak dan kerosakan gigi.
3. Human atrial natriuretic factor (HANF) – gen yang mengkod hormon peptid darah yang berperanan mengurangkan tekanan darah jantung, khususnya semasa pembedahan jantung.
4. Human protamine 1 (HP1) – gen yang mengkod peptid kecil yang mengaruh pembekuan darah. HP1 merupakan protein terapeutik yang digunakan untuk meneutralkan kesan anti-pembekuan oleh heparin semasa pembedahan jantung.
5. Neomycin phosphotransferase II (nptII, gen kerintangan kanamycin). Gne nptII diangkut bersama gen asing yang diingini dan ia membolehkan penyaringan kalus yang ditransformasikan dalam media pertumbuhan yang megandung antibiotik kanamycin.

d) Kaedah modifikasi genetik

Ko-kultivasi tisu kalus anter *Hevea* dengan kultur *Agrobacterium*

Kultur skala perparatif *A. tumefaciens* GV2260 yang mengandung gen asing yang diinginkan dibiak dalam kaldu LB yang mengandung antibiotik kanamycin (50 µg/ml) pada suhu 28°C sehingga fasa pegun. Bacaan OD_{600nm} kultur bakteri diubah sehingga 0.6 menggunakan media pemula (CI). Tisu kalus anter *H. brasiliensis* GL1 dicetuskan daripada dinding anter (sel tapetum) dalam media MS(ID)Z. Tisu kalus kemudiannya dilakukan ko-kultasi dengan *A. tumefaciens* GV2260 untuk membolehkan infeksi dan penyelitan gen asing yang diinginkan ke dalam genom getah. Selepas ko-kultivasi, tisu kalus dipindah ke dalam media pencetus yang mengandung antibiotik cefotaxime dan ticarcillin, yang mencegah pertumbuhan melampau *Agrobacterium*, manakala kanamycin dalam media pemilihan memastikan pertumbuhan kalus transforman. Piring petri yang mengandung kalus dieram dalam gelap pada suhu 25°C untuk 14 hari (pemilihan pertama); kultur kalus akan melalui beberapa pusingan pemilihan sebelum embryogenesis dan penjaanaan semula anak pokok sepenuhnya.

pBin19 untuk GUS, pGPTV-Kan untuk scFv4715, pGPTV-Kan untuk HANF, dan pGPTV-Kan untuk HP1. Pengekspresan scFv4715 dalam pGPTV-Kan diaruh oleh promoter 35S CaMV sementara HANF dan HP1 diaruh oleh promoter hevein. Kedua-dua vektor pBin19 dan pGPTV-Kan lazimnya digunakan dalam penyelidikan transformasi genetik tumbuhan.

e) Pencirian modifikasi genetik

Gen kerintangan kanamycin (nptII) berfungsi sebagai penanda pemilihan pada peringkat kultur kalus in vitro. Sebagai tambahan, transgen GUS, scFv4715, HANF dan HP1, adalah berguna untuk pengesanan pokok-pokok transforman dalam dalam tanaman lapangan.

Jujukan pencetus untuk pengesanan transgen melalui PCR:

HP1:

FP.hpheveinpro 5' TTTCCCGGGATGGCCAGGTACAGAT 3'

RP.hpheveinpro 5' TTGAGCTCGGCAGGAGTTTGGTGGATG 3'

NPTII:

FP.nptII 5' GAG GCT ATT CGG CTA TGA CTG 3' (position 52 – 72)

RP.nptII 5' ATC GGG AGC GGC GAT ACC GTA 3' (position 753 – 733)

scFv4715:

FPscFv4715 5' GGA TGG GAT TTG TTC TCT TTT CA 3'

RPscFv4715 5' GGC TTC AGG TAC CCT TA 3'

HANF:

ANF-for 5' TTT CCC GGG ATG AGC ACC TTC TCC ACC 3'

ANF-rev 5' TTT GAG CTC TCA GTA CCG GAA GCT GTT 3'

HANF-For 5' ATG AGC TCC TTC TCC ACC AC 3'

HANF-Rev1 5' GTA CCG GAA GCT GTT ACA GC 3'

HANF-Rev2 5' GC CCA GTC CGC TCT GGG CTC 3'

Fragmen-fragmen promoter Hevein:

FP.hevP 5' GG TCTAGA CCC ATT TCT TCC CAA TTC 3'

RP1.hevP 5' GG AAGCTT CCT GGC CCT ATG CTC TAT 3'

RP2.hevP 5' GG AAGCTT CGA GTT AAC CCT TGC GTT 3'

RP3.hevP 5' GG AAGCTT GCC CTC TTG GTT GTT GCC 3'

pBluescript KS+

T7 5' GAG GCT ATT CGG CTA TGA CTG 3'

SP6 5' ATC GGG AGC GGC GAT ACCGTA 3'

Glucuronidase:

Gus-For 5'-GGT GGG AAA GCG CGT TAC AAG-3'(position 400-420)

Gus-Rev 5'-GTT TAC GCG TTG CTT CCG CCA-3'(position 1599-1579)

f) Keselamatan protein yang diekspres

Sebelum ini tidak ada laporan ketoksikan yang disebabkan oleh produk-produk transgen (gen yang diinginkan) terhadap organisma lain atau persekitaran.

5. Penilaian risiko kepada kesihatan manusia

a) Data nutrisi

Produk-produk transgen tidak memasuki rantai makanan. Tiada bahagian pada tumbuhan yang diubahsuai yang bertujuan untuk kegunaan manusia, selain daripada ujian ke atas tisu daun dan lateks untuk mengesahkan pengekspresan transgen dan produk transgen.

b) Toksikologi

Tiada.

c) Alahan

Tiada (selain daripada apa yang diterangkan dalam jawapan kepada soalan 4).

6. Penilaian risiko terhadap persekitaran

Tiada kesan yang memudaratkan persekitaran yang diketahui.

7. Pelan respon kecemasan?

a) Langkah-langkah bantuan kecemasan

Kesemua anggota yang diberi kuasa bekerja dengan LMO diberi kelengkapan PPE (sarung tangan pakai-buang, kot makmal, dan kasut yang bersesuaian). Oleh kerana LMO dan produk transgen tidak mendatangkan kemudaratkan kepada manusia, haiwan dan persekitaran, tiada pertolongan kecemasan khusus selain daripada mencuci dengan sabun dan air yang banyak sekiranya terkena kulit semasa pengendalian.

b) Langkah-langkah pelepasan luar jangkaan

Perimeter plot tanaman transgenik getah dipagar yang mempunyai ketinggian 2 m; maka dapat menghindari pencerobohan haiwan besar yang mungkin memakan pokok-pokok getah. Sekiranya berlaku pelepasan di luar jangkaan, kawasan berkenaan akan ditutup dan usaha akan dilakukan untuk memperolehi semula LMO yang terlepas, setelah diperolehi ia akan dimasukkan ke dalam lubang yang digali di dalam tapak tanaman LMO dan ditimbus semula.

c) Penyelenggaraan dan penyimpanan

Kesemua LMO dan bahagian-bahagian LMO yang dibawa keluar akan dimasukkan ke dalam kotak tertutup yang dilabel, dibawa ke makmal untuk analisis dan selepas ujian bahan-bahan yang tidak diperlukan akan dilakukan autoklaf sebelum dibuang. Bahan-bahan eksperimen seperti nukleotid dan protein yang diperolehi daripada LMO akan dimasukkan ke dalam tiub yang bertutup, dilabel dan disimpan dalam ruang yang tersedia dalam peti beku lampau. Kesemua anggota yang terlibat akan mematuhi prosedur operasi standard dan memakai PPE.

d) Pertimbangan untuk pelupusan

Mesin-mesin autoklaf (kitaran air) terdapat dalam makmal untuk tujuan memusnahkan sampel-sampel LMO sebelum dibuang. Bahagian-bahagian LMO seperti daun dan ranting yang gugur dibiarkan untuk mereput dalam kawasan plot tanaman transgenik.

8. Bagaimanakah saya boleh memberikan ulasan tentang permohonan ini?

Mana-mana orang awam boleh membuat ulasan atau mengemukakan pertanyaan terhadap maklumat yang dihebahkan kepada orang awam yang berkaitan dengan sesuatu permohonan. Sebelum

mengemukakan ulasan atau pertanyaan, seseorang haruslah meneliti maklumat yang dibekalkan tentang permohonan tersebut. Ulasan dan pertanyaan anda tentang kemungkinan kesan/risiko ke atas kesihatan dan keselamatan manusia dan alam sekitar yang mungkin disebabkan oleh pelepasan tersebut adalah amat dihargai. Ulasan/pertanyaan yang dikemukakan mestilah disediakan dengan teliti kerana ia akan diberi penekanan yang sama seperti dengan permohonan oleh Lembaga Biokeselamatan Kebangsaan (LBK). Walaupun ulasan/pertanyaan tidak berasaskan kepada sains dan sebaliknya menumpu kepada kebudayaan atau nilai-nilai lain, ia masih perlu disediakan dalam bentuk hujah yang munasabah.

Sila beri perhatian bahawa tempoh konsultasi akan berakhir pada **28 November 2014** dan pandangan/ulasan bertulis perlu dikemukakan sebelum atau pada tarikh tersebut. Segala pandangan/ulasan hendaklah dialamatkan kepada:

Ketua Pengarah
Jabatan Biokeselamatan
Kementerian Sumber Asli dan Alam Sekitar
Aras 1, Podium 2, Wisma Sumber Asli
No. 25, Persiaran Perdana, Presint 4
62574 Putrajaya, MALAYSIA
E-mel: biosafety@nre.gov.my
No. Faks. : 03-88904935.

Sila nyatakan nama penuh, alamat dan butiran maklumat untuk dihubungi bersama-sama pandangan/ulasan yang dikemukakan.